

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 897 706**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)  
**C07D 207/404** (2006.01)  
**C07D 207/327** (2006.01)  
**C07F 9/6558** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07F 9/572** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C07D 207/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2015 PCT/IB2015/052011**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16147031**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2015 E 15885301 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.08.2021 EP 3271329**

54 Título: **Nuevos enlazadores hidrófilos y conjugados ligando-fármaco de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.03.2022**

73 Titular/es:  
**HANGZHOU DAC BIOTECH CO., LTD (100.0%)  
Building 12, ZhengTaiZhongZi Technology Park  
No. 260 Sixth Street, HEDA  
Hangzhou City, Zhejiang Province 310018, CN**

72 Inventor/es:  
**SUN, SANXING;  
ZHAO, ROBERT YONGXIN;  
LI, XING;  
GUO, HUIHUI;  
JIA, JUNXIANG;  
XIE, HONGSHENG;  
ZHOU, XIAOMAI;  
HUANG, YUANYUAN;  
YANG, QINGLIANG;  
ZHUO, XIAOTAO;  
YE, HANGBO;  
GAI, SHUN;  
QU, LAN;  
LI, WENJUN y  
LIN, CHEN**

74 Agente/Representante:  
**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 897 706 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

Nuevos enlazadores hidrófilos y conjugados ligando-fármaco de los mismos

## 5 Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a nuevos enlazadores hidrófilos que son útiles para enlazar fármacos (por ejemplo, fármacos citotóxicos) a ligandos de unión a células (por ejemplo, anticuerpos). El uso de enlazadores hidrófilos de la divulgación aumenta la potencia y el índice terapéutico de los conjugados ligando-fármaco (por ejemplo, conjugados anticuerpo-fármaco). Esto es particularmente eficaz cuando los enlazadores hidrófilos se utilizan como no escindibles. La presente divulgación se refiere además a métodos para preparar los nuevos enlazadores hidrófilos y los conjugados ligando-fármaco de los mismos.

## 15 Antecedentes de la divulgación

Con el fin de reducir las toxicidades sistémicas, un enfoque prometedor para lograr la administración dirigida de fármacos citotóxicos a las células tumorales es utilizar conjugados de fármaco-anticuerpo (ADCs por sus siglas en inglés) u otros tipos de conjugados de fármaco-ligando como fármacos dirigidos al tumor autodirigidos. Los conjugados anticuerpo-fármaco, que combinan la especificidad de los anticuerpos monoclonales y la potencia de los fármacos citotóxicos, han sido objeto de una intensa búsqueda durante más de 30 años. La reciente aprobación de dos ADCs, brentuximab vedotin para el tratamiento del linfoma de Hodgkin y adotrastuzumab emtansine para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, ha impulsado las actividades de investigación en el campo a un nuevo nivel. Se ha vuelto común que una empresa de biotecnología o farmacéutica tenga programas en el campo de los conjugados de anticuerpo-fármaco.

25 Sin embargo, incluso con los ADCs, todavía existe un viejo problema. Se sabe que después de múltiples tratamientos de pacientes con cáncer con fármacos quimioterapéuticos, los pacientes pueden volverse resistentes a dicho tratamiento (Szakacs et al. *Nat Rev Drug Discov.* 2006, 5: 219-34). Existen varios mecanismos por los cuales las células tumorales pueden volverse resistentes. Entre ellas, las proteínas resistentes a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés) son bombas de membrana importantes que pueden transportar agentes quimioterapéuticos fuera de las células. Una de las bombas MDR más frecuentes es MDR1. La MDR1, que también se conoce como P-glicoproteína 1 (PGP1) o miembro 1 de la subfamilia B del casete de unión a ATP (ABCB1 por sus siglas en inglés), es la bomba de eflujo más común de fármacos contra el cáncer y las correlaciones entre la expresión de MDR1 y las malas respuestas a la quimioterapia se han demostrado para muchos tipos de cáncer (Takara et al. *Curr Pharm Des* 2006, 12: 273-86; Leonard et al. *Oncologist* 2003, 8: 411-24). Sin embargo, la mayoría de los fármacos citotóxicos que se han utilizado en los ADCs, como maitansinoides, dolastatinas, caliqueamicina, doxorubicina, taxanos y duocarmicinas, también son sustratos del transportador MDR1, y la actividad de muchos ADCs es deficiente en las células que expresan MDR1 (Takeshita et al. *Br J Haematol.* 2009, 146, 34-43; Hamann et al. *Bioconjug Chem.* 2005, 16, 346-53).

40 MDR1 causa resistencia a los fármacos quimioterapéuticos a través de dos mecanismos. Primero, expulsando fármacos que se han difundido a la membrana plasmática desde los espacios extracelulares. En tales casos, se evita que los compuestos entren en el citoplasma. En segundo lugar, expulsando los compuestos que han entrado en el citoplasma hacia el exterior de la célula (Sharom. *Pharmacogenomics.* 2008, 9, 105-27; Lehne. *Curr Drug Targets.* 2000, 1, 85-99). Debido a que los ADCs administran los fármacos citotóxicos al citoplasma mediante endocitosis mediada por antígenos, se evita el primer tipo de resistencia (Hamann et al. *Bioconjug Chem.* 2005, 16, 346-53; Guillemard et al. *Oncogene.* 2004, 23, 3613-21). Sin embargo, después de que los conjugados se procesan en pequeños fragmentos dentro de las células, los fármacos citotóxicos siguen siendo susceptibles al segundo tipo de resistencia, es decir, la expulsión de fármacos del citoplasma a los espacios extracelulares.

50 En el caso de los ADCs, el MDR1 no solo disminuye la potencia de los fármacos citotóxicos, sino que también disminuye el índice terapéutico, porque una vez transportado a los espacios extracelulares por MDR1, los fármacos citotóxicos también pueden causar daño a las células sanas normales del cuerpo. Puede comprometer significativamente los resultados de las terapias antitumorales dirigidas. Por lo tanto, incluso con conjugados de anticuerpo-fármaco, todavía existe la necesidad de superar el problema de la resistencia a múltiples fármacos. Esto ayudará a aumentar la potencia y el índice terapéutico de los conjugados anticuerpo-fármaco y permitirá que los conjugados anticuerpo-fármaco alcancen el objetivo previsto de la terapia antitumoral dirigida a un nivel mucho más alto.

60 El documento WO 2014/080251 se refiere a conjugados de fármaco-agente de unión a células que comprenden enlazadores hidrófilos y métodos para usar dichos enlazadores y conjugados.

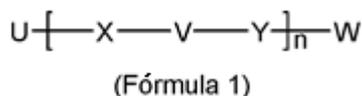
El documento WO 2015/028850 se refiere a agentes citotóxicos, derivados de pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina (PBD), sus conjugados con un agente de unión a células, la preparación y los usos terapéuticos en el tratamiento dirigido de cánceres, trastornos autoinmunes y enfermedades infecciosas.

65 Los documentos WO 2014/151030 A1 y WO 2012/143497 A2 también describen enlazadores y conjugados.

Breve descripción de la invención

La presente divulgación mejora la potencia y el índice terapéutico de los conjugados ligando-fármaco mediante el uso de enlazadores hidrófilos que incorporan una variedad de grupos polares o cargados. Los conjugados ligando-fármaco elaborados a partir de los enlazadores hidrófilos son muy potentes contra las células tumorales. La invención actualmente reclamada se define en y por las reivindicaciones adjuntas.

La Fórmula general de los enlazadores hidrófilos de la presente divulgación se muestra en la Fórmula (1):



donde:

V representa un grupo polar o cargado; Los grupos polares o cargados adecuados que se pueden usar en la Fórmula (1) incluyen, pero no se limitan a, aminos [-N (R)-], ureas [-N (R<sub>1</sub>) CON (R<sub>2</sub>) - o -N(CONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) -], carboxilos [-Q (COOH) - o -Q(ZCOOH) -], carbamatos {[ -N (R) COO-] o [-N (COOR)-]}, guanidinas [-N (R<sub>1</sub>) C = N (COOR<sub>2</sub>) N (R<sub>3</sub>)-], sulfonamidas [-N (SO<sub>2</sub>R)-], sulfonas (-SO<sub>2</sub>-), sulfóxidos (-SO-), ácidos sulfónicos [-Q (ZSO<sub>2</sub>OH) -], ácidos sulfámicos [-N (SO<sub>2</sub>OH) -], fosfonatos {-Q [ZPO (OR)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfónicos {-Q [ZPO (OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosforamídicos {-N [PO(OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfordiamídicos {-N [PO (NH<sub>2</sub>) (OH)] -} y triamidas fosfóricas {-N [PO (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] -}, donde R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientes pendientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; Q es CH o N; Z es 1~5 unidades de metileno.

U representa un grupo funcional reactivo que permite un enlace covalente con un fármaco citotóxico; Los grupos funcionales reactivos que permiten un enlace covalente con un fármaco citotóxico incluyen, pero no se limitan a, tioles, disulfuros, aminos, carboxilos, aldehídos, cetonas, maleimidias, grupos haloacetilo, grupos alquenoilo, grupos alquinilo, hidrazinas e hidroxilos. El enlace covalente con el fármaco citotóxico puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tioéster, un enlace amida, un enlace éster, un enlace carbono-nitrógeno, un enlace carbono-carbono, un enlace hidrazina, un enlace hidrazida, un enlace enlace hidrazona, enlace éter, enlace carbamato o enlace carbonato;

W representa un grupo funcional reactivo que permite un enlace covalente con un ligando de unión a células, como un anticuerpo monoclonal. Los grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un ligando de unión a células incluyen principalmente dos tipos. El primer tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo amino en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-sulfosuccinimidilo, ésteres de nitrofenilo, ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, cloruros de acilo, anhídridos, cloruros de sulfonilo, cloroformatos, isocianatos, aldehídos y cetonas. El enlace covalente puede ser un enlace amida, un enlace carbamato, un enlace urea u otros tipos de enlaces carbono-nitrógeno. El segundo tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo tiol en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, disulfuros tales como piridilidisulfuros y nitropiridilidisulfuros, maleimidias, cloruros de acilo, grupos haloacetilo tales como yodoacetamida y bromoacetamida, alquenilpiridinas, isocianatos e isotiocianatos. El enlace covalente puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tiocarbamato, un enlace ditiocarbamato o un enlace tioéster;

X representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

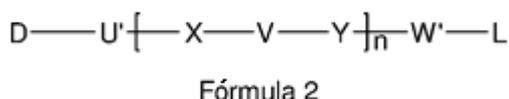
Y representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

n es un número entero de 1 a 100. Si n > 1, los valores de cada V, X e Y en los corchetes repetidos de la Fórmula (1) son independientes y no tienen que ser idénticos.

Preferiblemente, n es un número entero de 1 a 50. Incluso más preferiblemente, n es un número entero de 1 a 10. Lo más preferiblemente, n es un número entero de 1 a 4.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a nuevos conjugados ligando-fármaco. La presente divulgación proporciona conjugados ligando-fármaco que comprenden un ligando de unión a células que se une a una población celular particular, un fármaco citotóxico que es muy potente y un enlazador hidrófilo que conecta el ligando de unión a células y el fármaco citotóxico. Los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación tienen una eficacia y seguridad superiores que los conjugados ligando-fármaco que comprenden enlazadores no hidrófilos.

La Fórmula general de los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se muestra en la Fórmula (2):



donde:

D representa un fármaco citotóxico;

L representa un ligando de unión a células;

5 V representa un grupo polar o cargado; Los grupos polares o cargados adecuados que se pueden usar en la Fórmula (2) incluyen, pero no se limitan a, aminos [-N (R) -], ureas [-N (R<sub>1</sub>) CON (R<sub>2</sub>) - o -N (CONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) -], carboxilos [-Q (COOH) - o -Q (ZCOOH) -], carbamatos {[ -N (R) COO-] o [-N (COOR) -]}, guanidinas [-N (R<sub>1</sub>) C = N (COOR<sub>2</sub>) N (R<sub>3</sub>) -], sulfonamidas [-N (SO<sub>2</sub>R) -], sulfonas (-SO<sub>2</sub>-), sulfóxidos (-SO-), ácidos sulfónicos [-Q (ZSO<sub>2</sub>OH) -], ácidos sulfámicos [ -N (SO<sub>2</sub>OH) -], fosfonatos {-Q [ZPO (OR)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfónicos {-Q [ZPO (OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosforamídicos {-N [PO(OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosforodiamídicos {-N [PO(NH<sub>2</sub>) (OH)] -} y triamidas fosfóricas {-N [PO (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] -}, donde R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientes pendientemente H o alquilo C1-C8; Q es CH o N; Z es 1~5 unidades de metileno.

10 U' representa un grupo funcional que permite un enlace covalente con un fármaco citotóxico; Los grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un fármaco citotóxico incluyen, pero no se limitan a, tioles, disulfuros, aminos, carboxilos, aldehídos, cetonas, maleimidas, grupos haloacetilo, grupos alquenoilo, grupos alquinoilo, hidrazinas e hidroxilos. El enlace covalente con el fármaco citotóxico puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tioéster, un enlace amida, un enlace éster, un enlace carbono-nitrógeno, un enlace carbono-carbono, un enlace hidrazina, un enlace hidrazida, un enlace enlace hidrazona, enlace éter, enlace carbamato o enlace carbonato;

15 W' representa un grupo funcional que permite un enlace covalente con un ligando de unión a células, como un anticuerpo monoclonal. Los grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un ligando de unión a células incluyen principalmente dos tipos. El primer tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo amino en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-sulfosuccinimidilo, ésteres de nitrofenilo, ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, cloruros de acilo, anhídridos, cloruros de sulfonilo, cloroformatos, isocianatos, aldehídos y cetonas. El enlace covalente puede ser un enlace amida, un enlace carbamato, un enlace urea u otros tipos de enlaces carbono-nitrógeno. El segundo tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo tiol en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, disulfuros tales como piridildisulfuros y nitropiridildisulfuros, maleimidas, cloruros de acilo, grupos haloacetilo tales como yodoacetamida y bromoacetamida, alquenilpiridinas, isocianatos e isotiocianatos. El enlace covalente puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tiocarbamato, un enlace ditiocarbamato o un enlace tioéster;

20 X representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

25 Y representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

30 n es un número entero de 1 a 100. Si n > 1, los valores de cada V, X e Y en los corchetes repetidos de la Fórmula (2) son independientes y no tienen que ser idénticos.

Preferiblemente, n es un número entero de 1 a 50. Incluso más preferiblemente, n es un número entero de 1 a 10. Lo más preferiblemente, n es un número entero de 1 a 4.

40 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de la prueba in vivo de tres conjugados anticuerpo-fármaco en un modelo de tumor de xenoinjerto de diana positiva.

45 Descripción detallada de la invención

50 Aunque MDR1 expulsa una gran variedad de compuestos, en términos generales, MDR1 transporta preferentemente compuestos hidrófobos y la mayoría de los sustratos de MDR1 son hidrófobos (Loo et al. J Membr Biol. 2005, 206, 173-85). Los compuestos hidrófilos suelen ser mucho menos susceptibles al flujo de salida mediado por MDR1 y se pueden retener principalmente dentro de las células. En consecuencia, la inclusión de grupos hidrófilos en moléculas de fármacos a menudo se ha utilizado como una forma de combatir MDR1 y superar la situación de reposo de múltiples fármacos (Szokacs et al. Nature Reviews. 5, 219-235, 2006; Kovtun et al. Cancer Res. 2010, 70, 2528 - 2537; Zhao et al. J. Med. Chem. 2011, 54, 3606 - 3623).

55 La presente divulgación evita el problema de la resistencia a múltiples fármacos mediante el uso de conectores hidrófilos para construir conjugados de anticuerpo-fármaco. El enlazador hidrófilo confiere la capacidad de superar la resistencia mediada por MDR1 al fármaco citotóxico enlazado. Esto es particularmente eficaz cuando el enlazador hidrófilo se usa como uno no escindible, porque el enlazador hidrófilo siempre permanecerá conectado al fármaco citotóxico (Szakacs et al. Nature Reviews Drug Discovery. 2006, 5: 219-234). Como resultado, la hidrofilia del enlazador puede hacer que el fármaco citotóxico enlazado sea de forma permanente más resistente al flujo de salida mediado por MDR1. Mantendrá el fármaco citotóxico ligado enlazado dentro de la célula diana y ejercerá su efecto citotóxico.

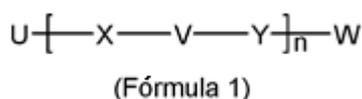
60 Además, un enlazador altamente hidrófilo también puede evitar el problema de que algunos conjugados anticuerpo-fármaco pueden sufrir agregación, debido a la hidrofobicidad del enlazador o del fármaco citotóxico, o de ambos (Jeffrey et al. J Med Chem. 2005, 48: 1344-1358). Al aumentar la solubilidad de los conjugados anticuerpo-fármaco, un enlazador altamente hidrófilo minimiza eficazmente el problema. Además, también permite la incorporación de un

número relativamente grande de fármacos en cada anticuerpo, aumentando así aún más la potencia de los conjugados anticuerpo-fármaco (Zhao et al. J. Med. Chem. 2011, 54, 3606 - 3623).

Los enlazadores hidrofílicos

En un aspecto de la divulgación, la presente divulgación mejora la potencia y el índice terapéutico de los conjugados ligando-fármaco mediante el uso de enlazadores hidrofílicos que incorporan una variedad de grupos polares o cargados. Los conjugados ligando-fármaco, tal como los conjugados anticuerpo-fármaco, elaborados a partir de tales enlazadores hidrofílicos son muy potentes para las células tumorales resistentes a múltiples fármacos.

La Fórmula general de los enlazadores hidrofílicos de la presente divulgación se muestra en la Fórmula (1):



donde:

V representa un grupo polar o cargado; Los grupos polares o cargados adecuados que se pueden usar en la Fórmula (1) incluyen, pero no se limitan a, aminos [-N (R) -], ureas [-N (R<sub>1</sub>) CON (R<sub>2</sub>)- o -N(CONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) -], carboxilos [-Q (COOH)- o -Q(ZCOOH) -], carbamatos {[N (R) COO-] o [N (COOR) -]}, guanidinas [-N (R<sub>1</sub>) C = N (COOR<sub>2</sub>) N (R<sub>3</sub>)-], sulfonamidas [-N (SO<sub>2</sub>R) -], sulfonas (-SO<sub>2</sub>-), sulfóxidos (-SO-), ácidos sulfónicos [-Q (ZSO<sub>2</sub>OH) -], ácidos sulfámicos [-N (SO<sub>2</sub>OH)-], fosfonatos [-Q [ZPO(OR)<sub>2</sub>] -], ácidos fosfónicos [-Q [ZPO (OH)<sub>2</sub>] -], ácidos fosforamídicos [-N [PO (OH)<sub>2</sub>] -], ácidos fosfordiamídicos [-N [PO (NH<sub>2</sub>) (OH)] -] y triamidas fosfóricas [-N [PO (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] -], donde R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente H o alquilo C1-C8; Q es CH o N; Z es 1-5 unidades de metileno.

U representa un grupo funcional reactivo que permite un enlace covalente con un fármaco citotóxico; Los grupos funcionales reactivos que permiten un enlace covalente con un fármaco citotóxico incluyen, pero no se limitan a, tioles, disulfuros, aminos, carboxilos, aldehídos, cetonas, maleimidias, grupos haloacetilo, grupos alquenoilo, grupos alquinilo, hidrazinas e hidroxilos. El enlace covalente con el fármaco citotóxico puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tioéster, un enlace amida, un enlace éster, un enlace carbono-nitrógeno, un enlace carbono-carbono, un enlace hidrazina, un enlace hidrazida, un enlace enlace hidrazona, enlace éter, enlace carbamato o enlace carbonato;

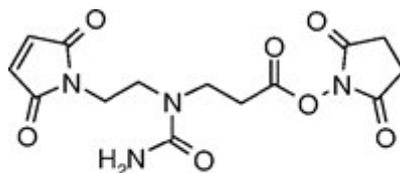
W representa un grupo funcional reactivo que permite un enlace covalente con un ligando de unión a células, como un anticuerpo monoclonal. Los grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un ligando de unión a células incluyen principalmente dos tipos. El primer tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo amino en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-sulfosuccinimidilo, ésteres de nitrofenilo, ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, cloruros de acilo, anhídridos, cloruros de sulfonilo, cloroformatos, isocianatos, isotiocianatos, aldehídos, y cetonas. El enlace covalente puede ser un enlace amida, un enlace carbamato, un enlace urea u otros tipos de enlaces carbono-nitrógeno. El segundo tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo tiol en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, disulfuros tales como piridildisulfuros y nitropiridildisulfuros, maleimidias, cloruros de acilo, grupos haloacetilo tales como yodoacetamida y bromoacetamida, alquenilpiridinas, isocianatos e isotiocianatos. El enlace covalente puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tiocarbamato, un enlace ditiocarbamato o un enlace tioéster;

X representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

Y representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

n es un número entero de 1 a 100. Si n > 1, los valores de cada V, X e Y en los corchetes repetidos de la Fórmula (1) son independientes y no tienen que ser idénticos.

Como realizaciones ejemplares de la divulgación, los compuestos (1) a (15) son algunos de los enlazadores hidrofílicos que pueden usarse para preparar los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación.

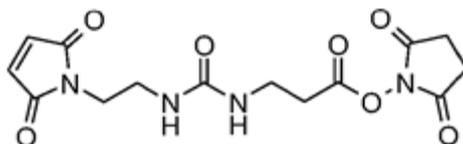


(Compuesto 1)

En el Compuesto (1), el grupo urea en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrofílico. El grupo maleimida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona

fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS, que se utiliza a menudo como grupo funcional reactivo para activar ácidos carboxílicos, puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

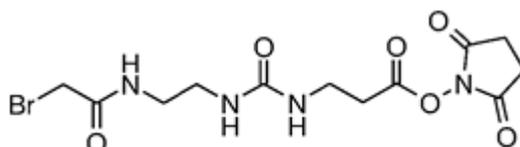
5



(Compuesto 2)

En el Compuesto (2), el grupo urea en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo maleimida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El grupo maleimida reacciona fácilmente con los grupos tiol en el ligando o fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

10

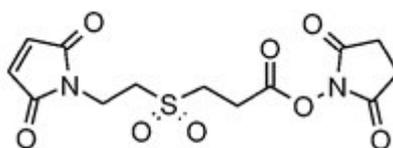


(Compuesto 3)

15

En el Compuesto (3), el grupo urea en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo bromoacetamida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

20

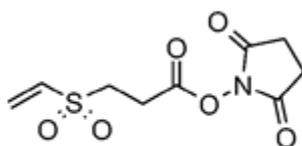


(Compuesto 4)

25

En el Compuesto (4), el grupo sulfona en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo maleimida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

30

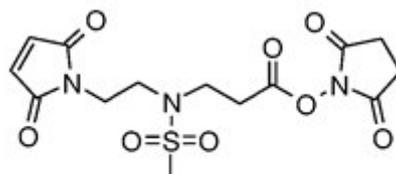


(Compuesto 5)

35

En el Compuesto (5), el grupo sulfona en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo alquenilo en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de

ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

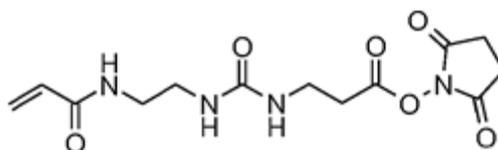


(Compuesto 6)

5

En el Compuesto (6), el grupo sulfonamida en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo maleimida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

10

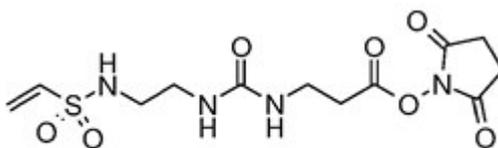


(Compuesto 7)

15

En el Compuesto (7), el grupo urea en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo alqueno en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

20

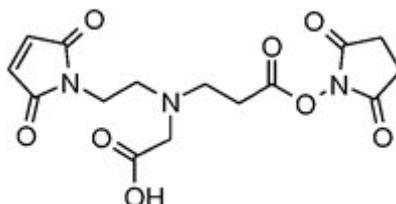


(Compuesto 8)

25

En el Compuesto (8), el grupo urea y el grupo sulfonamida en el medio del enlazador hacen que el enlazador sea hidrófilo. El grupo alqueno en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

30

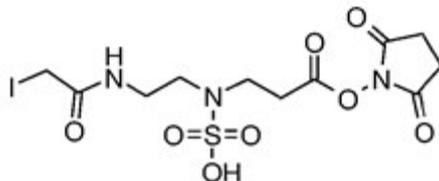


(Compuesto 9)

En el Compuesto (9), el grupo glicina en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo maleimida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona

fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

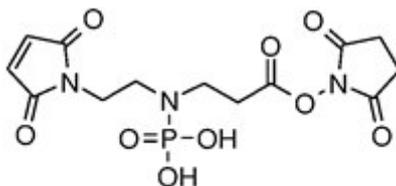
5



(Compuesto 10)

En el Compuesto (10), el grupo de ácido sulfámico en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo yodoacetamida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para unirse a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

10

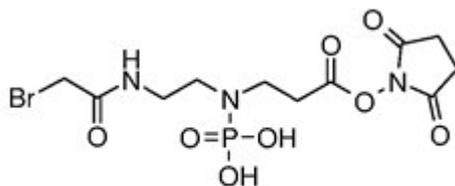


(Compuesto 11)

En el Compuesto (11), el grupo de ácido fosforámico en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo maleimida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

15

20

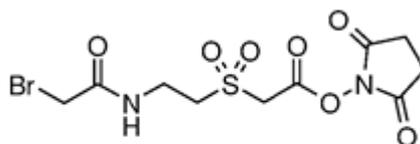


(Compuesto 12)

En el Compuesto (12), el grupo de ácido fosforámico en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo bromoacetamida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.

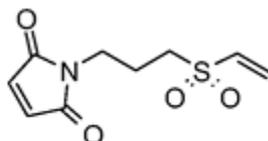
25

30



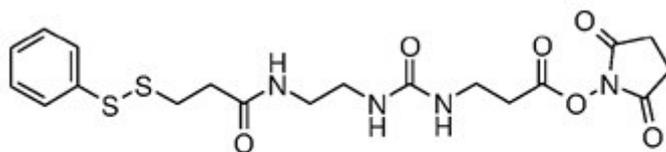
(Compuesto 13)

- 5 En el Compuesto (13), el grupo sulfona y el grupo amida en el medio del enlazador hacen que el enlazador sea hidrófilo. El grupo bromoacetamida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.



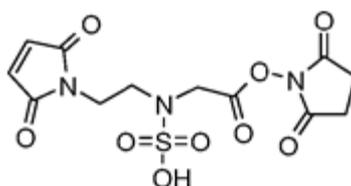
(Compuesto 14)

- 10 En el Compuesto (14), el grupo sulfona en el medio del enlazador hace que el enlazador sea hidrófilo. El grupo maleimida en el extremo izquierdo del enlazador se usa como un ancla para enlazar a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable. El grupo alquenilo en el extremo derecho del enlazador se usa como un ancla para unirse a moléculas de ligando o fármaco. Reacciona fácilmente con los grupos tiol del ligando o del fármaco que contiene tiol para formar un enlace tioéter estable.

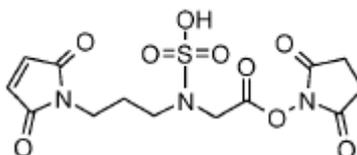


(Compuesto 15)

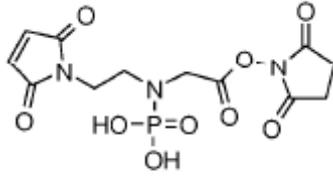
- 20 En el Compuesto (15), el grupo urea y el grupo amida en el medio del enlazador hacen que el enlazador sea hidrófilo. El grupo disulfuro en el extremo izquierdo del enlazador se usa como ancla para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El grupo disulfuro reacciona fácilmente con los grupos tiol en el ligando o fármaco que contiene tiol para formar un nuevo enlace disulfuro. El éster de N-hidroxisuccinimida (éster NHS) en el extremo derecho del enlazador también se usa para unirse a moléculas de ligando o fármaco. El éster NHS puede reaccionar con los grupos amino del ligando o fármaco para formar un enlace amida estable.
- 25 En las estructuras siguientes se muestran enlazadores hidrófilos más ejemplares [Compuestos (16) a (26)]:



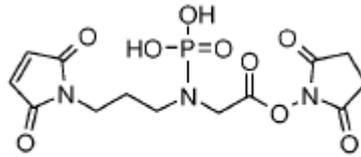
(Compuesto 16)



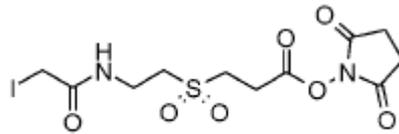
(Compuesto 17)



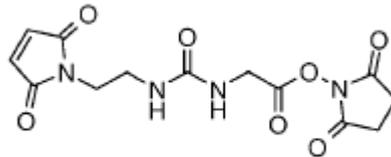
(Compuesto 18)



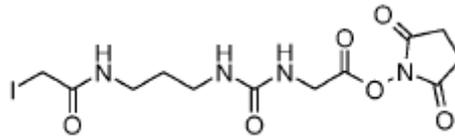
(Compuesto 19)



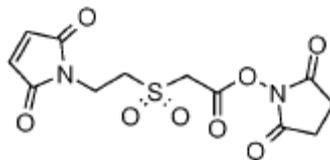
(Compuesto 20)



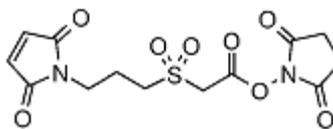
(Compuesto 21)



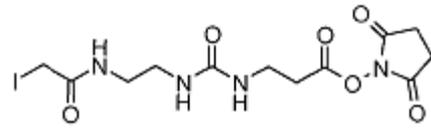
(Compuesto 22)



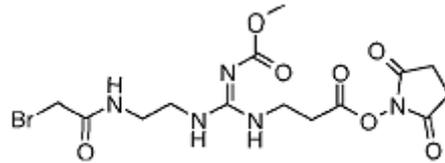
(Compuesto 23)



(Compuesto 24)

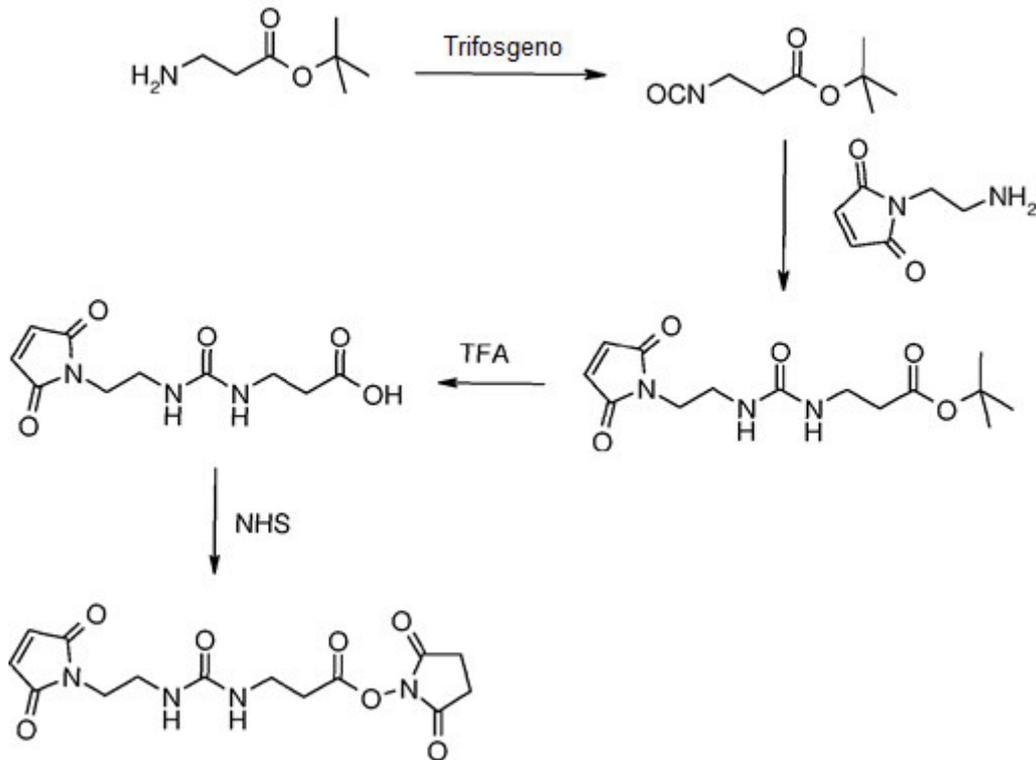


(Compuesto 25)



(Compuesto 26)

5 Los ejemplos de realizaciones anteriores se utilizan como ilustraciones de la divulgación.



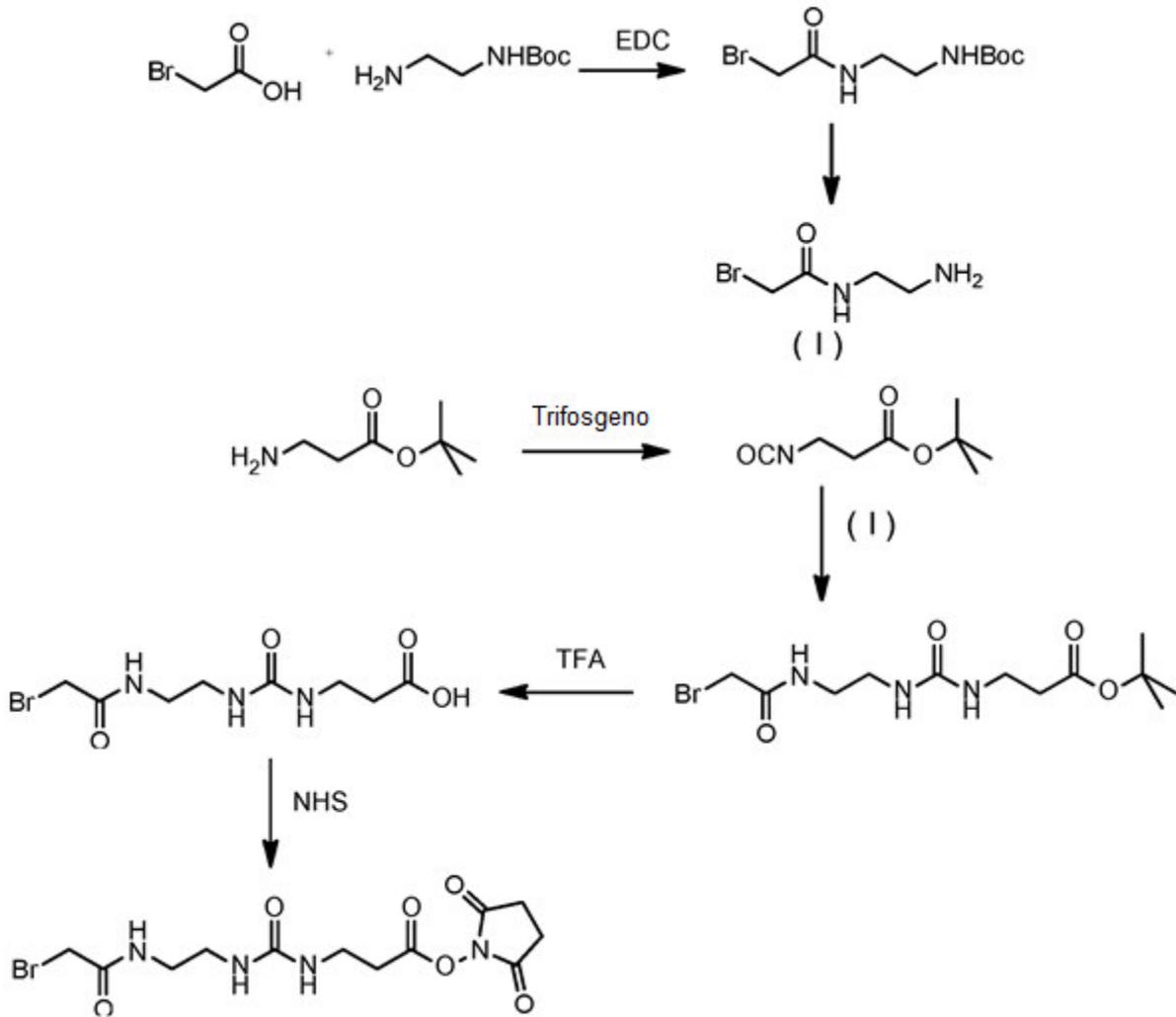
Esquema 1

10 No debe entenderse que la presente divulgación se limita únicamente a los ejemplos ilustrados. La invención actualmente reclamada se define en y por las reivindicaciones adjuntas.

**La preparación de enlazadores hidrófilos**

15 Otro aspecto de la presente divulgación es la preparación de enlazadores hidrófilos. Los enlazadores hidrófilos de la divulgación se pueden preparar mediante muchos métodos sintéticos. Como ejemplos ilustrativos, las rutas sintéticas generales para algunos de los enlazadores hidrófilos se muestran en el Esquema (1) a (11).

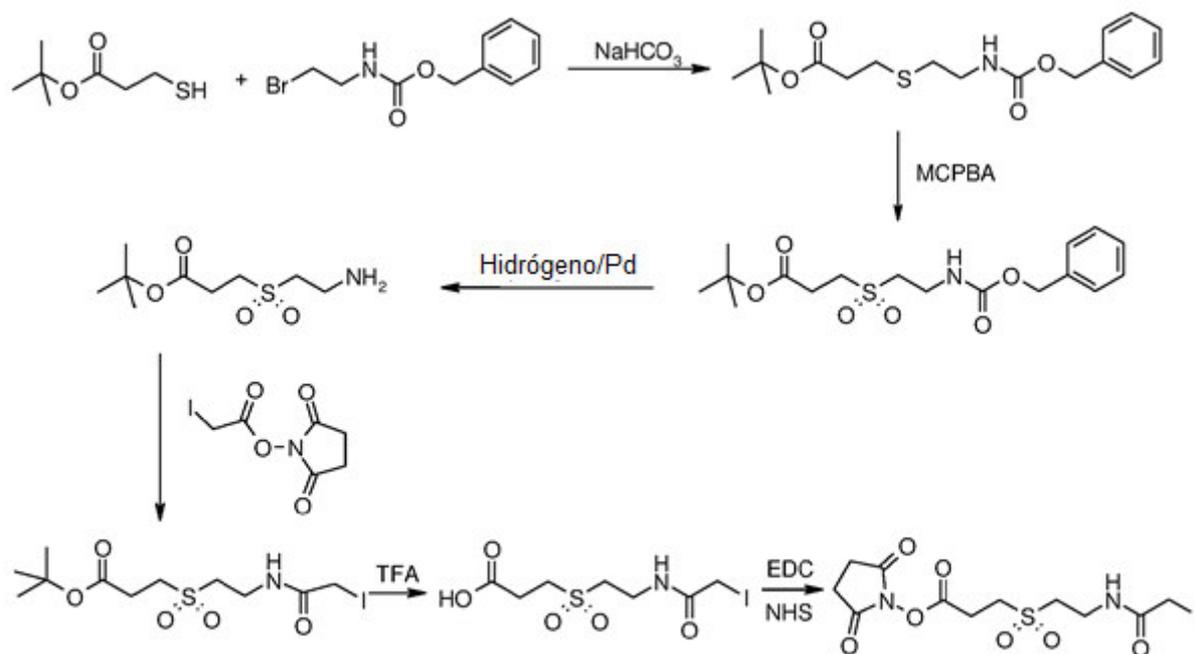
En el esquema (1), se prepara un enlazador hidrófilo que posee un grupo urea. En el primer paso, se introduce un grupo isocianato tratando un grupo amino con trifosgeno. Luego, tras



Esquema 2

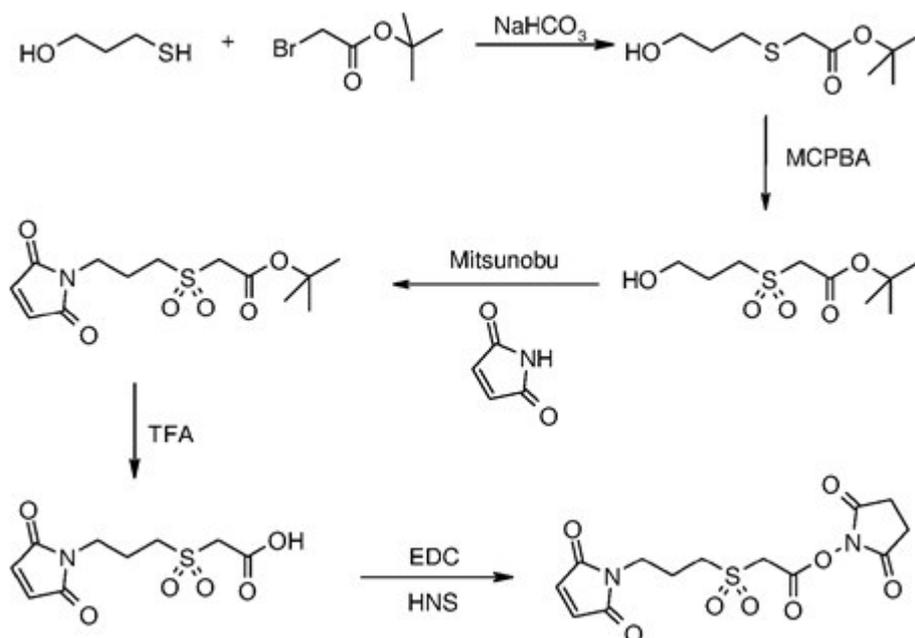
5 el tratamiento con otro grupo amino, se forma fácilmente un grupo urea en medio del enlazador hidrófilo. Durante la síntesis, se introduce un grupo maleimido reactivo en el extremo izquierdo de los enlazadores hidrófilos al mismo tiempo. Se introduce un grupo NHS reactivo en el extremo derecho del enlazador hidrófilo en el último paso.

10 En el esquema (2), se prepara otro enlazador hidrófilo que posee un grupo urea. En el primer paso, se prepara un derivado de bromoacetamida que posee un grupo amino. A continuación, se introduce un grupo isocianato tratando un grupo amino de un compuesto diferente con trifosgeno. Luego, al reaccionar con el derivado de bromoacetamida preparado en el primer paso, se forma fácilmente un grupo urea en el medio del enlazador hidrófilo. Durante la síntesis, se introduce un grupo bromo reactivo en el extremo izquierdo de los enlazadores hidrófilos al mismo tiempo. Se introduce un grupo NHS reactivo en el extremo derecho del enlazador hidrófilo en el último paso.



Esquema 3

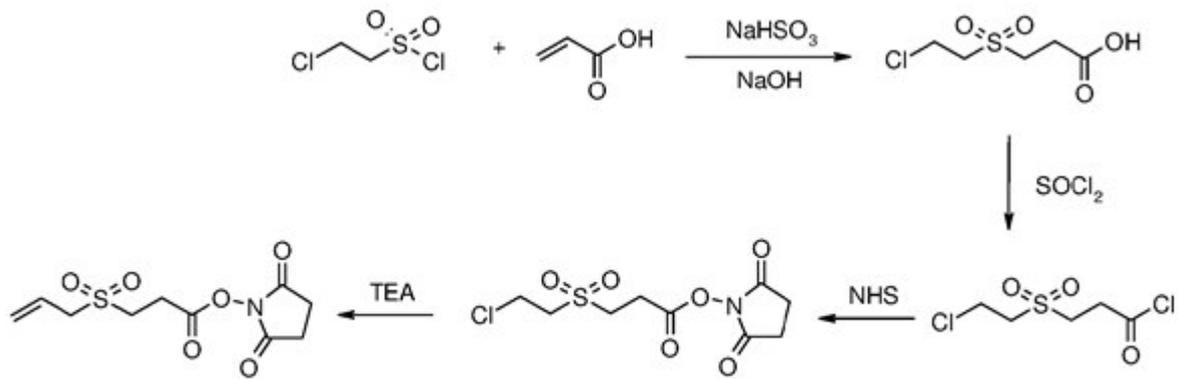
5 En el esquema (3), se prepara un enlazador hidrófilo que posee un grupo sulfona. En el primer paso, se prepara un derivado de tioéter. A continuación, tras la oxidación, el grupo tioéter se transforma fácilmente en un grupo sulfona en el medio del enlazador hidrófilo. Luego, se introducen dos grupos funcionales reactivos (una yodoacetamida y un éster NHS) en los dos extremos del enlazador hidrófilo, respectivamente.



Esquema 4

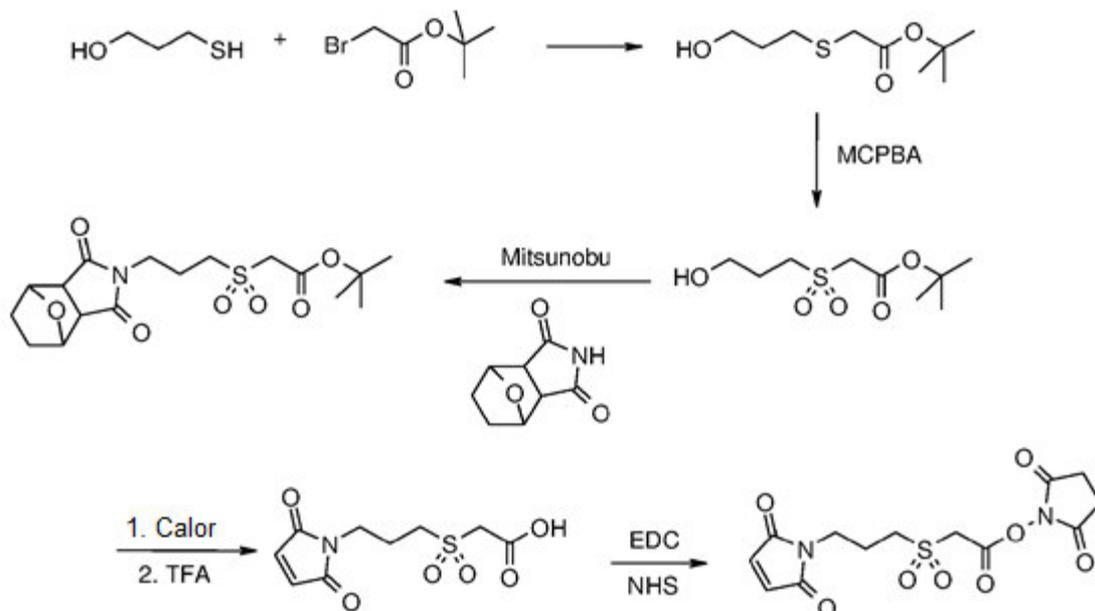
10 En el esquema (4), se prepara un enlazador hidrófilo que posee un grupo sulfona en un enfoque alternativo. En el primer paso, se prepara un derivado de tioéter. A continuación, tras la oxidación, el grupo tioéter se transforma fácilmente en un grupo sulfona en el medio del enlazador hidrófilo. Luego, se introducen dos grupos funcionales reactivos (una

maleimida y un éster NHS) en los dos extremos del enlazador hidrófilo, respectivamente.



Esquema 5

- 5 En el esquema (5), un enlazador hidrófilo que posee un grupo sulfona se prepara en otro enfoque. Después de que el grupo sulfona se incorpora en medio del enlazador hidrófilo, se introducen dos grupos funcionales reactivos (un alquenilo y un éster NHS) en los dos extremos del enlazador hidrófilo, respectivamente.

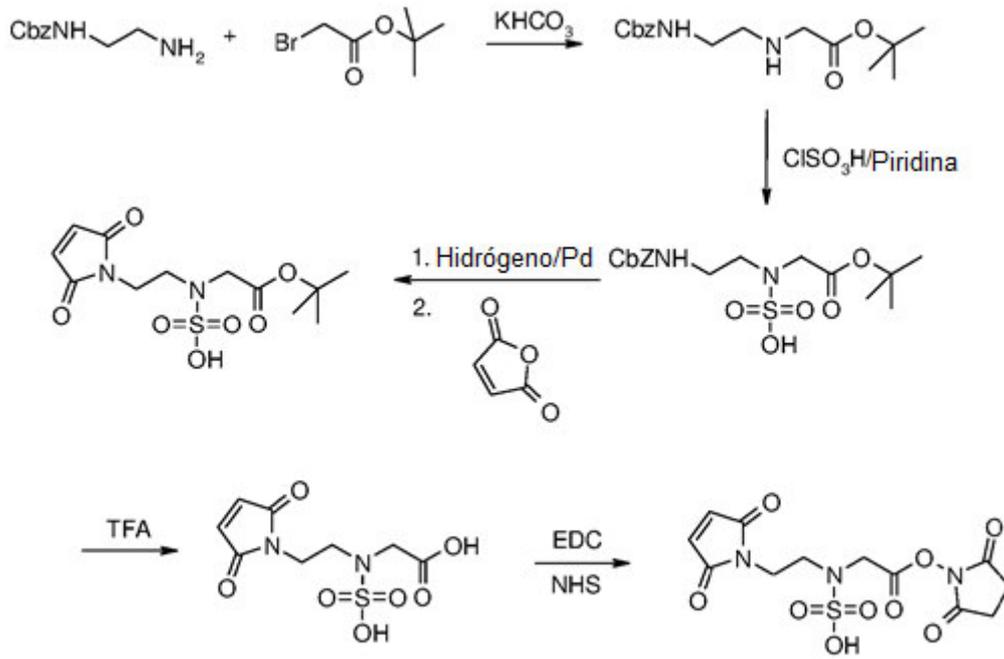


Esquema 6

10

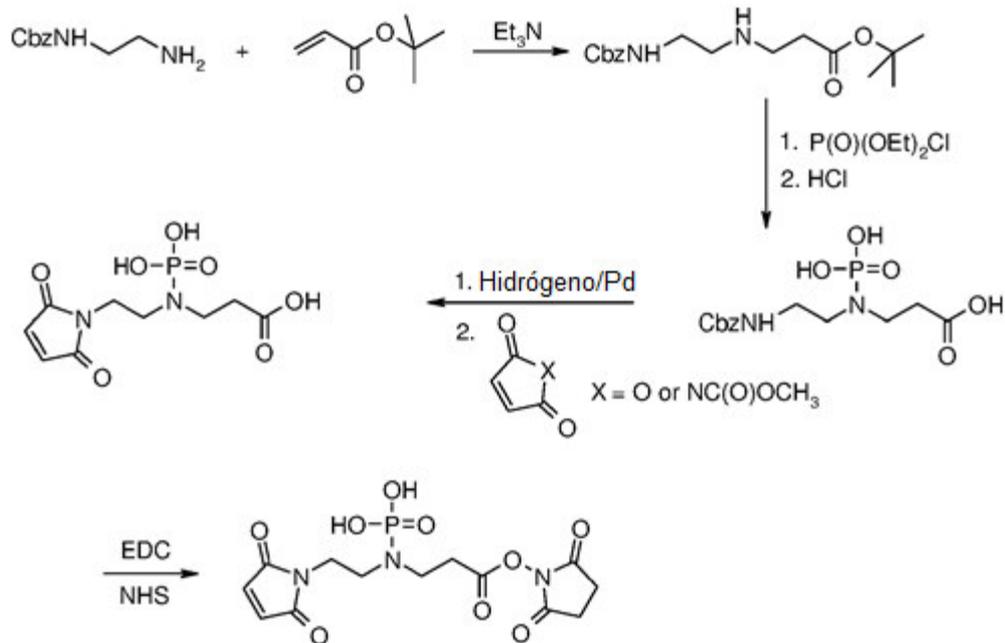
En el esquema (6), se prepara un enlazador hidrófilo que posee un grupo sulfona en otro enfoque alternativo. En el primer paso, se prepara un derivado de tioéter. A continuación, tras la oxidación, el grupo tioéter se transforma fácilmente en un grupo sulfona en el medio del enlazador hidrófilo. Luego, se introducen dos grupos funcionales reactivos (una maleimida y un éster NHS) en los dos extremos del enlazador hidrófilo, respectivamente.

15



Esquema 7

5 En el esquema (7), se prepara un enlazador hidrófilo que posee un grupo de ácido sulfámico. En el primer paso, el grupo amino necesario se crea mediante una simple reacción de sustitución nucleofílica. A continuación, el grupo de ácido sulfámico se introduce en el medio del enlazador hidrófilo haciéndolo reaccionar con ácido sulfuroclorídico. Luego, se introducen dos grupos funcionales reactivos (una maleimida y un éster NHS) en los dos extremos del enlazador hidrófilo, respectivamente.



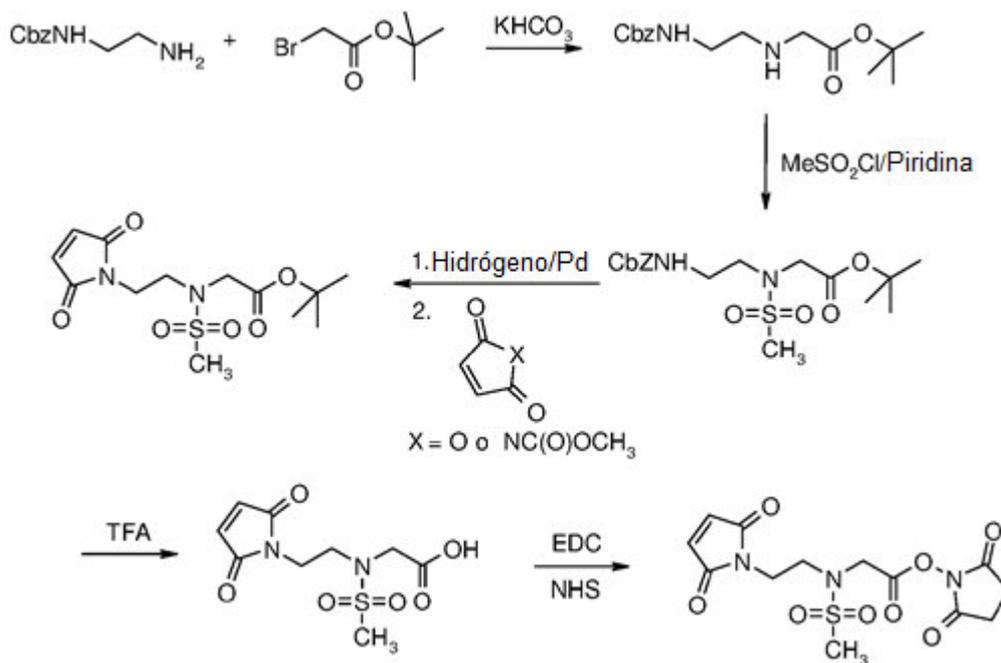
Esquema 8

10

En el esquema (8), se prepara un enlazador hidrófilo que posee un grupo de ácido fosforamídico. En el primer paso, el grupo amino necesario se crea mediante una simple reacción de adición de Michael. A continuación, se introduce el

grupo de ácido fosforámico en medio del enlazador hidrófilo haciéndolo reaccionar con cloruro de fosforilo o clorofosfato de dietilo, seguido de tratamiento con ácido clorhídrico. Luego, se introducen dos grupos funcionales reactivos (una maleimida y un éster NHS) en los dos extremos del enlazador hidrófilo, respectivamente.

- 5 En el esquema (9), se prepara un enlazador hidrófilo que posee un grupo sulfonamida. En el primer paso, el grupo amino necesario se crea mediante una simple reacción de sustitución nucleofílica. A continuación, se introduce el grupo sulfonamida en medio del enlazador hidrófilo al reaccionar con cloruro de mesilo. Luego, se introducen dos grupos funcionales reactivos (una maleimida y un éster NHS) en los dos extremos del enlazador hidrófilo, respectivamente.



Esquema 9

10

En el esquema (10), se prepara un enlazador hidrófilo que posee un grupo urea. En el primer paso, el grupo amino necesario se crea mediante una simple reacción de sustitución nucleofílica. A continuación, el grupo urea se introduce en medio del enlazador hidrófilo haciéndolo reaccionar con carbamato de 4-nitrofenil de bencilo, que se prepara a partir de bencilamina haciéndolo reaccionar con clorofomiato de 4-nitrofenilo. Luego, se introducen dos grupos funcionales reactivos (una maleimida y un éster NHS) en los dos extremos del enlazador hidrófilo, respectivamente.

15

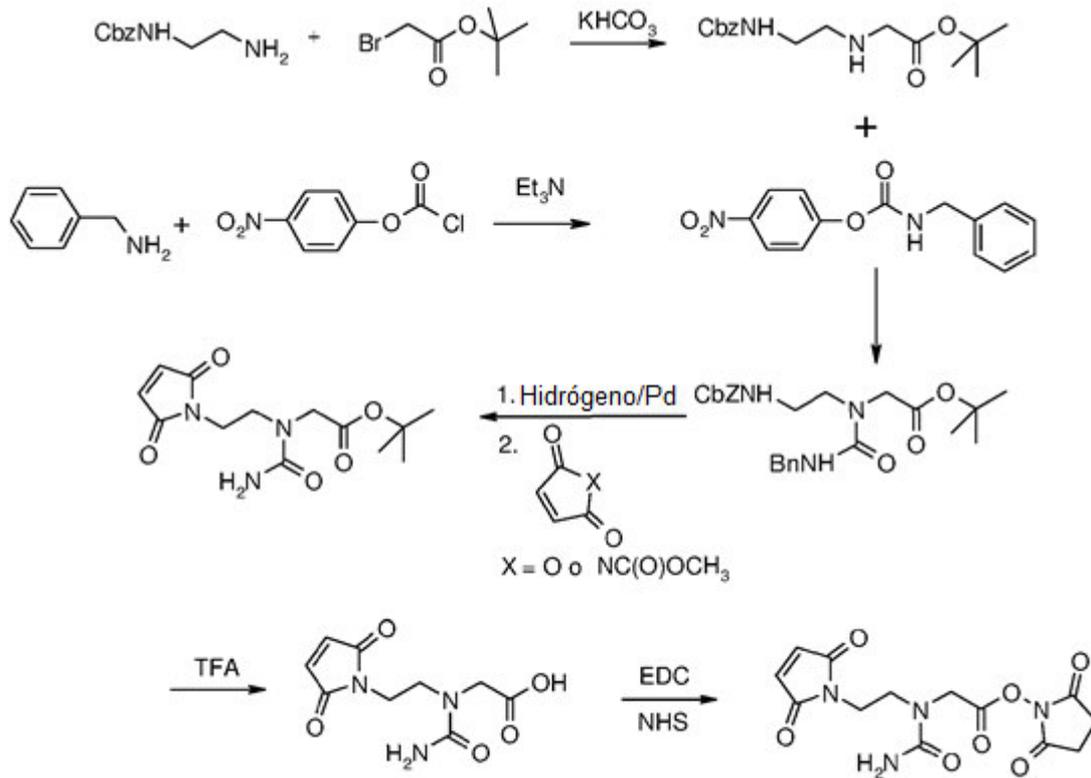
20

En el esquema (11), se prepara un enlazador hidrófilo que posee un grupo amino simple. En el primer paso, el grupo amino necesario se crea mediante una simple reacción de sustitución nucleofílica, seguida de aminación reductora con formaldehído o paraformaldehído. Luego, se introducen dos grupos funcionales reactivos (una maleimida y un éster NHS) en los dos extremos del enlazador hidrófilo, respectivamente.

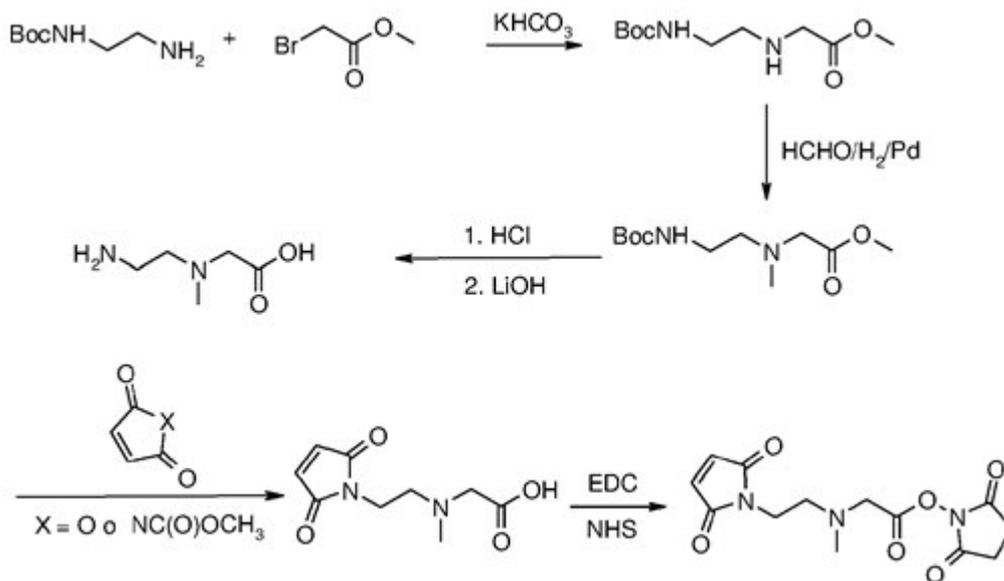
25

Estas realizaciones ejemplares se utilizan como ilustraciones de la divulgación. Estos esquemas sintéticos ejemplares no pretenden limitar los métodos sintéticos de los enlazadores hidrófilos. Los enlazadores hidrófilos de la presente divulgación también se pueden preparar mediante varios otros enfoques.

25



Esquema 10

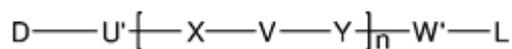


Esquema 11

5 **Conjugados ligando-fármaco**

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a nuevos conjugados ligando-fármaco. La presente divulgación proporciona conjugados ligando-fármaco que comprenden un ligando de unión a células que se une a una población celular particular, un fármaco citotóxico que es muy potente y un enlazador hidrófilo que conecta el ligando de unión a células y el fármaco citotóxico. Los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación tienen una eficacia y seguridad superiores que los conjugados ligando-fármaco que comprenden enlazadores no hidrófilos.

La Fórmula general de los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se muestra en la Fórmula (2):



Fórmula 2

5

donde:

D representa un fármaco citotóxico;

L representa un ligando de unión a células;

10 V representa un grupo polar o cargado; Los grupos polares o cargados adecuados que se pueden usar en la Fórmula (2) incluyen, pero no se limitan a, aminos [-N (R)-], ureas [-N (R<sub>1</sub>) CON (R<sub>2</sub>) - o -N(CONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) -], carboxilos [-Q (COOH) - o -Q(ZCOOH) -], carbamatos {[N (R) COO-] o [-N (COOR)-]}, guanidinas [-N (R<sub>1</sub>) C = N (COOR<sub>2</sub>) N (R<sub>3</sub>)-], sulfonamidas [-N (SO<sub>2</sub>R)-], sulfonas (-SO<sub>2</sub>-), sulfóxidos (-SO-), ácidos sulfónicos [-Q (ZSO<sub>2</sub>OH) -], ácidos sulfámicos [-N (SO<sub>2</sub>OH) -], fosfonatos {-Q [ZPO (OR)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfónicos {-Q [ZPO (OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosforamídicos {-N [PO(OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfordiamídicos {-N [PO (NH<sub>2</sub>) (OH)] -} y triamidas fosfóricas {-N [PO (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] -}, donde R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientes pendientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; Q es CH o N; Z es 1~5 unidades de metileno.

15 U' representa un grupo funcional que permite un enlace covalente con un fármaco citotóxico; Los grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un fármaco citotóxico incluyen, pero no se limitan a, tioles, disulfuros, aminos, carboxilos, aldehídos, cetonas, maleimidias, grupos haloacetilo, grupos alquenoilo, grupos alquinoilo, hidrazinas e hidroxilos. El enlace covalente con el fármaco citotóxico puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tioéster, un enlace amida, un enlace éster, un enlace carbono-nitrógeno, un enlace carbono-carbono, un enlace hidrazina, un enlace hidrazida, un enlace enlace hidrazona, enlace éter, enlace carbamato o enlace carbonato;

20 W' representa un grupo funcional que permite un enlace covalente con un ligando de unión a células, como un anticuerpo monoclonal. Los grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un ligando de unión a células incluyen principalmente dos tipos. El primer tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo amino en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-sulfosuccinimidilo, ésteres de nitrofenilo, ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorfenilo, ésteres de tetrafluorfenilo, cloruros de acilo, anhídridos, cloruros de sulfonilo, cloroformatos, isocianatos, aldehídos y cetonas. El enlace covalente puede ser un enlace amida, un enlace carbamato, un enlace urea u otros tipos de enlaces carbono-nitrógeno. El segundo tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo tiol en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, disulfuros tales como piridildisulfuros y nitropiridildisulfuros, maleimidias, cloruros de acilo, grupos haloacetilo tales como yodoacetamida y bromoacetamida, alquenilpiridinas, isocianatos e isotiocianatos. El enlace covalente puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tiocarbamato, un enlace ditiocarbamato o un enlace tioéster;

25 X representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

30 Y representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

35 n es un número entero de 1 a 100. Si n > 1, los valores de cada V, X e Y en los corchetes repetidos de la Fórmula (2) son independientes y no tienen que ser idénticos.

Preferiblemente, n es un número entero de 1 a 50. Incluso más preferiblemente, n es un número entero de 1 a 10. Lo más preferiblemente, n es un número entero de 1 a 4.

#### 45 El fármaco citotóxico

El resto de fármaco en el conjugado ligando-fármaco de la presente divulgación es un potente agente citotóxico para el propósito de la terapia del cáncer. Los fármacos citotóxicos incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antimicrotúbulos, inhibidores de la topoisómeras, antibióticos citotóxicos, intercaladores de ADN y cualquier otra molécula que sea altamente citotóxica y por tanto pueda conducir a la muerte celular. Los tipos ejemplares de fármacos citotóxicos incluyen las mostazas nitrogenadas, las antraciclina, los alcaloides de la vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los análogos de nucleósidos, las pteridinas, los diinenos (también denominados enediinos, biciclodienos o enediinos bicíclicos), las podofilotoxinas, las dolastatinas (incluidas las auristatinas), maitansinoides, tubulisinas, pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepinas (PBD) y taxanos. Los miembros ejemplares de estos tipos de fármacos citotóxicos incluyen mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo, ifosfamida, busulfán, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (MeCCNU), fotemustina, estreptozotocina, dacarbacins, mitozolomida, temozolomida, tiotepa, mitomicina, diaziquona (AZQ), cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, procarbazona, hexametilmelamina, nedaplatino, satraplatino, tetranitrato de triplatino, bendamustina, uramustina, análogos de purina, análogos de pirimidina, análogos de nucleósidos, análogos de nucleótidos, metotrexato, pemetrexo, raltitrexo, fluorouracil, capecitabina, citarabina, gemcitabina, decitabina, 5-azacitidina, fludarabina, nelarabina, cladribina, clofarabina, pentostatina, tioguanina, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, vinflunina, paclitaxel, docetaxel, dolastatinina A, dolastatinina B, dolastatina 10, dolastatina 13, dolastatina 14, dolastatina 15, dolastatina 16, dolastatina 17, dolastatina 18, auristatina E,

auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil auristatina E (MMAE), monometil auristatina F (MMAF), DM1, DM3, DM4, tubulinas, duocarmicinas, epotilonas, podofilotoxina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, irinotecán, topotecán, etopósido, mitoxantrona, tenipósido, merbarona, aclarubicina, novobiocina, plicamicina, lamellarina, elipticina, amsacrina, ácido aurintricarboxílico, bleomicina, mitomicina A, mitomicina C, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, pirarubicina, aclarrubicina, mitoxantrona, actinomicina, dactinomicina, arabinocida citocina, metopterina, diclorometotrexato, leurosina, leurosideína, caminomicina, aminopterina, tallisomicina, podofilotoxina, ácido butírico, camptotecina, caliqueamicina, cspcramicina, dincmicina, ncoarzinostatina (NCS), kcdarcidina, C1027 y análogos de los mismos.

El número medio de unidades de fármaco en cada molécula de conjugado de fármaco-anticuerpo es de 1 a 8, preferiblemente de 2 a 6.

Dependiendo de la necesidad sintética del conjugado ligando-fármaco, puede ser necesario modificar la estructura del resto de fármaco para que sea más fácil o más conveniente preparar el conjugado ligando-fármaco. Por ejemplo, un grupo funcional reactivo, como un grupo amino, hidroxilo, tiol o carboxilo, puede introducirse en la estructura del fármaco en una posición adecuada. Por supuesto, tal modificación debería tener un efecto perjudicial mínimo sobre la potencia y otras propiedades del fármaco original.

Algunos fármacos ya poseen grupos funcionales adecuados que pueden usarse para acoplarse al enlazador hidrófilo para la preparación de conjugados ligando-fármaco. Por ejemplo, los siguientes fármacos poseen un grupo amino inherente para dicho enlace: mitomicinas, dolastatinas (incluidas las auristatinas), daunorrubicina, doxorubicina, aminopterina, bleomicina, actinomicina, tallisomicina, 9-amino camptotecina y citarabina. Asimismo, los siguientes fármacos poseen un grupo hidroxilo inherente que puede usarse para acoplarse al enlazador hidrófilo para la preparación de conjugados ligando-fármaco: paclitaxel, etopósido, podofilotoxina, camptotecina, esperamicina, vinblastina, vincristina y doxorubicina; y los siguientes fármacos poseen un grupo tiol inherente o un grupo funcional que se puede transformar fácilmente en un grupo tiol para la preparación de conjugados ligando-fármaco: esperamicina, caliqueamicina, esperamicina y 6-mercaptopurina.

Preferiblemente, la potencia *in vitro* de los fármacos citotóxicos para su uso en conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación es mayor que la de los fármacos quimioterapéuticos tradicionales. Los fármacos citotóxicos son preferiblemente estables y adecuadamente solubles en medio acuoso.

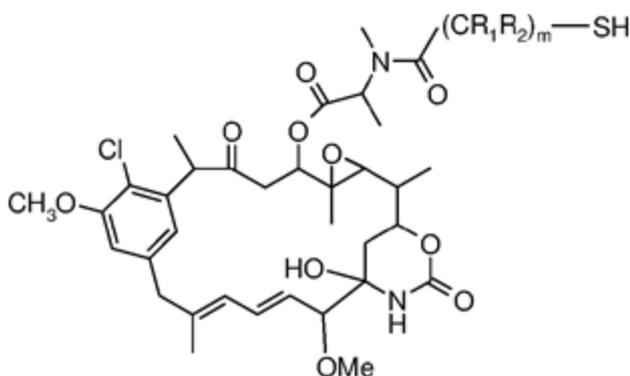
Más preferiblemente, los fármacos citotóxicos para su uso en los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación son maitansinoides, dolastatinas (en particular auristatinas), caliqueamicinas, tubulinas, mitomicinas, alcaloides de la vinca, antraciclinas, duocarmicinas y pirrolo [2, 1-c] [1,4] benzodiazepinas (PBD). Estos fármacos citotóxicos poseen alta potencia para su uso en conjugados ligando-fármaco tales como conjugados anticuerpo-fármaco de la presente divulgación.

Maitansinoides:

La maitansina se aisló por primera vez de la corteza del arbusto etíope *Maytenus ovatus* y es 100-1000 veces más citotóxica que los fármacos quimioterapéuticos convencionales. La maitansina y los maitansinoides se unen estrechamente a la tubulina e inhiben de forma potente la dinámica de los microtúbulos durante la mitosis. La fuerte inhibición finalmente conduce a la muerte celular por apoptosis.

Los maitansinoides preferidos se muestran en la Fórmula (3), donde  $R_1$  y  $R_2$  son independientemente H o alquilo C1-C8, m es 1, 2 o 3. El grupo tiol se usa para el acoplamiento covalente al enlazador hidrófilo, que a su vez se conecta a un ligando de unión a células, tal como un anticuerpo, en los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación. Los maitansinoides más preferidos incluyen DM1, DM3 y DM4.

Cuando se usan maitansinoides como fármacos citotóxicos para los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación, los enlazadores hidrófilos en los conjugados ligando-fármaco, tales como los conjugados anticuerpo-fármaco, son preferiblemente no escindibles. Después de unirse al antígeno en la superficie de las células tumorales y de internalizarse por endocitosis, la porción de anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco se degrada proteolíticamente en el lisosoma hasta que solo un residuo de aminoácido permanece conectado al enlazador hidrófilo. El aminoácido que permanece conectado al enlazador hidrófilo es el aminoácido que se utiliza como ancla del anticuerpo para conectarse al enlazador hidrófilo. Los aminoácidos más convenientes para anclar el enlace son la lisina y la cisteína. El catabolito de aminoácido-enlazador-maitansinoide, como el catabolito lisina-enlazador-maitansinoide o el catabolito cisteína-enlazador-maitansinoide, producido mediante degradación proteolítica se une a la tubulina en el citoplasma e induce la apoptosis. El catabolito de aminoácido-enlazador-maitansinoide también es muy resistente a MDR1, porque el enlazador hidrófilo y el aminoácido adjunto harán que todo el catabolito sea altamente hidrófilo.



Fórmula 3

Dolastatinas:

- 5 Las dolastatinas se descubrieron por primera vez en la liebre marina *Dolabella auricularia*. Las dolastatinas y sus análogos peptídicos son agentes antimetabólicos muy potentes que inhiben la unión de GTP dependiente de tubulina y la dinámica de los microtúbulos. Su alta potencia hace que las dolastatinas, incluidas las auristatinas, sean fármacos altamente eficaces para los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación.
- 10 Las dolastatinas preferidas para los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación incluyen monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF). Tanto MMAE como MMAF pueden unirse al enlazador hidrófilo a través del extremo N (amino) o del extremo C (carboxilo) del fármaco peptídico.

15 Cuando se usa MMAF como fármaco citotóxico para los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación, el enlazador hidrófilo en los conjugados ligando-fármaco, como los conjugados anticuerpo-fármaco, es preferiblemente no escindible. Después de internalizarse en las células tumorales, la porción de anticuerpo del ADC se degrada proteolíticamente para dar un catabolito que contiene MMAF, el enlazador hidrófilo y un aminoácido residual del anticuerpo. El aminoácido que permanece conectado al enlazador hidrófilo es el aminoácido que se utiliza como ancla del anticuerpo para conectarse al enlazador hidrófilo. Por ejemplo, si se usa cisteína como aminoácido de anclaje, el

20 catabolito de tres componentes será cisteína-enlazador-MMAF. El catabolito de tres componentes se une a la tubulina en el citoplasma para interrumpir la dinámica de los microtúbulos e inducir la apoptosis. El catabolito también es altamente resistente a MDR1, porque el enlazador hidrófilo y el aminoácido adjunto harán que todo el catabolito sea altamente hidrófilo.

## 25 El ligando de unión a células

El resto de ligando en el conjugado ligando-fármaco de la presente divulgación es una molécula de unión a células que se une selectivamente a las células cancerosas diana. Los ligandos de unión a células incluyen cualquier agente molecular que se una específicamente a receptores u otros antígenos en las células diana. El ligando de unión a células se acopla al resto enlazador del conjugado ligando-fármaco mediante el uso de un grupo funcional inherente o

30 introducido artificialmente, tal como grupos tiol, amino, aldehído o carboxilo. El ligando de unión celular actúa para administrar los fármacos citotóxicos ligados a las células tumorales. Después de unirse a las células diana, primero se internalizan los conjugados ligando-fármaco. Después de su fragmentación dentro de las células, los fármacos citotóxicos se liberan al citoplasma para matar las células tumorales. El ligando de unión a células puede ser cualquier proteína o molécula similar a una proteína que se una a, forme complejos con, o reaccione con un receptor o antígeno en la célula diana. Son aceptables tanto las proteínas inmunoglobulinas como las no inmunoglobulinas que se unen específicamente a receptores o antígenos diana en las células cancerosas. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, miméticos de anticuerpos, polipéptidos, ligandos peptídicos y ligandos no

35 peptídicos para los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación.

40 Específicamente, los ligandos de unión a células incluyen los siguientes agentes moleculares:

- (1). Anticuerpos resurgidos, quiméricos, humanizados y completamente humanos: Los anticuerpos, policlonales y en particular monoclonales, son excelentes ligandos de unión a células para los conjugados ligando-fármaco de la
- 45 presente divulgación. Los anticuerpos resurgidos, quiméricos, humanizados y completamente humanos son más preferidos porque es menos probable que causen inmunogenicidad en humanos. El anticuerpo para el conjugado anticuerpo-fármaco de la presente divulgación también puede ser un anticuerpo bifuncional que tiene un brazo que tiene especificidad por un sitio antigénico, mientras que el otro brazo reconoce una diana diferente. Alternativamente, cada brazo del anticuerpo bifuncional puede tener especificidad por un epítipo
- 50 diferente del mismo antígeno de la célula asociado al tumor. La especificidad dual permite que los conjugados

anticuerpo-fármaco posean más beneficios para el tratamiento terapéutico.

Los anticuerpos específicos que pueden usarse para los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo monoclonal anti-HER2 como trastuzumab y pertuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CD20 como rituximab, ofatumumab, tositumomab e ibritumomab, anticuerpo monoclonal anti-CA125 como oregovomab, anticuerpo monoclonal anti-EpCAM (17-1A) como edrecolomab, anticuerpo monoclonal anti-EGFR como cetuximab, panitumumab y nimotuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CD30 como brentuximab, anticuerpo monoclonal anti-CD33 como gemtuzumab y huMy9-6, anticuerpo monoclonal anti-integrina alfa-v beta-3 vascular como etaracizumab, anticuerpo monoclonal anti-CD52 como alemtuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CD22 como epratuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CEA como labetuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CD44v6 como bivatazumab, anticuerpo monoclonal anti-FAP como sibrotuzumab, anticuerpo monoclonal anti-CD19 como huB4, anticuerpo monoclonal anti-CanAg tal como huC242, anticuerpo monoclonal anti-CD56 como huN901, anticuerpo monoclonal anti-CD38 como daratumumab, anticuerpo monoclonal anti-CA6 como DS6, anticuerpo monoclonal anti-IGF-IR como cixutumumab y 3B7, anticuerpo monoclonal anti-integrina como CNTO 95 y anticuerpo monoclonal anti-sindecin-1 como B-B4.

(2). Fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos: El uso de fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos, en lugar de anticuerpos completos, ofrece la ventaja de una mayor penetración del tumor debido a su tamaño más pequeño. Además, los fragmentos de anticuerpos que se unen al antígeno se distribuyen más uniformemente por toda la masa tumoral en comparación con los anticuerpos completos.

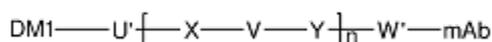
Los fragmentos de unión a antígeno que pueden usarse para los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, fragmento variable de cadena sencilla (sFv o scFv), anticuerpo de dominio único (sdAb), fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')<sub>2</sub> y otros tipos de fragmentos de inmunoglobulina que reconocen antígenos. Los fragmentos de inmunoglobulina se pueden preparar mediante varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante digestión con enzimas proteolíticas tales como pepsina o papaína, alquilación reductora o técnicas recombinantes.

(3). Proteínas y polipéptidos no inmunoactivos: Además de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, también puede usarse cualquier otro ligando que se una a un receptor celular o antígeno de superficie como ligando de unión a células para los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación. Estos ligandos incluyen, pero no se limitan a, interferones como IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , transferrinas, factores de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés) y dominios similares a EGF, péptidos liberadores de gastrina (GRP por sus siglas en inglés), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés), factores de crecimiento transformantes (TGF por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de vaccinia (VGF por sus siglas en inglés), insulina y factores de crecimiento similares a la insulina (IGF por sus siglas en inglés) como IGF-1 e IGF-2, otras hormonas adecuadas como las hormonas liberadoras de tirotrópina (TRH por sus siglas en inglés), hormonas estimulantes de los melanocitos (MSH por sus siglas en inglés), hormonas esteroides (por ejemplo, estrógenos y andrógenos) y somatostatina, linfoquinas como IL-2, IL-3, IL-4 e IL-6, factores estimulantes de colonias (CSF por sus siglas en inglés) como G-CSF, M-CSF y GM-CSF, bombesina, gastrina y ácido fólico.

Uno de los factores clave que determinan el resultado de un conjugado ligando-fármaco es el receptor celular o el antígeno de superficie que se selecciona como objetivo para el ligando de unión a células. Los receptores celulares y los antígenos de superficie a los que se unen los ligandos de unión celular incluyen, pero no se limitan a, antígenos asociados a tumores como HER2, HER3 y HER4, receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés), receptor del péptido liberador de astrina (GRPR por sus siglas en inglés), receptor de proteína morfogenética ósea 1 B (BMPR1B por sus siglas en inglés), receptor de folato, metaloreductasa STEAP1, proteína transportadora de fosfato dependiente de sodio 2B (Napi3b o SLC34A2), brevicán, receptores de efrina (Ephs por sus siglas en inglés) como EphB2R y receptores de EphA, antígeno de células madre de próstata (PSCA por sus siglas en inglés), factor de activación de células B del receptor de la familia TNF (BAFF-R por sus siglas en inglés), receptor de quimiocina C-X-C tipo 5 (CXC-R5, CD185 o BLR1), antígeno de histocompatibilidad HLA de clase II-cadena beta de DO (HLA-DOB), purinoceptor P2X 5 (P2X5 o P2RX5), receptores de transferrina (TfR), receptores de hormonas, receptor de hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRHR por sus siglas en inglés), molécula de adhesión de células epiteliales como LFA-1, Mac1, VLA-4, ICAM-1, VCAM y EpCAM, gangliósidos como GD3, tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3), antígenos de membrana específicos de próstata (PSMA por sus siglas en inglés), mucina 1 (MUC1), mucina 16 (MUC16 o CA-125), seis antígenos epiteliales de próstata transmembrana (STEAP por sus siglas en inglés), antígeno carcinoembrionario (CEA por sus siglas en inglés), factor de aceleración de la descomposición (DAF o CD55), receptores de folato como como receptor de folato 1 (FOLR1), mesotelina, proteína de la familia críptica 1B (Cripto), integrinas como alfavbeta6 y alfa4beta1 (VLA-4), factores de crecimiento como VEGF, receptores de VEGF (VEGFR), receptores de transferrinas, proteínas de transporte, receptores de autodirección, antígenos ligados a células endoteliales como endoglina, IGF-IR, CanAg y antígenos C242, y muchas moléculas de CD como CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD56, CD59, CD70, CD72, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, y CD152.

Los ligandos de unión a células preferidos de la presente divulgación son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos resurgidos, quiméricos, humanizados y completamente humanos son más preferidos porque es menos probable que causen inmunogenicidad en humanos.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco preferidos de la presente divulgación se muestran en las Fórmulas (4) y (5):



Fórmula 4



Fórmula 5

5

donde:

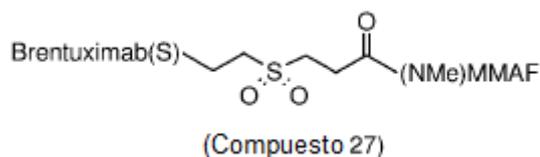
DM1 representa maitansinoide DM1; MMAF representa monometil auristatina F;  
 mAb representa un anticuerpo monoclonal de unión a células;  
 V representa un grupo polar o cargado; Los grupos polares o cargados adecuados que se pueden usar en las Fórmulas (4) y (5) incluyen, pero no se limitan a, aminos [-N (R) -], ureas [-N (R<sub>1</sub>)CON(R<sub>2</sub>)- o -N (CONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) -], carboxilos [-Q (COOH) - o -Q (ZCOOH) -], carbamatos [-N (R) COO-] o [-N (COOR) -], guanidinas [-N (R<sub>1</sub>) C=N(COOR<sub>2</sub>)N (R<sub>3</sub>) -], sulfonamidas [-N (SO<sub>2</sub>R) -], sulfonas (-SO<sub>2</sub>-), sulfóxidos (-SO-), ácidos sulfónicos [-Q (ZSO<sub>2</sub>OH) -], ácidos sulfámicos [-N (SO<sub>2</sub>OH) -], fosfonatos {-Q [ZPO(OR)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfónicos {-Q [ZPO (OH)] -}, ácidos fosforamídicos {-N [PO(OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosforodiamídicos {-N [PO(NH<sub>2</sub>) (OH)] -} y triamidas fosfóricas {-N [PO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] -}, donde R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente H o alquilo C1-C8; Q es CH o N; Z es 1~5 unidades de metileno.  
 U' representa un grupo funcional que permite un enlace covalente con el fármaco citotóxico; Los grupos funcionales que permiten un enlace covalente con el fármaco citotóxico incluyen, pero no se limitan a, tioles, disulfuros, aminos, carboxilos, aldehídos, cetonas, maleimidas, grupos haloacetilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, hidrazinas e hidroxilos. El enlace covalente con el fármaco citotóxico puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tioéster, un enlace amida, un enlace éster, un enlace carbono-nitrógeno, un enlace carbono-carbono, un enlace hidrazina, un enlace hidrazida, un enlace enlace hidrazona, enlace éter, enlace carbamato o enlace carbonato;  
 W' representa un grupo funcional que permite un enlace covalente con un ligando de unión a células, como un anticuerpo monoclonal. Los grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un ligando de unión a células incluyen principalmente dos tipos. El primer tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo amino en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-sulfosuccinimidilo, ésteres de nitrofenilo, ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, cloruros de acilo, anhídridos, cloruros de sulfonilo, cloroformatos, isocianatos, aldehídos y cetonas. El enlace covalente puede ser un enlace amida, un enlace carbamato, un enlace urea u otros tipos de enlaces carbono-nitrógeno. El segundo tipo de grupos funcionales permite un enlace covalente con un grupo tiol en el ligando de unión a células. Estos grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, disulfuros tales como piridildisulfuros y nitropiridildisulfuros, maleimidas, cloruros de acilo, grupos haloacetilo tales como yodoacetamida y bromoacetamida, alquenilpiridinas, isocianatos e isotiocianatos. El enlace covalente puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tiocarbamato, un enlace ditiocarbamato o un enlace tioéster;  
 X representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;  
 Y representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno. Las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;  
 n es un número entero de 1 a 100. Si n > 1, los valores de cada V, X e Y en los corchetes repetidos de las Fórmulas (4) y (5) son independientes y no tienen por qué ser idénticos.

40

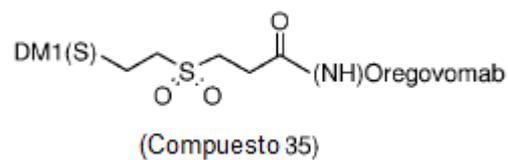
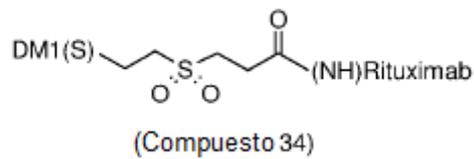
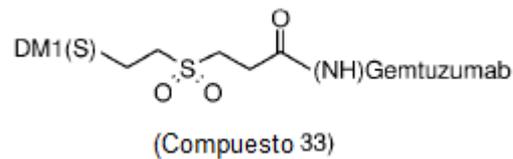
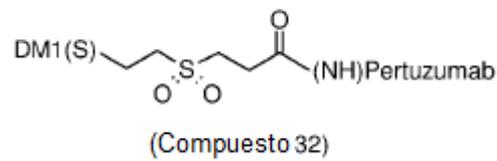
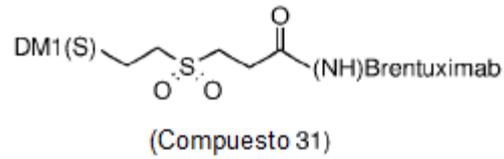
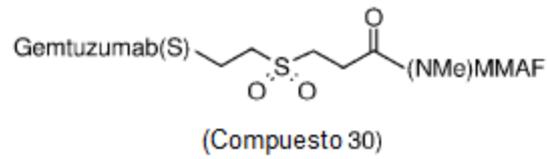
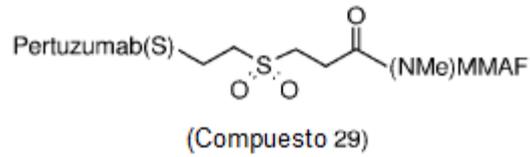
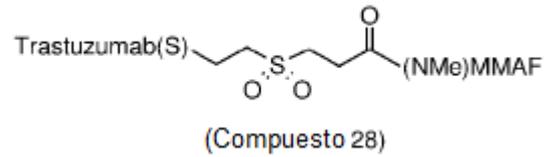
Preferiblemente, n es un número entero de 1 a 50. Incluso más preferiblemente, n es un número entero de 1 a 10. Lo más preferiblemente, n es un número entero de 1 a 4.

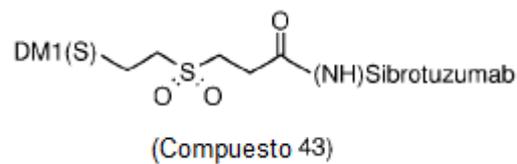
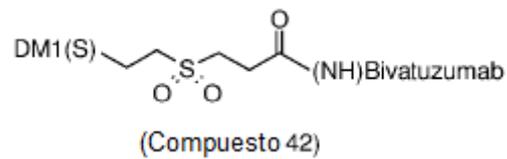
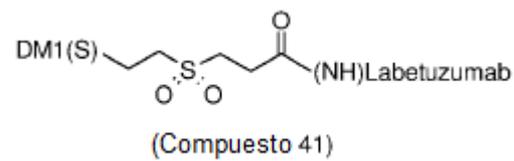
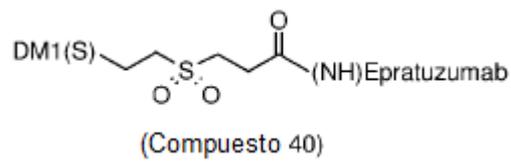
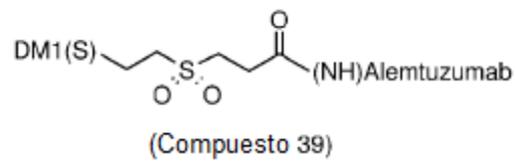
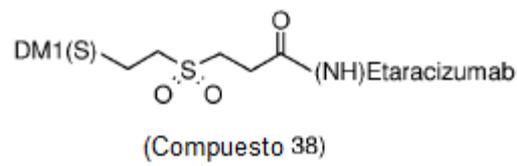
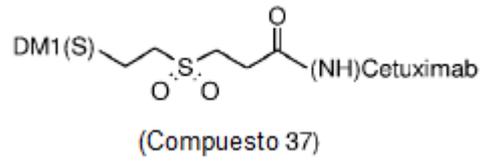
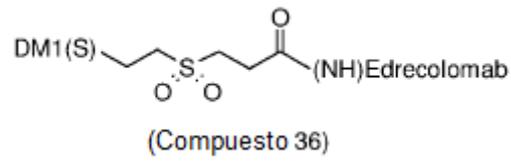
45

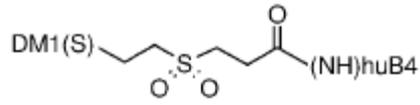
Como realizaciones ejemplares de la divulgación, algunos de los conjugados anticuerpo-fármaco de la presente divulgación se muestran en las estructuras siguientes [Compuesto (27) a (98)]:



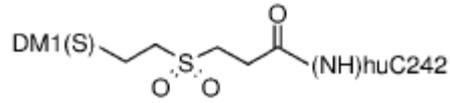
50



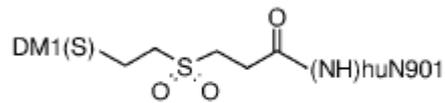




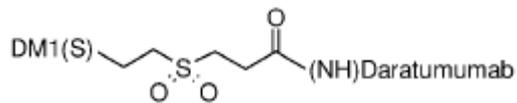
(Compuesto 44)



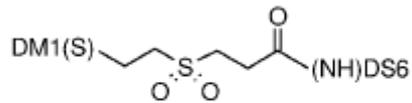
(Compuesto 45)



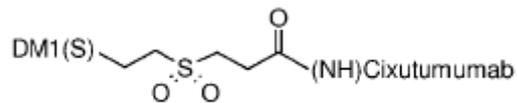
(Compuesto 46)



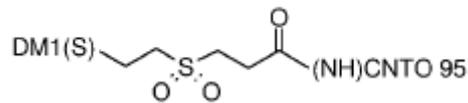
(Compuesto 47)



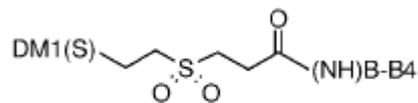
(Compuesto 48)



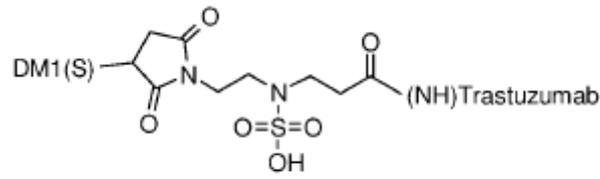
(Compuesto 49)



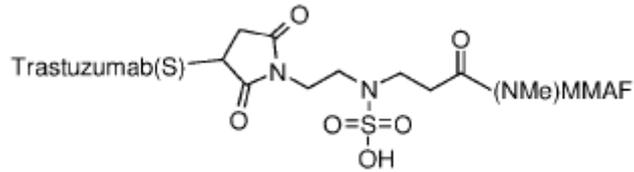
(Compuesto 50)



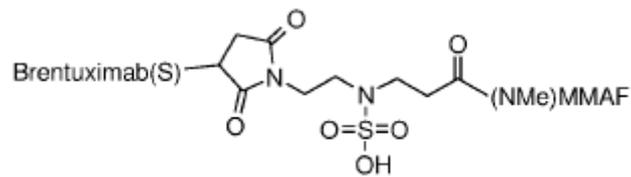
(Compuesto 51)



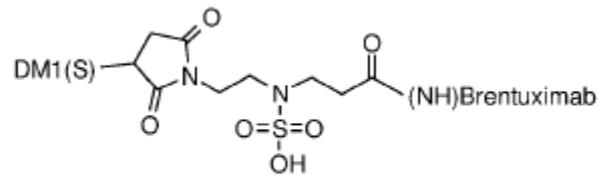
(Compuesto 52)



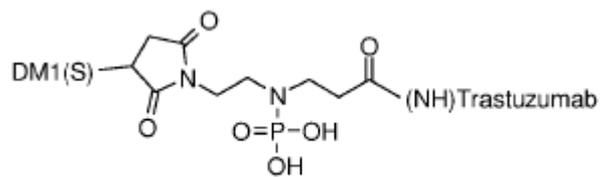
(Compuesto 53)



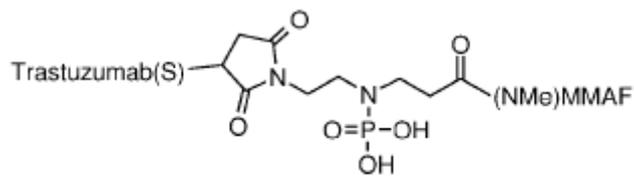
(Compuesto 54)



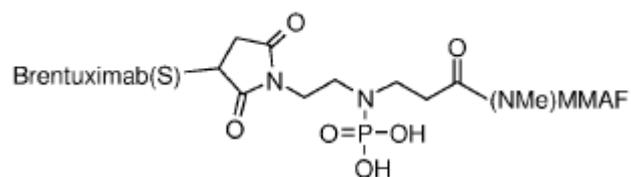
(Compuesto 55)



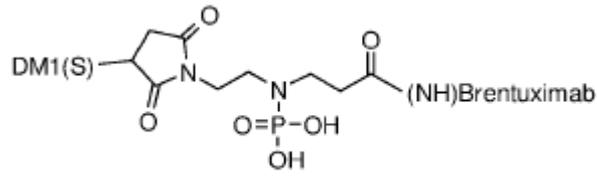
(Compuesto 56)



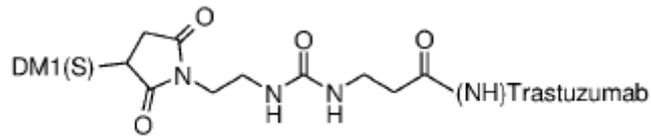
(Compuesto 57)



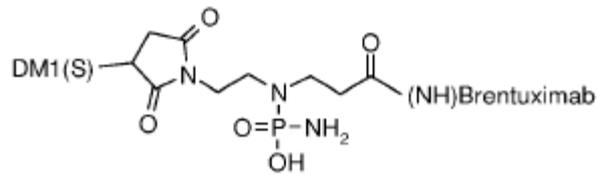
(Compuesto 58)



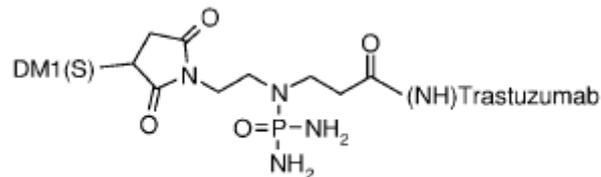
(Compuesto 59)



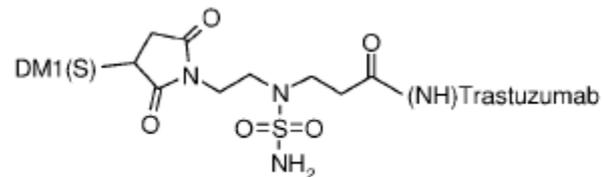
(Compuesto 60)



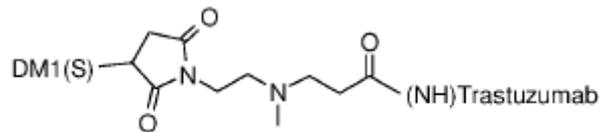
(Compuesto 61)



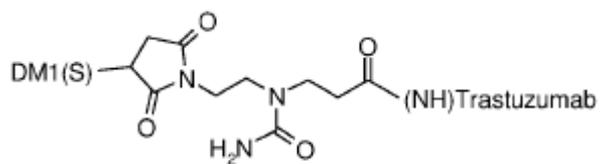
(Compuesto 62)



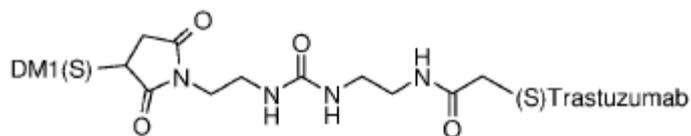
(Compuesto 63)



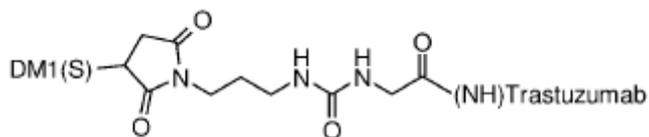
(Compuesto 64)



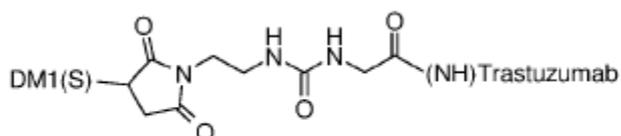
(Compuesto 65)



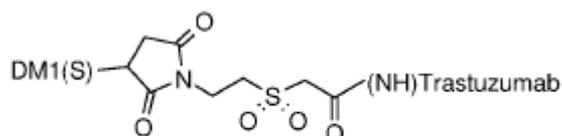
(Compuesto 66)



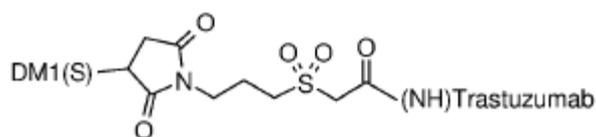
(Compuesto 67)



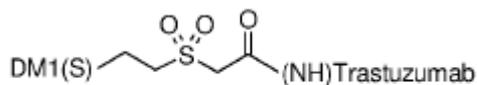
(Compuesto 68)



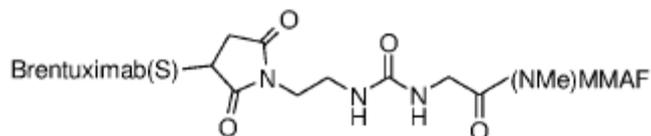
(Compuesto 69)



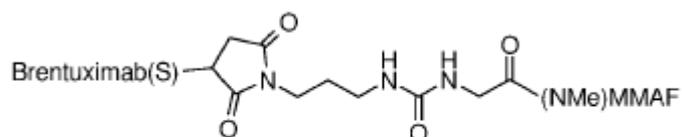
(Compuesto 70)



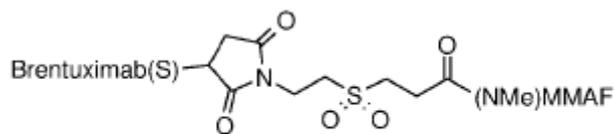
(Compuesto 71)



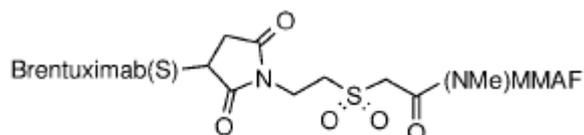
(Compuesto 72)



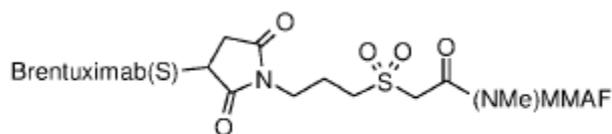
(Compuesto 73)



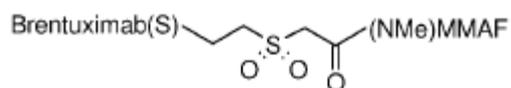
(Compuesto 74)



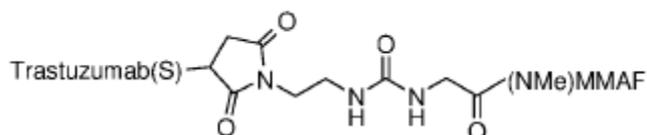
(Compuesto 75)



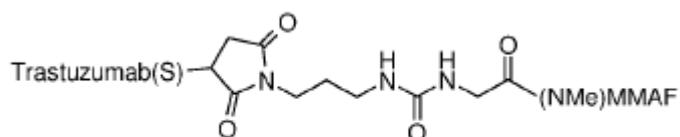
(Compuesto 76)



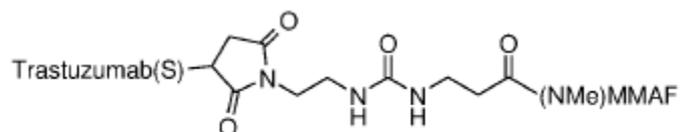
(Compuesto 77)



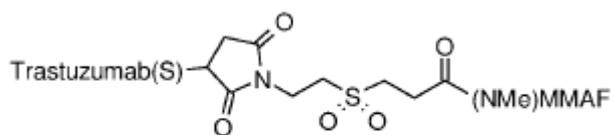
(Compuesto 78)



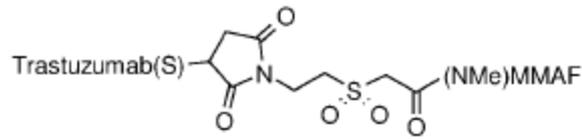
(Compuesto 79)



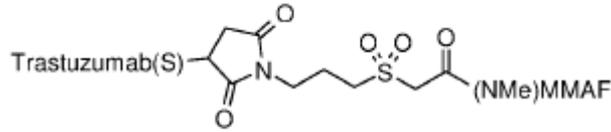
(Compuesto 80)



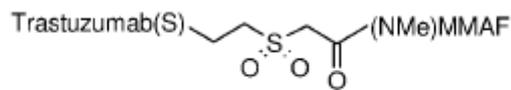
(Compuesto 81)



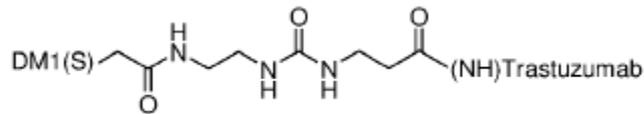
(Compuesto 82)



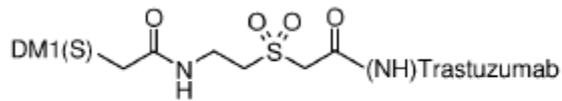
(Compuesto 83)



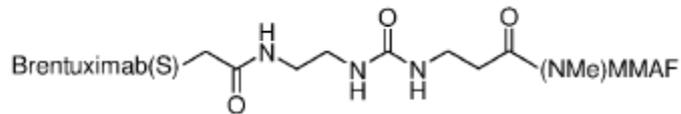
(Compuesto 84)



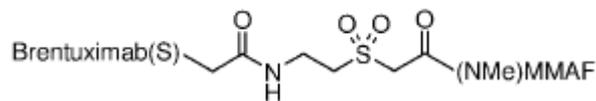
(Compuesto 85)



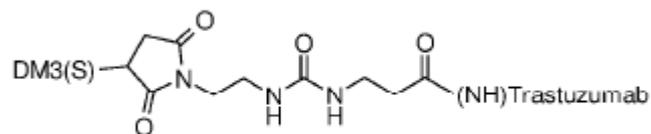
(Compuesto 86)



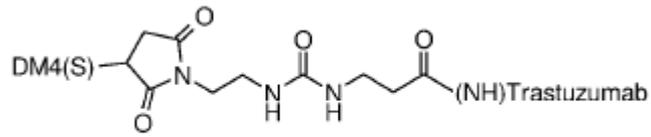
(Compuesto 87)



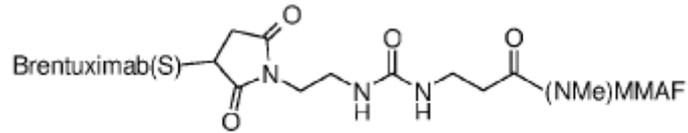
(Compuesto 88)



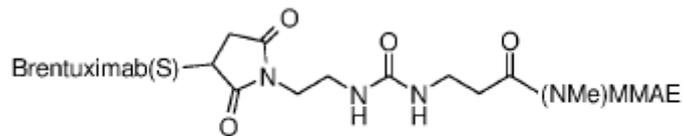
(Compuesto 89)



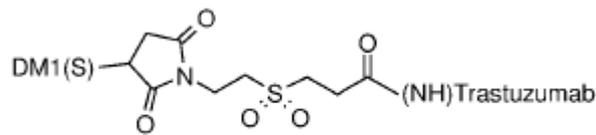
(Compuesto 90)



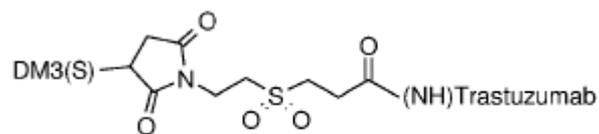
(Compuesto 91)



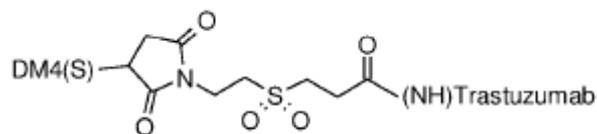
(Compuesto 92)



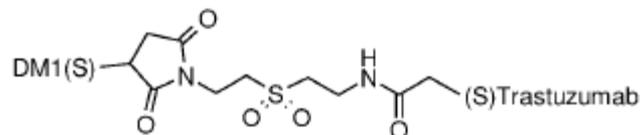
(Compuesto 93)



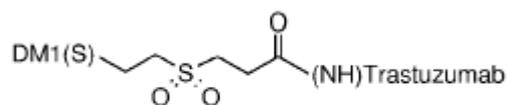
(Compuesto 94)



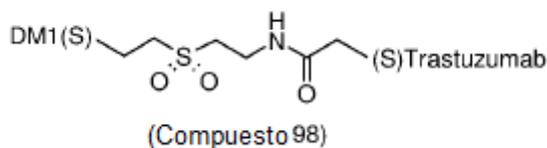
(Compuesto 95)



(Compuesto 96)



(Compuesto 97)



5 Los ejemplos de realizaciones anteriores se utilizan como ilustraciones de la divulgación. No debe entenderse que la presente divulgación se limita únicamente a los ejemplos ilustrados. La invención actualmente reclamada se define en y por las reivindicaciones adjuntas.

#### Preparación de los conjugados ligando-fármaco

10 Los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación se pueden preparar uniendo el resto de fármaco, el resto de enlazador hidrófilo y el resto de ligando usando diversas técnicas sintéticas. Entre todas las aplicaciones, es ventajoso preinstalar un grupo funcional reactivo adecuado en cada extremo del enlazador hidrófilo. Los grupos funcionales preinstalados en los dos extremos del enlazador hidrófilo se utilizan para el acoplamiento covalente al resto del fármaco y al resto del ligando de unión a células. Los grupos funcionales preinstalados harán que la preparación de los conjugados ligando-fármaco sea un proceso fácilmente alcanzable.

15 Por consiguiente, el conjugado ligando-fármaco de la presente divulgación puede construirse preparando primero el enlazador hidrófilo. En el segundo paso, el enlazador hidrófilo se acopla al fármaco citotóxico mediante un grupo funcional inherente o introducido en el fármaco, tal como un grupo amino o tiol, para dar un aducto de enlazador de fármaco. El aducto fármaco-enlazador se acopla luego al ligando de unión a células, como un anticuerpo que posee grupos funcionales adecuados, como los grupos amino en los residuos de lisina o los grupos tiol en los residuos de cisteína, para el acoplamiento covalente para dar el conjugado de ligando-fármaco deseado.

20 Alternativamente, el conjugado ligando-fármaco se puede preparar acoplando el enlazador hidrófilo al ligando de unión a células, tal como un anticuerpo que posee grupos funcionales adecuados, tales como los grupos amino en los residuos de lisina o los grupos tiol en los residuos de cisteína, para dar un aducto ligando-enlazador primero. A continuación, el aducto ligando-enlazador se acopla al fármaco citotóxico mediante un grupo funcional inherente o introducido, tal como un grupo amino o tiol en el fármaco, para dar el conjugado ligando-fármaco como producto final.

25 Los grupos funcionales útiles en el ligando de unión a células tales como un anticuerpo para acoplarse a un enlazador hidrófilo incluyen, pero no se limitan a, grupos tiol, amino, hidroxilo y carboxilo. Con el fin de utilizar un ligando de unión a células para la preparación de un conjugado ligando-fármaco, puede ser necesario modificar el ligando, tal como un anticuerpo, de modo que los grupos funcionales adecuados estén disponibles para acoplarse al enlazador hidrófilo. Por ejemplo, los anticuerpos generalmente no contienen tioles libres. Sin embargo, el grupo tiol puede generarse mediante la reducción de los enlaces disulfuro de cisteína intramoleculares nativos o grupos disulfuro incorporados químicamente (por ejemplo, SPDP puede usarse para incorporar grupos disulfuro) de un anticuerpo usando un agente reductor suave como DTT, derivando el grupo amino de un residuo de lisina utilizando 2-iminotiolano (reactivo de Traut), éster de metil 3-mercaptopropionimidato u otros reactivos generadores de tiol, o introduciendo residuos de cisteína no nativos adicionales en el anticuerpo utilizando técnicas de biología molecular.

30 Los grupos funcionales útiles en el ligando de unión a células tales como un anticuerpo para acoplarse a un enlazador hidrófilo también pueden ser un grupo aldehído, acetal o cetal en un residuo carbohidrato de un anticuerpo glicosilado. El residuo de carbohidrato puede oxidarse levemente usando un reactivo tal como peryodato de sodio para generar un grupo carbonilo, que puede acoplarse a un enlazador hidrófilo que contiene un grupo funcional adecuado, tal como amino, hidrazina, hidrazida, tiosemicarbazona o acilhidrazida.

35 Los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación en los que el enlazador hidrófilo y el ligando están unidos mediante un enlace tioéter pueden prepararse acoplando un grupo tiol en el ligando a un grupo reactivo con tiol (como haloacetamida, maleimida, grupo alquenil sulfonilo, o grupo disulfuro reactivo) en el enlazador hidrófilo. Por ejemplo, para la preparación de un conjugado anticuerpo-fármaco en el que se usa MMAF como fármaco citotóxico, un anticuerpo reducido con sus grupos tiol liberados puede reaccionar con un enlazador hidrófilo que contiene maleimida para formar un enlace tioéter entre el anticuerpo y el enlazador. En el siguiente paso, el aducto anticuerpo-enlazador, que puede poseer un éster de N-hidroxisuccinimida preinstalado, puede reaccionar con MMAF para dar el conjugado de anticuerpo-fármaco deseado.

40 Los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación en los que el enlazador hidrófilo se acopla al ligando mediante un grupo amida pueden prepararse acoplando un grupo amino libre en el ligando a un grupo carboxilo activado en el enlazador hidrófilo. Por ejemplo, un grupo carboxilo activado formando éster de N-hidroxisuccinimida puede reaccionar con un grupo amino libre en un residuo de lisina en la reacción de acoplamiento. El enlace formado entre el ligando y el enlazador a partir de entonces es un enlace amida.

60

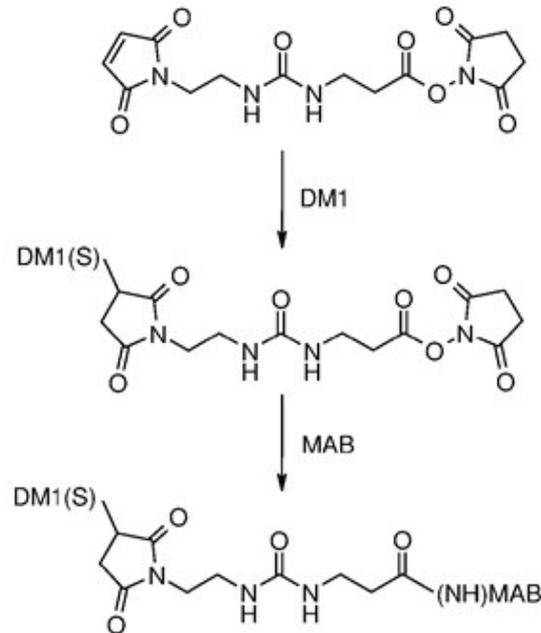
La ventaja de usar lisina o cisteína para la preparación del conjugado anticuerpo-fármaco es que es muy conveniente. Por supuesto, además de usar los grupos funcionales innatos, también se pueden usar grupos funcionales introducidos artificialmente para la preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco de la presente divulgación. Puede usarse cualquier método para introducir un grupo funcional útil en un sitio adecuado de un anticuerpo. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, la incorporación de un aminoácido no natural mediante ingeniería genética (p. ej., la incorporación de un aminoácido con un grupo carbonilo y el acoplamiento al enlazador a través del grupo carbonilo), la incorporación de residuos de glutamina modificados genéticamente y acoplamiento al enlazador mediante el uso de transglutaminasa microbiana (mTG), la modificación específica del sitio de los terminales C de la cadena pesada mediante fusión de inteína y la incorporación específica del sitio de cisteínas diseñadas.

En términos generales, después de que el ligando de unión a células, como un anticuerpo, se acopla covalentemente a un enlazador hidrófilo en posiciones adecuadas, como a través de los grupos amino en los residuos de lisina o los grupos tiol en los residuos de cisteína, se necesita una etapa de purificación (p. ej., diálisis o filtración en gel) para separar el aducto ligando-enlazador deseado de la porción sin reaccionar del enlazador hidrófilo. A continuación, después de que un fármaco citotóxico que posee un grupo funcional adecuado se acopla al aducto ligando-enlazador obtenido en el primer paso, un paso de purificación adicional (p. ej., diálisis, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica o combinaciones de los mismos) también pueden ser necesarios para eliminar la porción sin reaccionar del fármaco y los subproductos del conjugado anticuerpo-fármaco final.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los fármacos citotóxicos como DM1 y DM4, puede ser necesario llevar a cabo la conjugación con el ligando de unión a células como el anticuerpo en una mezcla de tampón acuoso y disolvente orgánico. El propósito es asegurar que el fármaco citotóxico permanezca en solución durante el proceso de conjugación. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen metanol, etanol, N, N-dimetilacetamida (DMA), N, N-dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DM-SO). La cantidad preferida de disolvente orgánico en el tampón acuoso es 0-30% (v / v). La conjugación se puede llevar a cabo a pH 5-9, más preferiblemente a pH 6-8. Los tampónes usados para la reacción de conjugación son tampónes con valores de pKa alrededor de este rango de pH. Se puede usar un gran exceso (5-50 veces) del resto de fármaco sobre el ligando de unión a células, como el anticuerpo, en la reacción de conjugación para obtener un conjugado con el número deseado de moléculas de fármaco en cada molécula de anticuerpo.

Un proceso ejemplar para preparar los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación en el que el ligando es un anticuerpo es el siguiente: Primero, un enlazador hidrófilo que posee tanto un grupo éster NHS como un grupo maleimida en los dos extremos se disuelve en N, N-dimetilacetamida (DMA) a aproximadamente 20 mM. A continuación, la solución de un anticuerpo (8 mg / ml) se trata con 5-50 equiv. del enlazador hidrófilo en un tampón de fosfato de sodio (pH = 6-8, DMA al 5% en volumen). Se deja que la reacción transcurra a temperatura ambiente durante 10 min a 24 h. La porción sin reaccionar del enlazador hidrófilo se elimina del anticuerpo mediante filtración en gel usando una columna Sephadex G25 equilibrada en tampón de fosfato de potasio 150 mM que contiene NaCl 100 mM. Para la reacción de conjugación, se disuelve un maitansinoide que contiene tiol, como DM1 o DM4, en DMA a aproximadamente 10 mM. A continuación, se añade lentamente el maitansinoide (1-2 equiv. del enlazador hidrófilo) al aducto anticuerpo-enlazador (2,5 mg / ml) en tampón de fosfato de sodio (pH = 6,5-7,0, DMA al 3% en volumen) con agitación. Se deja que la reacción transcurra a temperatura ambiente durante 2-12 h. El conjugado anticuerpo-fármaco formado se purifica usando una columna Sephadex G25 equilibrada con tampón de fosfato de sodio (pH = 6,5). El número de moléculas de maitansinoide incorporadas en cada molécula de anticuerpo se evalúa midiendo A252 y A280 del conjugado anticuerpo-fármaco (Zhao, et al., J. Med. Chem., 2011, 54, 3606-3623).

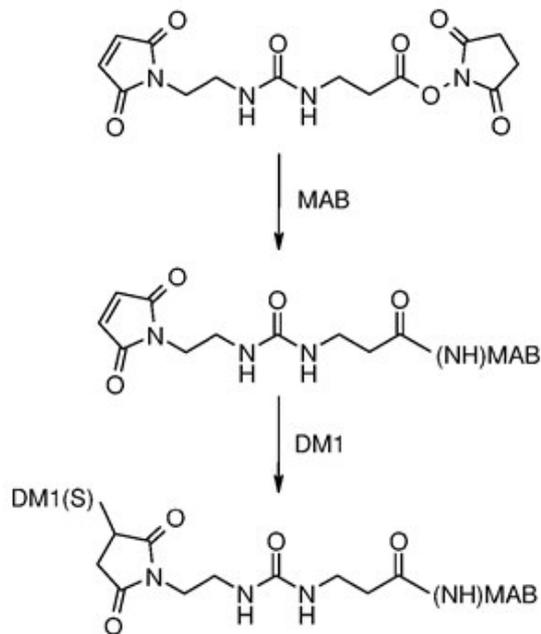
Un ejemplo de proceso de un paso para preparar los conjugados ligando-fármaco de la presente divulgación en el que el ligando es un anticuerpo es el siguiente: La solución de un enlazador hidrófilo (1,0 equiv.) que posee tanto un grupo éster NHS como un grupo maleimida en los dos extremos en N, N-dimetilacetamida (DMA) se agrega a un tampón PBS (pH = 6,0) que contiene un fármaco maitansinoide, como DM1 o DM4 (1,5 equiv.). La mezcla se incuba durante 45-120 min a 4-20 °C. Luego, se agrega un tampón PBS (pH = 7-8) que contiene un anticuerpo monoclonal (0,1-0,25 equiv.) al aducto de enlazador de fármaco. Después de incubar a temperatura ambiente durante 2-24 h, el conjugado anticuerpo-fármaco formado se purifica usando una columna Sephadex G25 equilibrada con PBS (pH = 6,5). El número de moléculas de maitansinoide incorporadas en cada molécula de anticuerpo se evalúa midiendo A252 y A280 del conjugado anticuerpo-fármaco.



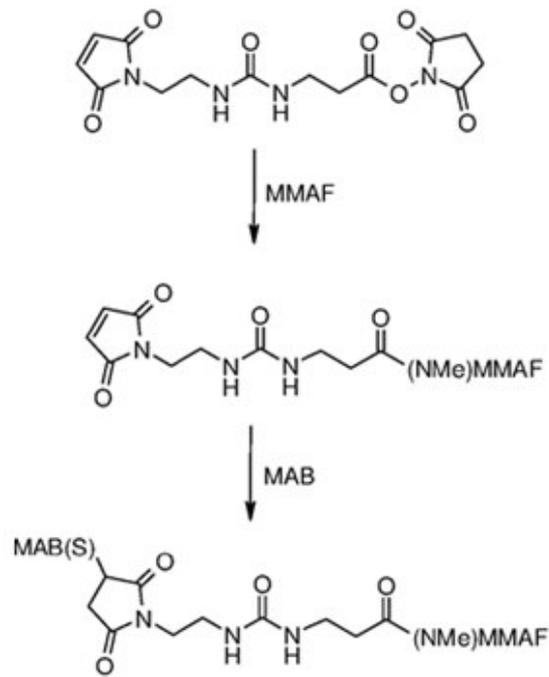
Esquema 12

5 Como una realización más específica de la presente divulgación, en el primer paso, un fármaco maitansinoide que contiene tiol (DM1) reacciona con un enlazador hidrófilo para dar un aducto fármaco-enlazador formando un enlace tioéter. A continuación, el aducto fármaco-enlazador reacciona con los grupos amino de residuos de lisina en un anticuerpo (MAB) para proporcionar un conjugado anticuerpo-fármaco como producto final (Esquema 12).

10 Alternativamente, el anticuerpo (MAB) puede reaccionar primero con el enlazador hidrófilo para dar un anticuerpo unido covalentemente al enlazador mediante un enlace amida. En el siguiente paso, el fármaco maitansinoide (DM1) reacciona con el grupo funcional maleimido en el otro extremo del conector hidrófilo para dar el mismo conjugado anticuerpo-fármaco (Esquema 13).



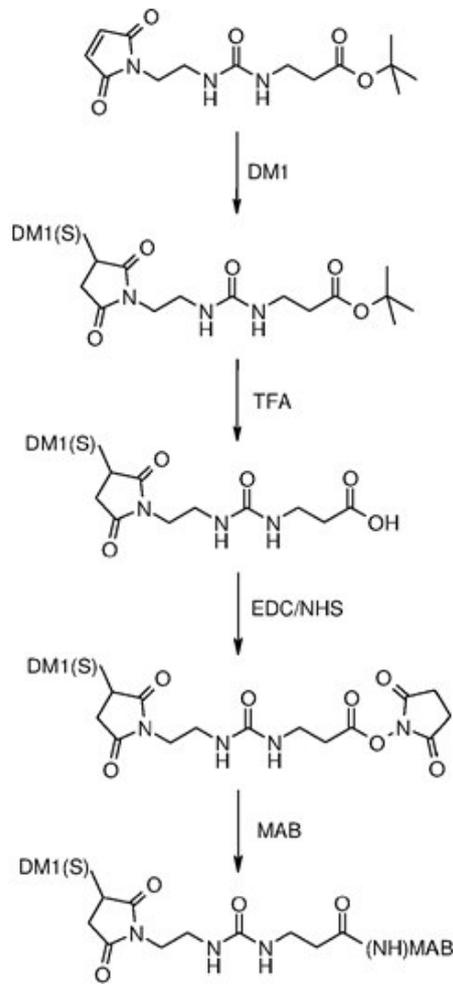
Esquema 13



Esquema 14

5 En otra realización de la presente divulgación (Esquema 14), se acopla un fármaco auristatina (MMAF) a un enlazador hidrófilo a través de un enlace amida en primer lugar. Luego, se conjuga un anticuerpo monoclonal (MAB) con el aducto fármaco-enlazador para dar un conjugado anticuerpo-fármaco como producto final.

10 En una realización alternativa de la presente divulgación (Esquema 15), un fármaco maitansinoide (DM1) reacciona primero con un enlazador hidrófilo semi-listo. Luego, después de introducir el grupo funcional necesario (éster NHS) en el otro extremo del enlazador hidrofílico, el aducto fármaco-enlazador se acopla a un anticuerpo monoclonal (MAB) a través de los grupos amino en los residuos de lisina del anticuerpo para dar el conjugado anticuerpo-fármaco como producto final.



Esquema 15

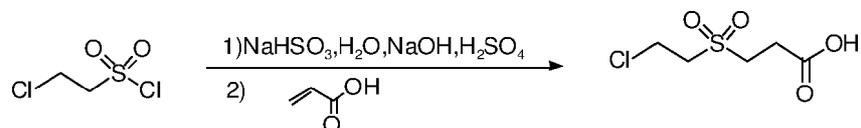
Un experto en la técnica se dará cuenta de que el mismo conjugado ligando-fármaco de la presente divulgación se puede sintetizar mediante muchos métodos diferentes. Por ejemplo, en lugar de utilizar directamente enlazadores hidrófilos que ya poseen uno o dos grupos funcionales adecuados para el propósito de reticulación, el enlazador hidrófilo también puede construirse paso a paso durante el proceso de conjugación, comenzando desde el fármaco citotóxico o el ligando de unión a células. O, el enlazador hidrófilo se puede construir paso a paso partiendo tanto del fármaco citotóxico como del ligando de unión a células. Después de unir las dos porciones en crecimiento del enlazador hidrófilo, también se completa la preparación del conjugado ligando-fármaco.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos, que son solo para ilustración detallada, no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

#### Ejemplo 1

Ácido 3-(2-cloro-etanosulfonil)-propiónico



Paso 1: Se colocó un matraz de fondo redondo de 2 L cargado con NaHSO<sub>3</sub> (83 g, 0,80 mol) y agua (400 ml) en un baño de hielo. Se añadieron lentamente cloruro de 2-cloroetanosulfonilo (120 g, 0,74 mol) y una solución de NaOH (83 g, 2,08 mol) en agua (210 ml) al mismo tiempo que se agitaba el contenido del matraz durante 1 h. Después de 0,5 h de

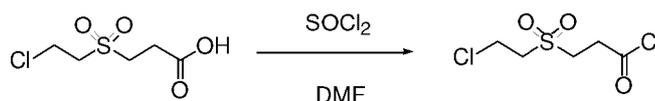
agitación, se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50% (70 ml, 0,37 mol).

La solución se agitó durante 1 h a 0~5 °C. Luego, la mezcla de reacción se filtró y el filtrado se utilizó en la siguiente etapa.

5 Paso 2: Se añadió una solución de ácido acrílico (55 g, 0,76 mol) en agua (100 ml) al filtrado anterior y la mezcla se agitó durante 10 min. Se colocó en un refrigerador durante 3 días a 4 °C. La mezcla se filtró y el sólido residual se recristalizó en agua caliente para dar un polvo blanco (50 g, 0,25 mol, 33,7% de rendimiento). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD): δ 3,96 (dd, J = 8,6, 5,4 Hz, 2H), 3,63 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 3,49 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,87-2,82 (m, 2H).

### 10 Ejemplo 2

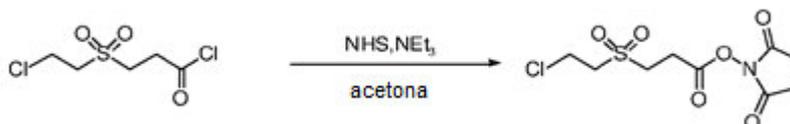
Cloruro de 3-(2-cloro-etanosulfonyl)-propionilo



15 A una solución de ácido 3-(2-cloroetilsulfonyl) propionilo (16,0 g, 80,0 mmol) en cloruro de tionilo (100 ml) se le añadió DMF (0,5 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 h. Luego, se concentró para producir el compuesto del título (15,8 g, rendimiento del 90,2%) como un sólido amarillo, que se usó sin purificación adicional.

### 20 Ejemplo 3

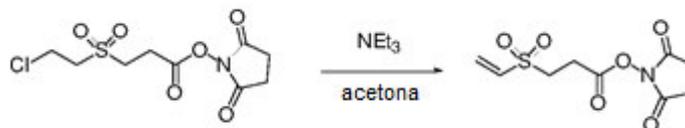
Éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido 3-(2-cloro-etanosulfonyl)-propiónico



25 Se añadió N-hidroxisuccinimida (6,0 g, 52,1 mmol) a trietilamina (5,5 ml, 44 mmol) y acetona (150 ml) en un baño de hielo. Después se añadió gota a gota cloruro de 3-(2-cloroetilsulfonyl) propionilo (9,5 g, 43,3 mmol) en acetona (50 ml) y la suspensión resultante se agitó durante 3 h. A continuación, se retiró el baño de hielo y se agitó durante 30 min más. Se concentró hasta aproximadamente 100 ml. La mezcla resultante se vertió en agua helada (1.000 ml) y se agitó durante 3 min. El precipitado se recogió por filtración y se secó al vacío para dar el compuesto del título en forma de un polvo blanco (10,3 g, rendimiento del 80%) RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD): δ 3,94 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 3,66 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 3,59 (d, J = 7,5 Hz, 2 H), 3,23 (d, J = 7,5 Hz, 2 H), 2,84 (s, 4 H).

### 30 Ejemplo 4

35 Éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido 3-etenosulfonyl-propiónico

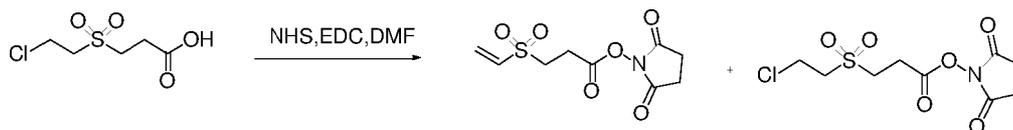


40 A una solución de éster de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido 3-(2-cloro-etanosulfonyl)-propiónico (2,41 g, 8,1 mmol) en acetona (50 ml) se le añadió trietilamina (1,5 ml, 10,8 mmol) en un baño de hielo. La mezcla de reacción resultante se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. A continuación, la mezcla se concentró a presión reducida,

45 el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH, 15: 1) para producir el compuesto del título (2,01 g, 7,69 mmol, rendimiento del 95,0%) en forma de un polvo blanco. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD): δ 6,86 (dd, J = 16,6, 10,0 Hz, 1H), 6,42 (d, J = 16,6 Hz, 1H), 6,28 (d, J = 9,9 Hz, 1H), 3,50 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 3,12 (t, J = 4,2 Hz, 2H), 2,84 (s, 4H). MS m/z+ para [C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>6</sub>S] (M+H) calculado: 262,03; encontrado: 262,0251.

### 50 Ejemplo 5

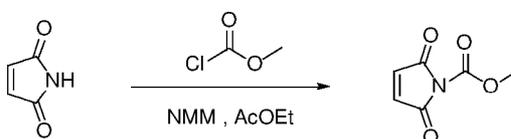
Éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido 3-etenosulfonyl-propiónico



A una solución de ácido 3- (2-cloroetilsulfonil) propionilo (3,59 g, 17,9 mmol) en DMF (50 ml) se le añadió N-hidroxisuccinimida (3,09 g, 26,8 mmol) y clorhidrato de 1-etil-3- (3-dimetilaminopropilo) carbodiimida (6,80 g, 35,8 mmol) en un baño de hielo. La solución resultante se calentó a temperatura ambiente durante 15 min. Después de agitar durante 3 h, la mezcla se concentró a presión reducida, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH = 15: 1) para producir éster de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido 3-etenosulfonil-propiónico (2,87 g, 11,0 mmol, rendimiento del 61,5%) como un polvo blanco. La reacción también proporcionó éster de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido 3- (2-cloro-etanosulfonil) -propiónico como un producto secundario (0,84 g, 2,82 mmol, rendimiento del 15,8%, véase el Ejemplo 3).

### Ejemplo 6

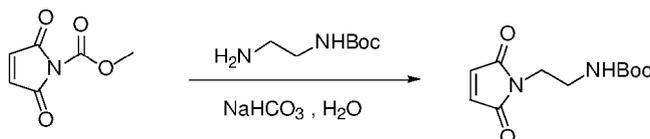
Éster metílico del ácido 2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-carboxílico



Se disolvió maleimida (12,0 g, 123,7 mmol) en acetato de etilo (150 ml) en un matraz de fondo redondo de 250 ml y la solución se enfrió a aproximadamente 0 °C. Se añadió gota a gota una solución de N-metilmorfolina (14,1 ml, 12,8 g, 126,2 mmol) en acetato de etilo (10 ml) durante 15 min. Se añadió gota a gota una solución de cloroformiato de metilo (9,60 ml, 11,5 g, 123,7 mmol) en acetato de etilo (50 ml) y la solución se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. La solución se diluyó con acetato de etilo (100 ml) y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, agua y una solución saturada de cloruro de sodio. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se filtró. El sobrenadante se concentró a presión reducida para producir el compuesto del título como un sólido (15,9 g, 102,5 mmol, rendimiento del 82,9%). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,84 (s, 2 H), 3,97 (s, 3 H).

### Ejemplo 7

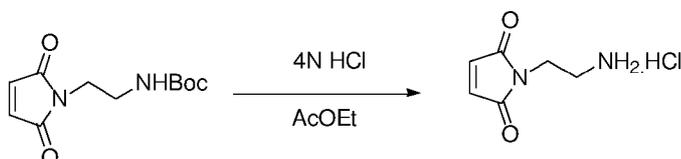
Éster terc-butílico del ácido [2- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -etil] -carbámico



Se disolvió N-Boc-etilendiamina (2,0 g, 12,48 mmol) en una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 ml) y se enfrió a 0 °C. Se añadió N- (metoxicarbonil) maleimida (1,9 g, 12,25 mmol) a la solución agitada. Después de 10 minutos, la mezcla de reacción se diluyó con agua (100 ml) y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y la mezcla de reacción se filtró y se lavó con agua helada (100 ml). El secado a alto vacío proporcionó el compuesto del título (2,35 g, 9,78 mmol, 78,4% de rendimiento) en forma de un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,71 (s, 2H), 4,72 (s, 1H), 3,69-3,62 (m, 2H), 3,34 (d, J = 5,1 Hz, 2H), 1,41 (s, 9H).

### Ejemplo 8

Clorhidrato de 1- (2-amino-etil) -pirrol-2,5-diona

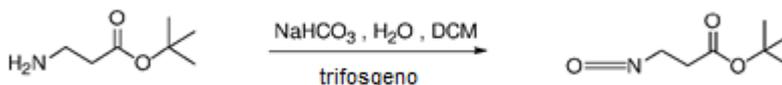


Se disolvió N- (2- ((terc-butoxicarbonil) amino) etil) maleimida (750 mg, 3,12 mmol) en HCl 4 M en acetato de etilo (20 ml) y se agitó durante 8 h a temperatura ambiente. Luego, la adición de éter dietílico a 0 °C proporcionó el compuesto del título como un precipitado blanco (524 mg, 2,97 mmol, rendimiento del 95,2 %). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD): δ 6,90

(s, 2H), 3,83-3,79 (m, 2H), 3,17-3,13 (m, 2H).

### Ejemplo 9

5 Éster terc-butílico del ácido 3-isocianato-propiónico

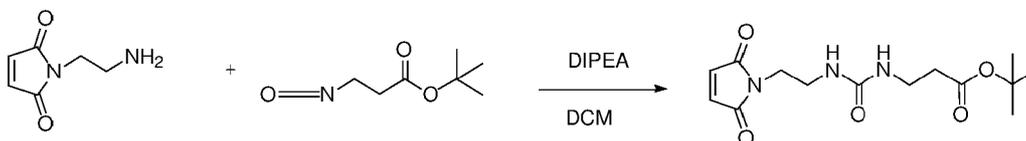


10 Se añadió trifosgeno (940 mg, 3,20 mmol) a una mezcla de hidrocloreto de éster de 1,1-dimetileto (820 mg, 4,50 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) y NaHCO<sub>3</sub> saturado (20 ml). La reacción se agitó a 0 °C durante 30 minutos. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 ml). La fase orgánica combinada se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró al vacío para dar un aceite fino que se usó sin purificación para la siguiente reacción.

### Ejemplo 10

15

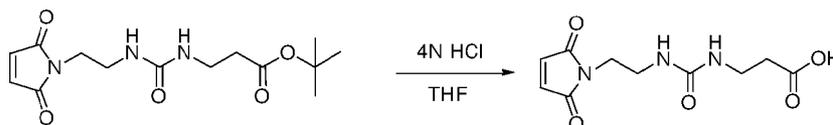
Éster terc-butílico del ácido 3- {3- [2- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -etil] -ureido} -propiónico



20 Se disolvió clorhidrato de N- (2-aminoetil) maleimida (635,7 mg, 3,60 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) y DIPEA (1,5 ml, 88,1 mmol) y la solución se enfrió a aproximadamente 0 °C. Se añadió una solución de éster de 3-isocianato-1,1-dimetileto (preparada en la etapa anterior) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml). La mezcla resultante se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se concentró al vacío. La purificación del residuo por cromatografía en columna (de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH = 15: 1) proporcionó el compuesto del título (910 mg, 2,93 mmol, rendimiento del 71,4%) en forma de un polvo blanco. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,71 (s, 2H), 3,68 - 3,64 (m, 2H), 3,41-3,38 (m, 2H), 3,37 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 2,42 (t, J = 5,7 Hz, 2H), 1,44 (s, 9 H). MS m/z+ para [C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>] (M+H) calculado: 312,33; encontrado: 312,1590.

### Ejemplo 11

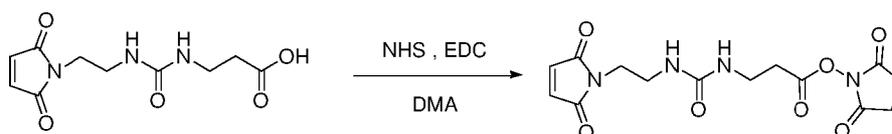
30 Ácido 3- {3- [2- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -etil] -ureido} -propiónico



35 Se disolvió éster terc-butílico del ácido 3- {3- [2- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -etil] -ureido} -propiónico (458 mg, 1,47 mmol) en HCl 4 M en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) y se agitó durante 8 h a temperatura ambiente. Después de que la mezcla se concentró al vacío, la adición de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0° C proporcionó el compuesto del título como un precipitado blanco (352 mg, 1,38 mmol, rendimiento del 93,9%), que se usó sin purificación para la siguiente reacción.

### Ejemplo 12

40 Éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido 3- {3- [2- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -etil] -ureido} -propiónico

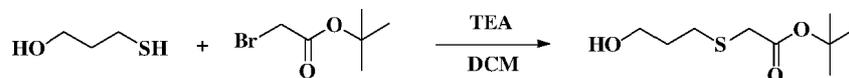


45 A N-[[[3-maleimido) etil] amino] carbonil-β-alanina (55 mg, 0,216 mmol) en DMA (5 ml) se le añadió N-hidroxisuccimida (25 mg, 0,217 mmol) y EDC (100 mg, 0,526 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / EtOAc = 9: 1) para producir el producto del título (69,7 mg, 198 μmol, 91,7% de rendimiento) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,70 (s, 2H), 3,64-3,59 (m, 2H), 3,53 (t, J = 5,8 Hz), 3,38 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 2,86 (s, 4H), 2,78 (t, J = 5,8 Hz, 2H). MS m/z+ para [C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>] (M+H) calculado: 353,30; encontrado: 353,1070.

**Ejemplo 13**

Éster terc-butílico del ácido (3-hidroxi-propilsulfanil) -acético

5



Se disolvieron bromoacetato de terc-butilo (3,0 g, 15,4 mmol) y trietilamina (3,2 g, 31,8 mol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml) bajo nitrógeno y se enfriaron a 0 °C. Se añadió lentamente 3-mercapto-1-etanol (1,48 g, 16,0 mol) a la mezcla y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 1 hora más. La finalización de la reacción se controló mediante TLC (acetato de etilo / hexano = 1: 1 (v / v), R<sub>f</sub> = 0,80). La solución se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (30 ml x 2), agua y una solución saturada de cloruro de sodio. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se filtró. El sobrenadante se concentró a presión reducida para producir el compuesto del título como un aceite incoloro (2,53 g, 79,8% de rendimiento). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 3,74 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,13 (s, 2H), 2,74 (t, J = 7,1 Hz, 2H), 1,87-1,82 (m, 2H), 1,45 (s, 9H).

10

15

**Ejemplo 14**

Éster terc-butílico del ácido (3-hidroxi-propano-1-sulfonil) -acético

20



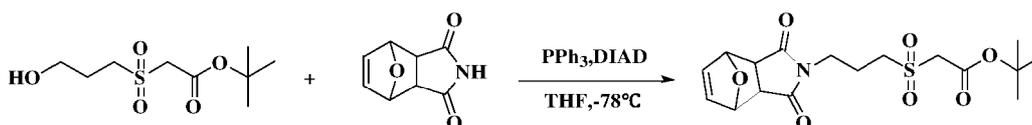
Se disolvió éster terc-butílico del ácido (3-hidroxi-propilsulfanil) -acético (3,70 g, 17,96 mmol) en DCM seco (70 ml) y se enfrió a -10 °C. A la mezcla de reacción agitada se le añadió mCPBA (7,4 g, 42,88 mmol) lentamente durante 30 minutos y la mezcla se agitó durante 48 h más a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 ml, sat.) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 ml, sat.) y la reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La solución se lavó con una solución de NaOH 1 M (30 ml x 2), una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y una solución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de la evaporación del disolvente, el material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (DCM / MeOH = 50: 1) para dar el compuesto del título como un aceite incoloro (3,85 g, rendimiento del 89,8%). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 3,84 (s, 2H), 3,61 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,30-3,23 (m, 2H), 1,99-1,90 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).

25

30

**Ejemplo 15**Éster terc-butílico del ácido [3- (3,5-dioxo-10-oxa-4-aza-triciclo [5.2.1.0<sup>2,6</sup>] dec-8-en-4-il) -propano-1-sulfonil] -acético

35



Una mezcla de trifetilfosfina (1,57 g, 6,0 mmol), 2,2-dimetilpropan-1-ol (0,3 g, 3,5 mmol), éster terc-butílico del ácido (3-hidroxi-propano-1-sulfonil) -acético (1,50 g, 6,3 mmol) y 7-oxabicyclo (2.2.1) hept-5-eno-2,3-dicarboximida (1,00 g, 5,7 mmol) se disolvió en THF (20 ml) a -78 °C bajo N<sub>2</sub>, y el resultado la mezcla se agitó durante 5 min. A la mezcla de reacción se le añadió DIAD (1,9 M en tolueno, 3,0 ml). Después de agitar durante 15 min, la mezcla de reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. Luego, la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / EtOAc = 10: 1) para producir el compuesto del título (1,03 g, 46,9% de rendimiento) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 6,47 (s, 2H), 5,22 (s, 2H), 3,83 (s, 2H), 3,60 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 3,23 - 3,18 (m, 2H), 2,84 (s, 2H), 2,14 - 2,07 (m, 2H), 1,46 (s, 9H).

40

45

**Ejemplo 16**

Éster terc-butílico del ácido [3- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -propano-1-sulfonil] -acético

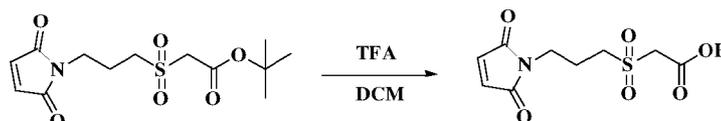
50



Una solución agitada de éster terc-butílico del ácido [3- (3,5-dioxo-10-oxa-4-aza-triciclo [5.2.1.0<sup>2,6</sup>] dec-8-en-4-il) -propano-1-sulfonil] -acético (0,50 g, 1,30 mmol) en tolueno (20 ml) se calentó a reflujo durante la noche. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (n-Hex / EtOAc = 10: 1) para proporcionar el producto deseado (0,38 g, 92,1% de rendimiento) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 6,73 (s, 2H), 3,85 (s, 2H), 3,69 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 3,29 - 3,24 (m, 2H), 2,84 (s, 2H), 2,20 - 2,14 (m, 2H), 1,49 (s, 9H).

### Ejemplo 17

Ácido [3- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -propano-1-sulfonil] -acético



Se disolvió éster terc-butílico del ácido [3- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -propano-1-sulfonil] -acético (0,35 g, 1,10 mmol) en TFA (5 ml) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) y se agitó durante 8 h a temperatura ambiente. Después de que la mezcla se concentrara al vacío, la adición de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0 °C proporcionó el compuesto del título como un precipitado blanco (0,27 g, 94,0% de rendimiento), que se usó sin purificación para la siguiente reacción. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 6,85 (s, 2H), 4,16 (s, 2H), 3,68 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 3,39 - 3,35 (m, 2H), 2,61 - 2,10 (m, 2H).

### Ejemplo 18

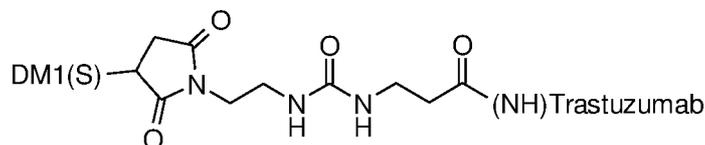
Éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido [3- (2,5-Dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -propano-1-sulfonil] -acético



A ácido [3- (2,5-Dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -propano-1-sulfonil] -acético (130 mg, 0,50 mmol) en DCM (5 ml) se le añadió N- hidroxisuccimida (69 mg, 0,60 mmol) y EDC (190 mg, 1,00 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH = 10: 1) para proporcionar el producto deseado (151 mg, 84,6% de rendimiento) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6,71 (s, 2H), 3,65 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,38 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 3,32 - 3,26 (m, 2H), 2,71 (s, 4H), 2,16 - 2,07 (m, 2 H).

### Ejemplo 19

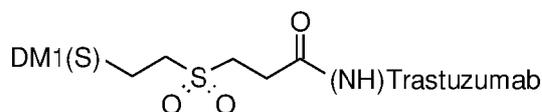
Un conjugado de anticuerpo-fármaco (DX-111)



Éster de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido 3-13- [2- (2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il) -etil] -ureido] -propiónico (Ejemplo 12) se disolvió en DMA (N, N-dimetilacetamida) a una concentración de aproximadamente 10 mM. El trastuzumab (Herceptina) se dializó en un tampón (Tampón A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5). Para acoplar el enlazador al anticuerpo, a una solución agitada del anticuerpo a 5 mg / ml se añadieron 7 equivalentes del enlazador en una concentración final de DMA al 5% (v / v). Se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 90 minutos. El enlazador sin reaccionar se eliminó mediante filtración en gel usando una columna Sephadex G25 equilibrada con Tampón A a pH 6,5. Luego, se añadió lentamente una solución 10 mM de DM1 en DMA (1,5 equiv. del enlazador hidrófilo) a una solución agitada del aducto anticuerpo-enlazador que estaba a una concentración de 2,5 mg / ml en Tampón A (pH 7,4) en una concentración final de 3% (v / v) de DMA. Se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 4 horas. El conjugado anticuerpo-fármaco formado se purificó mediante una columna Sephadex G25 equilibrada con PBS (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, NaCl 50 mM, pH 6,5). El número medio de fármacos en cada anticuerpo fue de 3,5, que se evaluó midiendo A254 y A280 del conjugado (Zhao, et al., J. Med. Chem., 2011, 54, 3606~3623).

**Ejemplo 20**

Un conjugado de anticuerpo-fármaco (DX-112)



5 Se disolvió éster de 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo del ácido 3-etenosulfonil-propiónico (Ejemplo 5) en DMA (N, N-dimetilacetamida) a una concentración de aproximadamente 10 mM. El trastuzumab (Herceptina) se dializó en un tampón (Tampón A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,5). Para acoplar el enlazador al anticuerpo, a una solución agitada del anticuerpo a 5 mg / ml se añadieron 7 equivalentes del enlazador en una concentración final de DMA al 5% (v / v). Se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 90 minutos. El enlazador sin reaccionar se eliminó mediante filtración en gel usando una columna Sephadex G25 equilibrada con tampón de fosfato de sodio 100 mM que contenía NaCl 100 mM, pH 7,4. Luego, se añadió lentamente una solución 10 mM de DM1 en DMA (1,5 equiv. del enlazador hidrófilo) a una solución agitada del aducto anticuerpo-enlazador que estaba a una concentración de 2,5 mg / ml en Tampón A (pH 7,4) en una concentración final de 3% (v / v) de DMA. Se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 4 horas. El conjugado anticuerpo-fármaco formado se purificó mediante una columna Sephadex G25 equilibrada con PBS (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, NaCl 50 mM, pH 6,5). El número medio de fármacos en cada anticuerpo fue de 2,0, que se evaluó midiendo A254 y A280 del conjugado (Zhao, et al., J. Med. Chem., 2011, 54, 3606~3623).

**Ejemplo 21**

Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Las líneas celulares utilizadas en los ensayos de citotoxicidad fueron HL-60, una línea celular de leucemia promielocítica humana; NCI-N87, una línea celular de carcinoma gástrico humano; BT-474, una línea celular de carcinoma ductal invasivo humano; y SKOV3, una línea celular de carcinoma de ovario humano. Para las células HL-60, NCI-N87 y BT-474, las células se cultivaron en RPMI-1640 con FBS al 10%. Para las células SKOV3, las células se cultivaron en medio 5A de McCoy con FBS al 10%. Para realizar el ensayo, se añadieron las células (180 ml, 6000 células) a cada pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas. A continuación, las células se trataron con compuestos de prueba (20 ml) a diversas concentraciones en medio de cultivo celular apropiado (volumen total, 0,2 ml). Los pocillos de control contienen células y el medio, pero carecen de los compuestos de prueba. Las placas se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 120 horas. A continuación, se añadió MTT (5 mg / ml) a los pocillos (20 ml) y las placas se incubaron a 37 °C durante 1,5 h. El medio se eliminó cuidadosamente y después se añadió DMSO (180 ml). Después de

Tabla 1 Ensayo de citotoxicidad *in vitro* IC50 (nM)

|        |       | T-DM1    | DX-111   | DX-112   |
|--------|-------|----------|----------|----------|
| Her2-  | HL-60 | > 10,000 | > 10,000 | > 10,000 |
| Her2++ | N87-3 | 0,89     | 0,78     | 0,82     |
| Her2++ | BT474 | 0,78     | 0,53     | 0,72     |
| Her2++ | SKOV3 | 0,20     | 0,20     | 0,16     |

agitarlo durante 15 min, la absorbancia se midió a 490 nm y 570 nm con un filtro de referencia de 620 nm. El % de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: % de inhibición = [1 - (blanco de ensayo) / (blanco de control)] X 100. Para DX-111, DX-112 y T-DM1, los resultados de los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se muestran en la Tabla 1.

**Ejemplo 22**

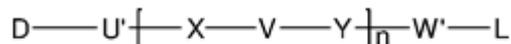
Ensayo *in vivo*:

El tumor de xenoinjerto objetivo positivo se estableció mediante inoculación subcutánea con células N87 originadas a partir de cáncer gástrico humano en ratones desnudos atímicos. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 125 mm<sup>3</sup>, los animales se agruparon aleatoriamente (n = 5) según el tamaño de su tumor. Se trataron cinco animales del grupo de control con PBS como vehículo de control. Los ratones de los grupos de prueba se trataron con ADC a una dosis de 5 mg / kg en una única inyección de bolo a través de la vena lateral de la cola. El volumen del tumor se tomó dos veces por semana y se calculó mediante la siguiente Fórmula: largo X ancho X alto X 1/2.

Para DX-111, DX-112 y T-DM1, los resultados del ensayo *in vivo* se muestran en la Figura 1.

## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado ligando-fármaco de Fórmula (2):



Fórmula 2

5

donde:

D representa un fármaco citotóxico;

10 L representa un ligando de unión a células;

V representa un grupo polar o cargado seleccionado del grupo que consiste en aminos [-N (R) -], ureas que son -N (CONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) -, carboxilos [-Q (COOH) - o -Q (ZCOOH) -], carbamatos que son -N (COOR) -, guanidinas [-N (R<sub>1</sub>) C = N (COOR<sub>2</sub>)N(R<sub>3</sub>) -], sulfonamidas [-N (SO<sub>2</sub>R) -], ácidos sulfónicos [-Q (ZSO<sub>2</sub>OH) -], ácidos sulfámicos [-N (SO<sub>2</sub>OH) -], fosfonatos {-Q [ZPO (OR)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfónicos {-Q [ZPO (OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosforamídicos {-N[PO (OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfordiamídicos {-N [PO (NH<sub>2</sub>)(OH)] -} y triamidas fosfóricas {-N [PO (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] -}, donde R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente H o alquilo C1-C8; Q es CH o N; Z es 1-5 unidades de metileno;

15

U' representa un grupo funcional que permite un enlace covalente con el fármaco citotóxico; el grupo funcional que permite un enlace covalente con el fármaco citotóxico seleccionado del grupo que consiste en tioles, disulfuros, aminos, carboxilos, aldehídos, cetonas, maleimidias, grupos haloacetilo, grupos alquenoilo, grupos alquinoilo, hidrazinas e hidroxilos, por lo que el enlace covalente con el fármaco citotóxico puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tioéster, un enlace amida, un enlace éster, un enlace carbono-nitrógeno, un enlace carbono-carbono, un enlace hidrazina, un enlace hidrazida, un enlace hidrazona, un enlace éter, enlace carbamato o enlace carbonato;

20

W' representa un grupo funcional que permite un enlace covalente con el ligando de unión a células L, donde dicho grupo funcional W' se selecciona de (a) grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un grupo amino en el ligando de unión a células, dichos grupos funcionales W' se seleccionan del grupo que consiste en ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-sulfosuccinimidilo, ésteres de nitrofenilo, ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, cloruros de acilo, anhídridos, cloruros de sulfonilo, cloroformiatos, isocianatos, isotiocianatos, aldehídos y cetonas, y (b) grupos funcionales que permiten un enlace covalente con el grupo tiol en el ligando de unión a células, dichos grupos funcionales W' se seleccionan entre disulfuros, por ejemplo piridildisulfuros y nitropiridildisulfuros; maleimidias; cloruros de acilo; grupos haloacetilo, por ejemplo yodoacetamida y bromoacetamida; alquencil piridinas; isocianatos; e isotiocianatos;

25

X representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno, donde las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

30

Y representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno, donde las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

35

n es un número entero de 1 a 100, donde si n > 1, los valores de cada V, X e Y en los corchetes repetidos de la Fórmula (2) son independientes y no tienen por qué ser idénticos.

40

2. El conjugado de la reivindicación 1, donde V se selecciona de dichas sulfonamidas, ácidos sulfónicos, ácidos sulfámicos, fosfonatos, ácidos fosfónicos, ácidos fosporamídicos, ácidos fosfordiamídicos y triamidas fosfóricas.

45

3. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ligando de unión a células es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena única, un fragmento de anticuerpo que se une selectivamente a una célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, un fragmento de anticuerpo monoclonal de cadena simple que se une selectivamente a una célula diana, un anticuerpo monoclonal resurgido, un anticuerpo monoclonal monocatenario resurgido, un fragmento de anticuerpo monoclonal resurgido que se une selectivamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo quimérico monocatenario, un fragmento de anticuerpo quimérico monocatenario que se une selectivamente a una célula diana, un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal monocatenario humanizado, un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado que se une selectivamente a una célula diana, un imitador de anticuerpo, una linfocina, una hormona o un factor de crecimiento.

50

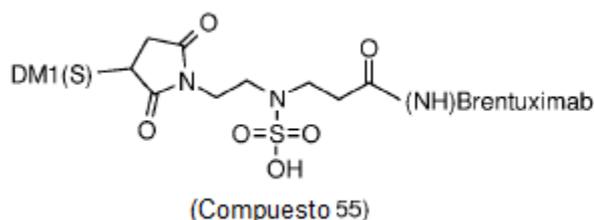
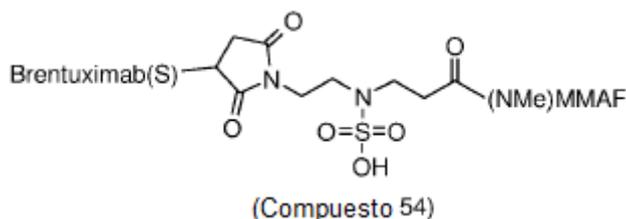
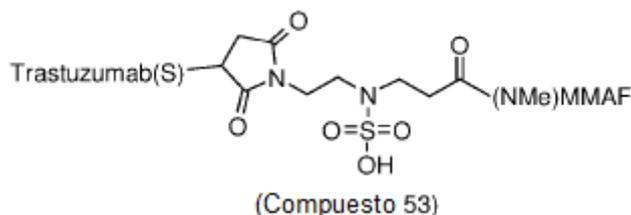
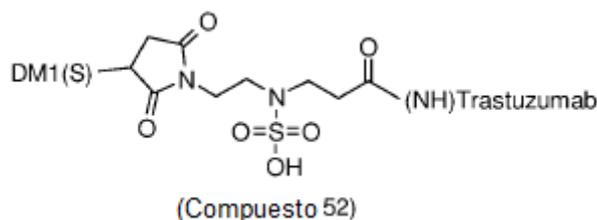
4. El conjugado de la reivindicación 3, donde el anticuerpo es trastuzumab, pertuzumab, rituximab, ofatumumab, tositumomab, ibritumomab, oregovomab, edrecolomab, cetuximab, panitumumab, nimotuzumab, brentuximab, gemtuzumab, huMy9-6, etaracizumab, alemtuzumab, epratuzumab, labetuzumab, bivatuzumab, sibrotuzumab, huB4, huC242, huN901, daratumumab, DS6, cixutumumab, 3B7, CNTO 95 o B-B4.

55

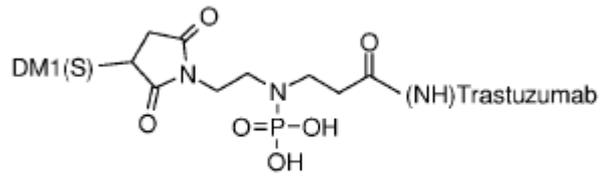
5. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ligando de unión a células se une a células tumorales que expresan antígenos asociados a tumores, receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor de péptido liberador de astrina (GRPR), receptor de proteína morfogenética ósea 1 B (BMPR1B), receptor de folato, metaloreductasa STEAP1, proteína transportadora de fosfato dependiente de sodio 2B (Napi3b o SLC34A2), brevicin, receptores de efrina (Ephs), antígeno de células madre de próstata (PSCA), factor de activación de células B del receptor de la familia TNF (BAFF-R), Receptor de quimiocina C-X-C tipo 5 (CXC-R5, CD185 o BLR1), antígeno de

60

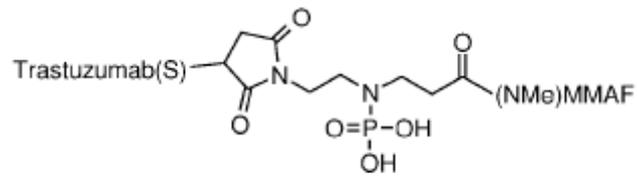
- 5 histocompatibilidad HLA de clase II-cadena beta DO (HLA-DOB), purinoceptor P2X 5 (P2X5 o P2RX5), receptores de transferrina (TfR), receptores de hormonas, receptor de la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRHR), moléculas de adhesión de células epiteliales, gangliósidos, tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), mucina 1 (MUC1), mucina 16 (MUC16 o CA- 125), seis antígenos epiteliales
- 10 6. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fármaco citotóxico es un maitansinoide, una dolastatina, una auristatina, una caliqueamicina, una tubulisina, una mitomicina, una actinomicina, una camptotecina, un alcaloide de la vinca, una antraciclina, una duocarmicina o una pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepina (PBD).
- 15 7. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el fármaco citotóxico es DM1, DM4 o MMAF.
8. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde V es -N (CH<sub>2</sub>COOH) -, -N(SO<sub>2</sub>OH) - o -N [PO(OH)<sub>2</sub>] -.
- 20 9. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde n es un número entero de 1 a 50, por ejemplo, n es un número entero de 1 a 10.
10. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde n es 1.
- 25 11. El conjugado de la reivindicación 1 que se muestra a continuación:



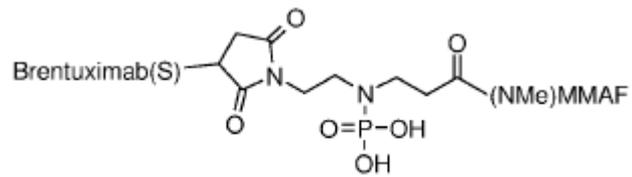
30



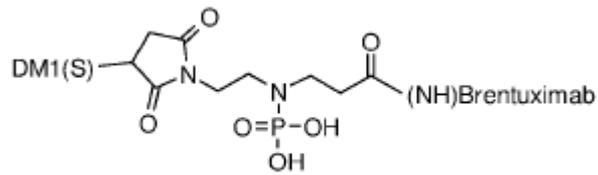
(Compuesto 56)



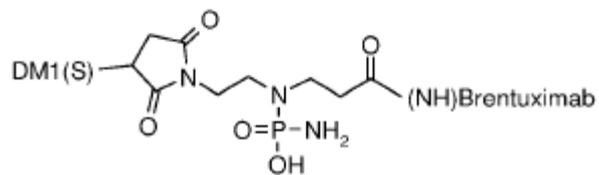
(Compuesto 57)



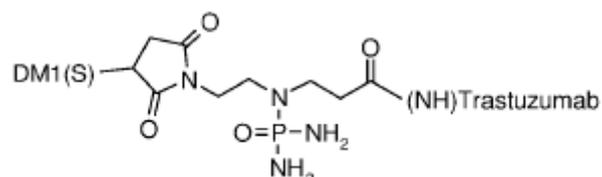
(Compuesto 58)



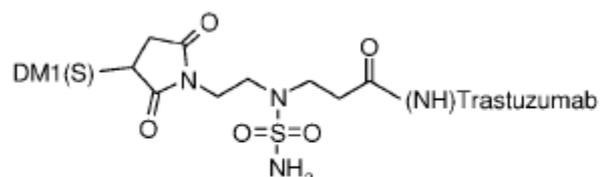
(Compuesto 59)



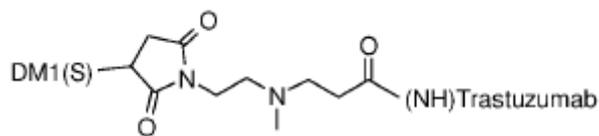
(Compuesto 61)



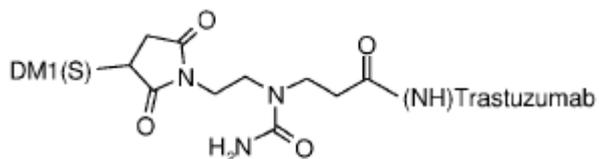
(Compuesto 62)



(Compuesto 63)

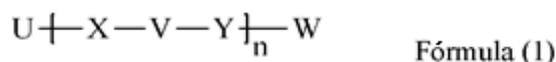


(Compuesto 64)



(Compuesto 65)

- 5 12. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en terapia.
13. El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el uso es en el tratamiento de un tumor.
- 10 14. Un método para preparar el conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el método comprende acoplar covalentemente el fármaco citotóxico D y el ligando de unión a células L a un enlazador hidrófilo de Fórmula (1):



15 donde:

V representa un grupo polar o cargado seleccionado del grupo que consiste en aminos [-N (R) -], ureas que son -N (CONR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>) -, carboxilos [-Q (COOH) - o -Q (ZCOOH) -], carbamatos que son -N (COOR) -, guanidinas [-N (R<sub>1</sub>) C = N (COOR<sub>2</sub>)N(R<sub>3</sub>) -], sulfonamidas [-N (SO<sub>2</sub>R) -], ácidos sulfónicos [-Q (ZSO<sub>2</sub>OH) -], ácidos sulfámicos [-N (SO<sub>2</sub>OH) -], fosfonatos {-Q [ZPO (OR)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfónicos {-Q [ZPO (OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosoramídicos {-N [PO (OH)<sub>2</sub>] -}, ácidos fosfordiamídicos {-N [PO (NH<sub>2</sub>)(OH)] -} y triamidas fosfóricas {-N [PO (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] -}, donde R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son independientemente H o alquilo C1-C8; Q es CH o N; Z es 1-5 unidades de metileno;

U representa un grupo funcional reactivo que permite un enlace covalente con un fármaco citotóxico; el grupo funcional reactivo que permite un enlace covalente con un fármaco citotóxico se selecciona del grupo que consiste en tioles, disulfuros, aminos, carboxilos, aldehídos, cetonas, maleimidias, grupos haloacetilo, grupos alquenoilo, grupos alquinilo, hidrazinas e hidroxilos, por lo que el enlace covalente con el fármaco citotóxico puede ser un enlace disulfuro, un enlace tioéter, un enlace tioéster, un enlace amida, un enlace éster, un enlace carbono-nitrógeno, un enlace carbono-carbono, un enlace hidrazina, un enlace hidrazida, un enlace hidrazona, enlace éter, enlace carbamato o enlace carbonato;

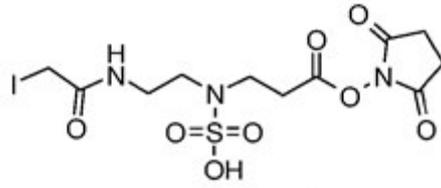
W representa un grupo funcional reactivo que permite un enlace covalente con el ligando de unión celular L, donde dicho grupo funcional reactivo W se selecciona de (a) grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un grupo amino en el ligando de unión celular, dichos grupos funcionales W se seleccionan del grupo que consiste en ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-sulfosuccinimidilo, ésteres de nitrofenilo, ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, cloruros de acilo, anhídridos, cloruros de sulfonilo, cloroformiatos, isocianatos, isotiocianatos, aldehídos y cetonas, y (b) grupos funcionales que permiten un enlace covalente con un grupo tiol en el ligando de unión a células, dichos grupos funcionales W se seleccionan entre disulfuros, por ejemplo piridildisulfuros y nitropiridildisulfuros; maleimidias; cloruros de acilo; grupos haloacetilo, por ejemplo yodoacetamida y bromoacetamida; alquencil piridinas; isocianatos; e isotiocianatos;

X representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno, donde las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

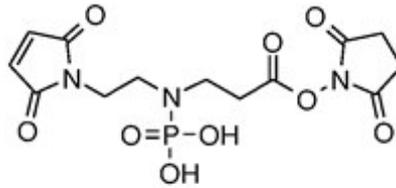
Y representa un componente compuesto por una, dos o tres unidades de metileno, donde las unidades de metileno pueden estar opcionalmente sustituidas con grupos alquilo, halo, hidroxilo o alcoxi;

n es un número entero de 1 a 100, donde si n > 1, los valores de cada V, X e Y en los corchetes repetidos de la Fórmula (1) son independientes y no tienen que ser idénticos.

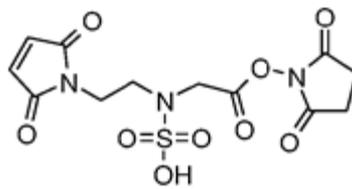
- 45 15. El método de la reivindicación 14, donde el enlazador hidrófilo se muestra a continuación:



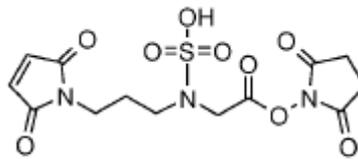
(Compuesto 10)



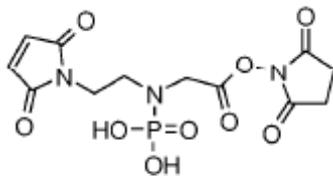
(Compuesto 11)



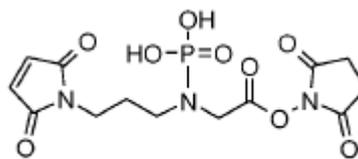
(Compuesto 16)



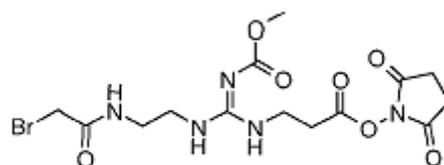
(Compuesto 17)



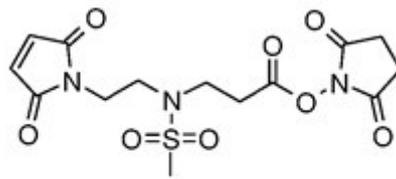
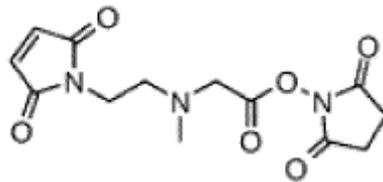
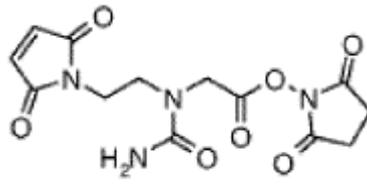
(Compuesto 18)



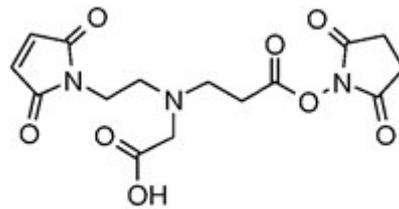
(Compuesto 19)



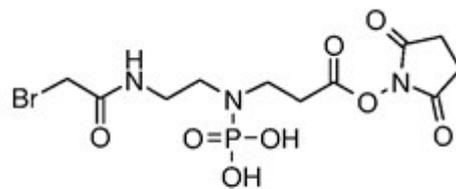
(Compuesto 26)



(Compuesto 6)



(Compuesto 9)



(Compuesto 12)

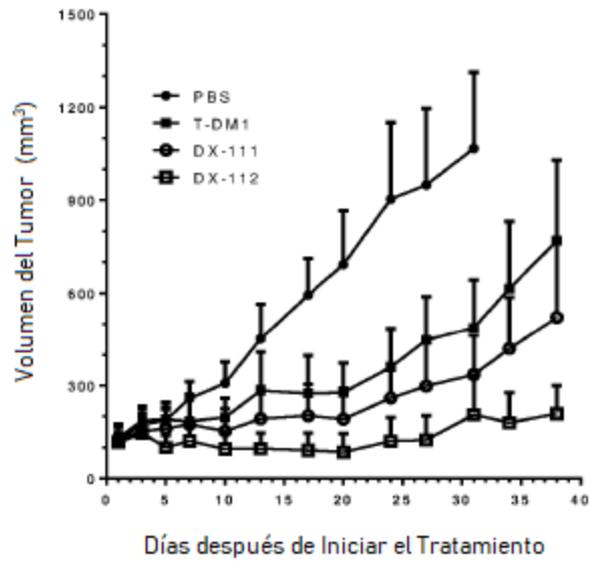


Figura 1