

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 814 798**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 403/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/US2012/039312**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12162482**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12724065 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2021 EP 2714092**

54 Título: **Inmunocombinados, composiciones que los contienen y métodos de fabricación y uso**

30 Prioridad:

26.05.2011 US 201161490117 P

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

29.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ZHANG, QIAN;
GANGWAR, SANJEEV;
PAN, CHIN y
DERWIN, DANIEL W.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 814 798 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

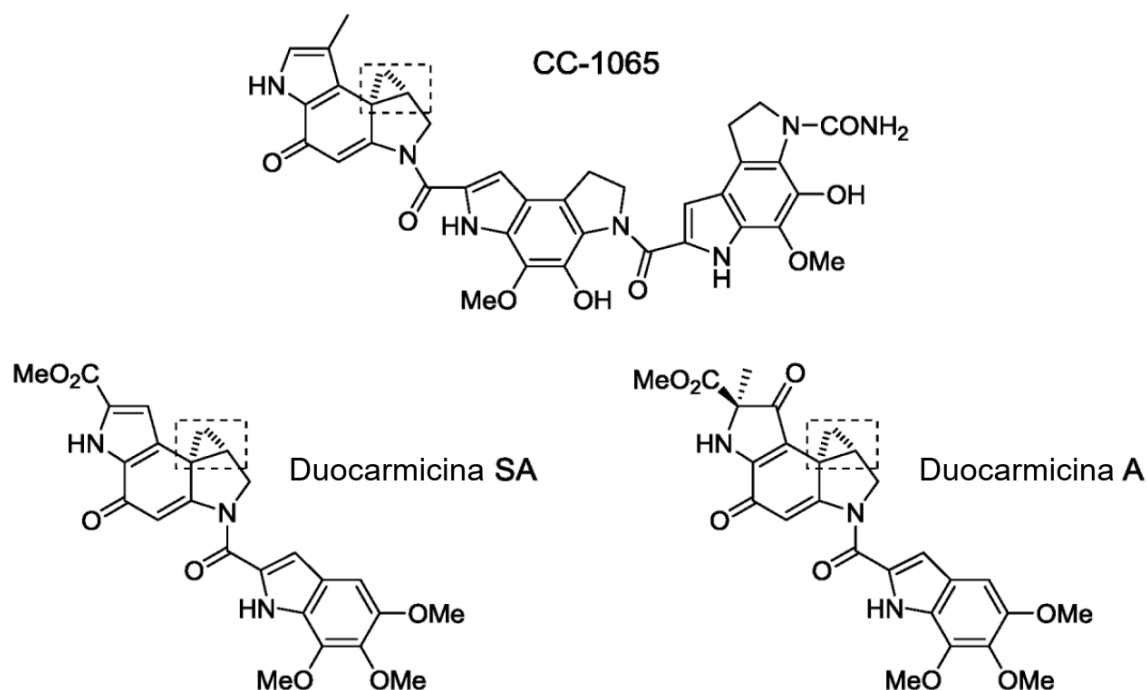
Inmunoconjugados, composiciones que los contienen y métodos de fabricación y uso

5 Campo técnico de la invención

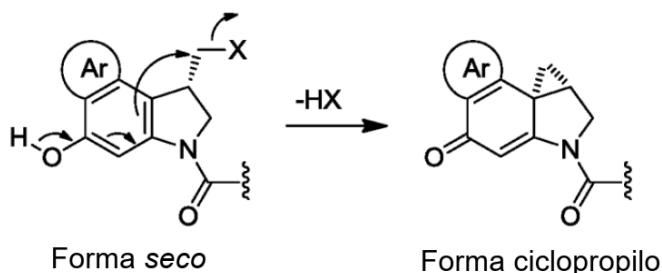
Esta invención se refiere a inmunoconjugados terapéuticos, compuestos que se pueden utilizar para fabricarlos y métodos para usar tales inmunoconjugados.

10 Antecedentes de la técnica

Los productos naturales CC-1065 y las duocarmicinas son fuertes agentes citotóxicos que se unen al surco menor del ADN. Se caracterizan por un anillo de ciclopropilo condensado (recuadro de puntos en las estructuras mostradas más adelante) que se desestabiliza debido a cambios conformacionales inducidos al unirse dentro del surco menor y reacciona con una base de adenina del ADN en una reacción de alquilación de apertura de anillo. El daño al ADN puede ser irreparable, lo que provoca la muerte celular.



20 La fuerza de estos productos naturales ha estimulado una investigación dirigida a desarrollar análogos útiles como fármacos contra el cáncer. Véase, por ejemplo, Cacciari *et al.* 2000 y Suckling 2004. (Al final de esta memoria descriptiva, se enumeran todas las referencias de los documentos citados en el presente documento indicando el primer autor o inventor y el año). Los análogos tienen el farmacóforo de ciclopropilo condensado o un anillo abierto (seco) equivalente del mismo, como se muestra en las estructuras a continuación, donde Ar representa un anillo aromático que normalmente es fenilo o pirrol y X representa un grupo saliente tal como Cl o Br. La forma seco es convertible a la forma ciclopropilo mediante la eliminación de HX, un proceso que puede producirse *in vitro* o *in vivo*.



30 En lo sucesivo, la expresión "agente de unión al surco menor" o "MGBA, por las siglas del inglés *minor groove binding agent*", se usará para referirse a los compuestos de tipo CC-1065/duocarmicina que tienen el anillo de ciclopropilo condensado o su forma seco, aunque se conocen otros tipos de compuestos de unión al surco menor del ADN.

Beusker *et al.* 2008 y Warpehoski *et al.* 1988, describen e investigan análogos del antibiótico antitumoral CC-1065 y/o las duocarmicinas y sus conjugados. Denny 2001 y 2004, describe conjugados de un anticuerpo, unidos a un derivado de CC-1065, a través de un espaciador dipeptídico con PEG. Asai *et al.* 1999 describen que la esterificación de fosfato puede hacer que la duocarmicina sea más soluble en agua.

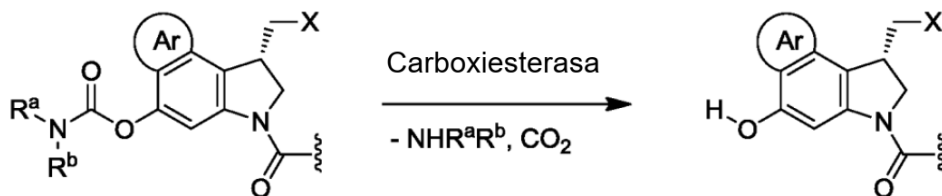
5 Los inmunoconjugados representan un campo de mucho interés actual en la terapia contra el cáncer. En un inmunoconjugado, una fracción farmacológica se conjuga (se une por enlace covalente) con un anticuerpo, cuyo antígeno expresa o sobreexpresa únicamente una célula cancerosa ("antígeno asociado a tumor"). Al unirse a su antígeno, el anticuerpo funciona como un agente de direccionamiento para suministrar la fracción farmacológica a la
10 célula cancerosa con alta especificidad. El antígeno puede ser una proteína en la superficie de la célula cancerosa. Al unirse el anticuerpo al antígeno, el complejo antígeno-inmunoconjugado se internaliza y finalmente encuentra su camino dentro de un cuerpo vesicular tal como un lisosoma, donde el enlazador covalente entre la fracción farmacológica y el anticuerpo, se escinde, liberando la fracción farmacológica para ejercer su efecto citotóxico. De manera alternativa, el antígeno asociado a tumor puede ser uno que las células tumorales secreten en el espacio extracelular vecinal.

Ventajosamente, el enlazador covalente está diseñado de tal manera que la escisión la efectúa un factor prevalente dentro de un lisosoma pero no en el plasma. Un factor de este tipo es el pH lisosómico más bajo, de modo que el enlazador covalente puede ser un grupo sensible a ácidos, tal como una hidrazona. Otro factor de este tipo es la
20 concentración intracelular generalmente más alta de glutatión, permitiendo la escisión de enlazadores covalentes de disulfuro mediante un mecanismo de intercambio de disulfuro. Incluso otro factor de este tipo es la presencia de enzimas lisosómicas tales como catepsina B, que puede escindir enlazadores peptídicos diseñados para ser sustratos preferidos (Dubowchik *et al.* 2002).

25 Su fuerza hace que los MGBA sean candidatos atractivos para la fracción farmacológica en un inmunoconjugado. Las divulgaciones ilustrativas relacionadas con los MGBA y su uso en inmunoconjugados incluyen: Boyd *et al.* 2007, 2008 y 2010; Chen *et al.* 2010; Gangwar *et al.* 2008; Ng *et al.* 2002, 2006a, 2006b, 2009a, 2009b y 2010; y Sufi *et al.* 2008 y 2010.

30 Existe la posibilidad de que se produzca una escisión accidental del enlazador covalente mientras el inmunoconjugado todavía está en la circulación general y aún no se ha suministrado a la célula cancerosa diana, dando como resultado la liberación prematura de la fracción farmacológica y planteando el riesgo de toxicidad sistémica. Dicho riesgo es de particular preocupación cuando la fracción farmacológica es una citotoxina extremadamente fuerte tal como un MGBA. Sin embargo, cuando un inmunoconjugado emplea un MGBA-seco, el riesgo puede reducirse derivatizando el grupo
35 hidroxilo fenólico para bloquear la conversión a la forma ciclopropilo. Después, en caso de escisión accidental, lo que se libera es un MGBA-seco derivatizado inactivo. Al seleccionar un derivado que se escinde dentro de un lisosoma, el derivado funciona como un grupo profarmacológico y proporciona un factor de seguridad: antes de que se libere la citotoxina activa, deben producirse dos escisiones, la del enlazador y la del grupo profarmacológico.

40 Un grupo profarmacológico de este tipo es un carbamato, que puede escindirse mediante una carboxiesterasa lisosómica y/o citosólica como se muestra a continuación. (R^a y R^b representan grupos radicales genéricos). Para divulgaciones ilustrativas relacionadas con inmunoconjugados de MGBA-seco que forman un profármaco con un grupo carbamato, véase Aristoff *et al.* 1991; Boger *et al.* 1995 y 1999; Boyd *et al.* 2007, 2008 y 2010; Chen *et al.* 2010; Gangwar *et al.* 2008; Kobayashi 1994; Ng *et al.* 2002, 2006a, 2006b, 2009a, 2009b y 2010; Sufi *et al.* 2008 y 2010; y
45 Zhao *et al.* 2003 y 2010.



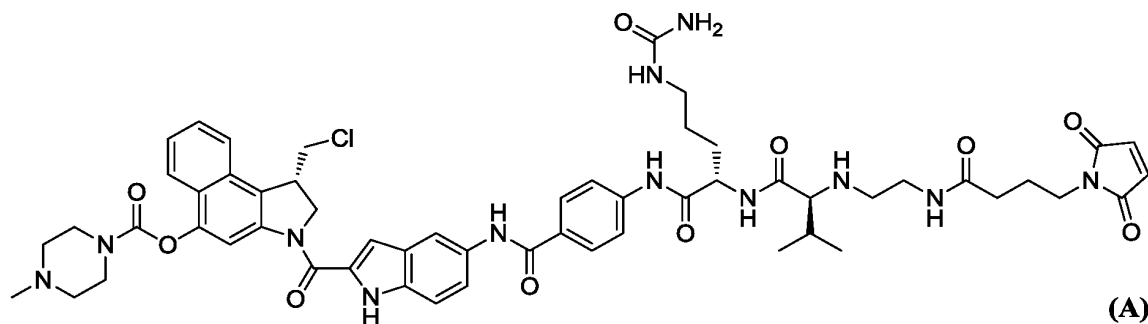
Forma seco formando un profármaco como carbamato (inactivo)

Forma seco, convertible a la forma ciclopropilo

Otro grupo profarmacológico que puede utilizarse con los MGBA-seco es un fosfato, en cuyo caso la enzima de escisión es una fosfatasa, que se encuentra dentro de los lisosomas y/o en el citosol. Las divulgaciones ilustrativas relacionadas con grupos profarmacológicos de fosfato en los MGBA-seco, incluyen Boyd *et al.* 2010, Chen *et al.* 2009, Glazier 2003, King *et al.* 2011, Kutayavin *et al.* 1997, Ng *et al.* 2002, Zhao *et al.* 2002a y 2002b, y Zhao *et al.* 2003 y 2010.

55 Un compuesto de MGBA que se ha estudiado extensamente tiene la estructura (A) (Boyd *et al.* 2007 y 2008 y Sufi *et al.* 2008 y 2010). Dicho compuesto tiene un grupo profarmacológico de carbamato; un enlazador dipeptídico de valina-citrulina (Val-Cit, se nombra en la dirección N a C, es decir, desde el extremo amino (NH_2) al extremo carboxilo (CO_2H)),

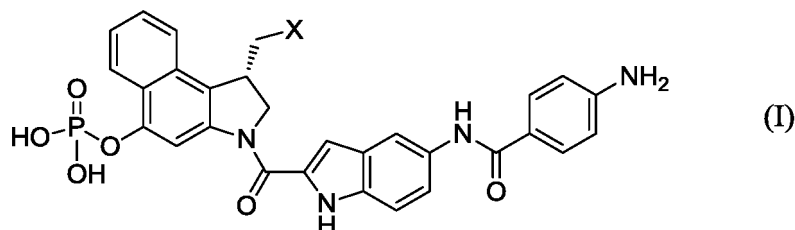
diseñado para ser escindido por catepsina B (Dubowchik *et al.* 2002); y un grupo de maleimida, para la inmunconjugación por la adición de Michael de un grupo sulfhidriilo de anticuerpo. Un inmunconjugado de compuesto (A) y un anticuerpo contra CD70 se ha sometido a ensayos clínicos.



Divulgación de la invención

10 Hemos observado que, en algunos casos, un inmunconjugado de MBA-seco que forma un profármaco con un carbamato, tal como uno derivado del compuesto (A), no es un agente anticanceroso tan fuerte como podría desearse. Se plantea la hipótesis de que la reducción de la fuerza es atribuible a una actividad insuficiente de carboxiesterasa dentro de algunos tipos de células cancerosas y a la consiguiente descarbamoilación ineficaz. Por tanto, es deseable desarrollar inmunconjugados de MGBA-seco formando un profármaco, que para su activación no dependan de carboxiesterasa.

15 En un aspecto, esta invención proporciona un inmunconjugado que comprende un anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y un compuesto de MGBA-seco que forma un profármaco con fosfato. La eliminación del grupo profarmacológico de fosfato es independiente de la actividad carboxiesterasa dentro de la célula diana, evitando así el inconveniente mencionado anteriormente. Por supuesto, los compuestos de esta invención dependen de fosfatasa, ya que nuestros experimentos muestran que está presente a niveles suficientes en una gama de células tumorales humanas. La presente invención se refiere a un inmunconjugado, en donde un compuesto de fórmula (I)



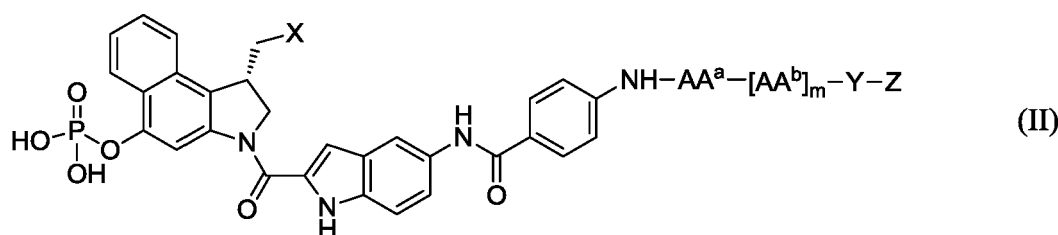
25 en donde X es un grupo saliente nucleofílicamente desplazable, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, se conjuga con el grupo -NH₂ del mismo a través de un enlazador peptídico a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano que reconoce un antígeno humano seleccionado del grupo que consiste en CD70, mesotelina, PSMA (por las siglas del inglés *prostate specific membrane antigen*, antígeno prostático específico de membrana), CD19, glipicano 3, B7H4, RG-1, CD22 y

30

En otro aspecto, se proporciona un compuesto de MGBA-seco que forma un profármaco con fosfato, adaptado para la conjugación con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Por lo general, dicho compuesto comprende una fracción de MGBA-seco que forma un profármaco con fosfato, un enlazador peptídico

35

enzimáticamente escindible, una fracción espaciadora y un grupo funcional reactivo para la unión a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Una realización está representada por un compuesto de fórmula (II)



40 en donde

X es un grupo saliente nucleofílicamente desplazable;

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

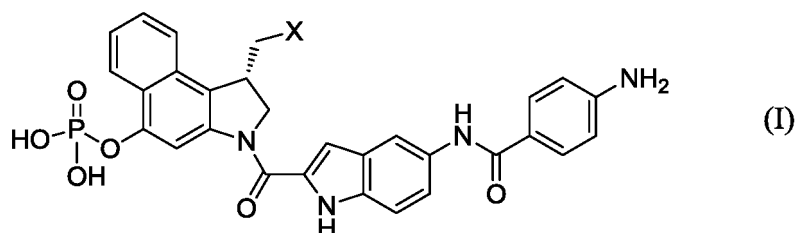
m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

Y es una fracción espaciadora; y

Z es un grupo funcional reactivo capaz de conjugarse con un anticuerpo;

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se proporciona un compuesto que forma un profármaco con fosfato, que puede usarse para preparar inmunoconjugados, tal como se representa mediante un compuesto de fórmula (I):



en donde X es un grupo saliente nucleofílicamente desplazable, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. El compuesto (I) puede combinarse con un enlazador peptídico, un espaciador y un grupo funcional reactivo como se describió anteriormente y después conjugarse con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otro aspecto más, se proporciona un inmunoconjugado de esta invención para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un sujeto - preferentemente un ser humano. El cáncer puede ser un cáncer cuyas células expresan un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD70, mesotelina, PSMA, CD19, glipicano 3, B7H4, RG-1, CD22 y PTK7. Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse de esta manera incluyen cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, linfoma, cáncer de colon, mesotelioma, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, adenocarcinoma, cáncer de hígado y cáncer de mama.

En otro aspecto más, se proporciona el uso de un inmunoconjugado de esta invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A y 1B en combinación muestran la síntesis de un compuesto de esta invención, que tiene un grupo funcional reactivo de maleimida.

La figura 2 muestra la síntesis de otro compuesto de esta invención.

Las figuras 3A a 3D en combinación muestran la síntesis de otro compuesto más de esta invención.

Las figuras 4A a 4R comparan las propiedades inhibitorias de proliferación celular de los inmunoconjugados de esta invención que forman un profármaco con fosfato, contra las de los inmunoconjugados que forman un profármaco con carbamato, usando un ensayo de proliferación de incorporación de timidina tritiada (timidina-³H). Las líneas celulares de ensayo incluyeron las siguientes líneas celulares de cáncer humano: 786-O (carcinoma renal), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), HPAC (cáncer de páncreas), OVCAR3 (cáncer de ovario), Ramos (linfoma de Burkitt), H226 (mesotelioma), N87 (cáncer gástrico), H292 (carcinoma mucoepidermoide pulmonar), H1650 (adenocarcinoma), Hep 3b (carcinoma hepatocelular), Hep G2 (carcinoma hepatocelular), HCC-1954 (cáncer de seno), MDA-MB-468 (cáncer de mama), HCT116 (cáncer de colon) y H520 (cáncer de pulmón). Adicionalmente, se usó una línea celular de CHO (*chinese hamster ovary*, ovario de hámster chino) transfectada que expresaba mesotelina.

La figura 5 representa trazados cromatográficos que muestran la desfosforilación de un compuesto de esta invención que forma un profármaco con fosfato, mediante enzimas microsómicas hepáticas humanas.

La figura 6 es un gráfico de la cantidad de producto desfosforilado producido en función de la concentración de microsomas, durante un período de una hora.

La figura 7 muestra la síntesis de otro compuesto más de esta invención, que tiene un grupo funcional reactivo de azida para la conjugación con un anticuerpo.

La figura 8 muestra la síntesis de otro compuesto más de esta invención, que tiene un grupo funcional reactivo de hidroxilamina para la conjugación con un anticuerpo.

Las figuras 9A y 9B muestran, en combinación, la síntesis de un compuesto de esta invención, que tiene un tripéptido Leu-Ala-Leu.

Las figuras 10A y 10B muestran, en combinación, la síntesis de un compuesto de esta invención, que tiene un

dipéptido Leu-Ile.

Las **figuras 11A y 11B** muestran, en combinación, la síntesis de otro compuesto de esta invención.

Las **figuras 12A-12I** muestran los resultados de varios estudios de xenoinjerto.

5 Modos para realizar la invención

Definiciones

"Anticuerpo" significa anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, la "parte de unión a antígeno") o sus cadenas sencillas. Un "anticuerpo" completo es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H, *heavy*) y dos cadenas ligeras (L, *light*) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada que comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (V_L o V_k) y una región constante de cadena ligera que comprende un solo dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR, siglas del inglés *complementarity determining regions*), intercaladas con regiones estructurales FR, siglas del inglés *framework regions*) más conservadas. Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes pueden mediar en la unión del anticuerpo con los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico. Se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno X, si el anticuerpo se une al antígeno X con una K_D de 5×10^{-8} M o inferior, más preferentemente de 1×10^{-8} M o inferior, más preferentemente de 6×10^{-9} M o inferior, más preferentemente de 3×10^{-9} M o inferior, incluso más preferentemente de 2×10^{-9} M o inferior. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, humanizado, o, preferentemente, humano. La región constante de la cadena pesada puede diseñarse para que afecte al tipo o grado de glicosilación, para prolongar la semivida del anticuerpo, para mejorar o reducir las interacciones con las células efectoras o el sistema del complemento, o para modular alguna otra propiedad. El diseño puede realizarse mediante reemplazo, adición o delección de uno o más aminoácidos o mediante el reemplazo de un dominio por un dominio de otro tipo de inmunoglobulina, o una combinación de los anteriores.

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

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

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

"Anticuerpo humano" significa un anticuerpo que tiene regiones variables en las que tanto las regiones estructurales como las regiones CDR (y la región constante, si está presente) proceden de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir modificaciones posteriores, incluyendo modificaciones naturales o sintéticas. Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, un "anticuerpo humano" no incluye

anticuerpos en los que las secuencias CDR procedentes de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias estructurales humanas.

"Anticuerpo monoclonal humano" significa un anticuerpo que presenta una sola especificidad de unión, que tiene regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones estructurales como las CDR provienen de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera humanas, fusionado a una célula inmortalizada.

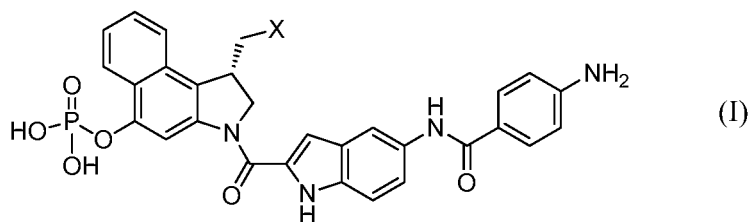
A menos que los estereoisómeros particulares estén específicamente indicados (por ejemplo, mediante un enlace en negrita o discontinuo en un estereocentro relevante en una fórmula estructural, mediante la representación de un doble enlace que tenga configuración E o Z en una fórmula estructural, o mediante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

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

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

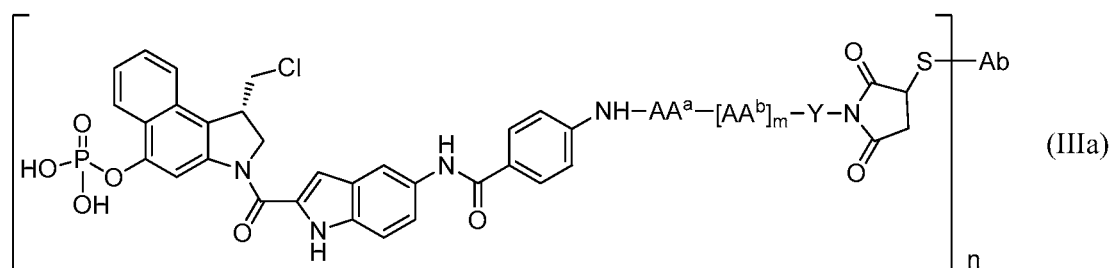
COMPOSICIONES

En un aspecto, una composición de esta invención es un inmunoconjugado en donde un compuesto de fórmula (I)



en donde X es un grupo saliente desplazable nucleofílicamente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se conjuga a través de un enlazador peptídico a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. La conjugación preferentemente es a través del grupo 4-NH₂ del mismo. El enlazador de peptidilo es un dipéptido seleccionado entre Val-Cit, Phe-Cit, Phe-Lys, Val-Lys, Val-Glu, Val-Asp, Val-Ser y Val-Gly, enumerándose cada dipéptido en la dirección de N a C.

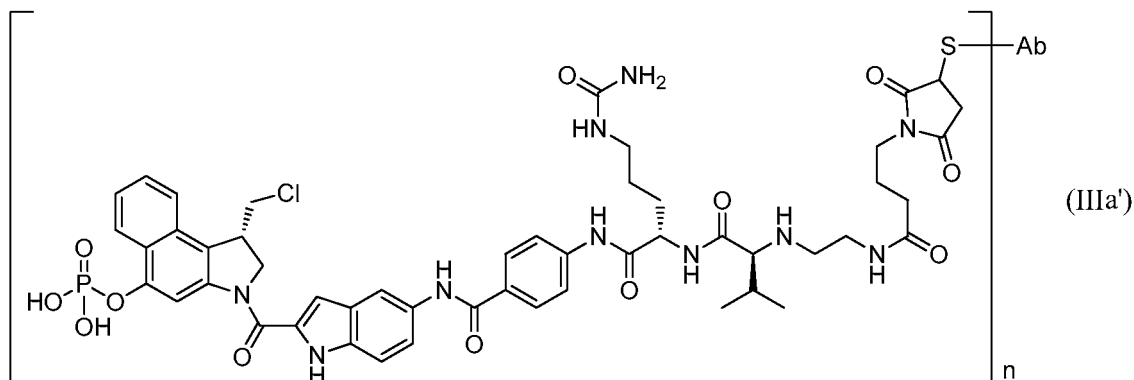
En una realización, el inmunoconjugado tiene una estructura representada por la fórmula (IIIa)



en donde AA^a, AA^b, m e Y son como se definen anteriormente en el presente documento con respecto a la fórmula

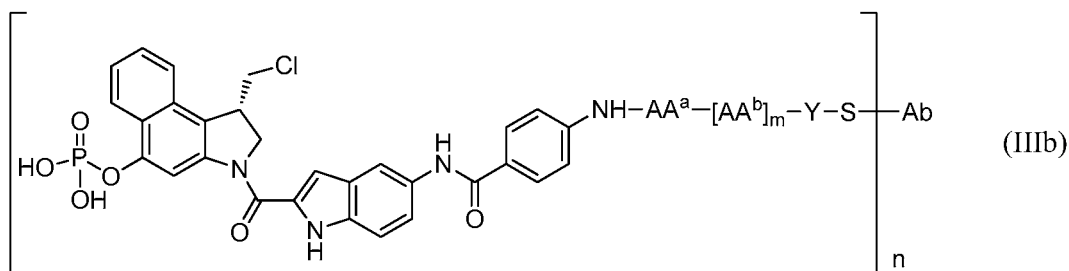
(II), Ab representa un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo y n es 1, 2, 3, 4 o 5; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las realizaciones y/o combinaciones preferidas de AA^a, AA^b, m, Y, Ab y n se describen anteriormente en el presente documento.

5 Un inmunocombinado preferido de acuerdo con la fórmula (IIIa) tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (IIIa')



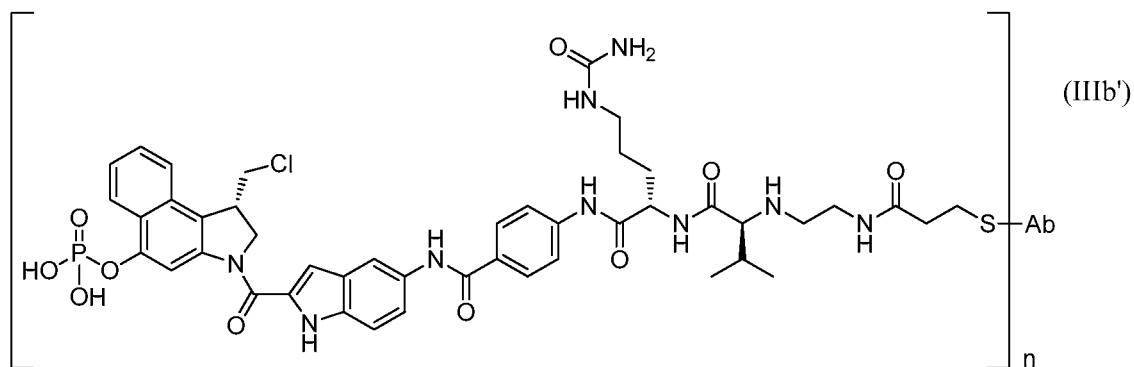
10 en donde Ab y n son como se definieron anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por lo tanto, esta realización tiene un enlazador de dipéptido Val-Cit, con la que los expertos en la materia entienden que en la fórmula estructural (IIIa') el dipéptido se dibuja en una orientación de C a N cuando se lee en una dirección de izquierda a derecha.

15 En otra realización, el inmunocombinado tiene una estructura representada por la fórmula (IIIb)



20 en donde AA^a, AA^b, m e Y son como se definen anteriormente en el presente documento con respecto a la fórmula (II), Ab representa un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo y n es 1, 2, 3, 4 o 5; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las realizaciones y/o combinaciones preferidas de AA^a, AA^b, m, Y, Ab y n se describen anteriormente en el presente documento.

Un inmunocombinado preferido de acuerdo con la fórmula (IIIb) tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (IIIb')

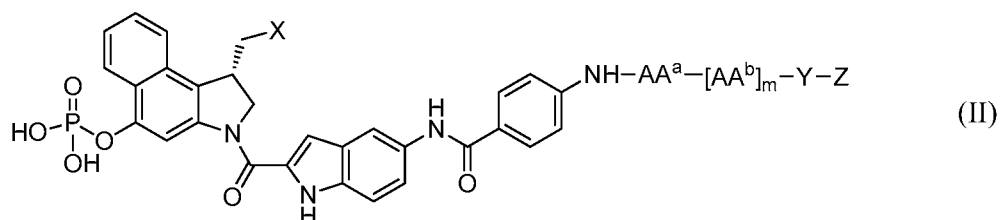


25 en donde Ab y n son como se definieron anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Como se refleja en el subíndice n en las fórmulas (IIIa), (IIIa'), (IIIb) y (IIIb'), cada anticuerpo puede conjugarse con más de un resto seco-MGBA profármaco, dependiendo del número de sitios que tiene el anticuerpo disponible para la conjugación y las condiciones experimentales empleadas. Los expertos en la materia apreciarán que, si bien cada anticuerpo individual se conjuga con un número entero de restos profármacos, una preparación de inmunocombinado

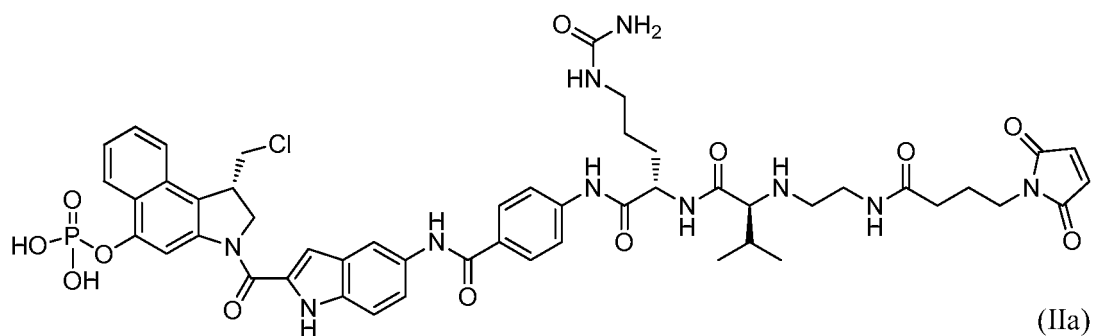
puede analizar una relación no entera de restos *seco*-MGBA profármacos por anticuerpo ("relación de sustitución" o "SR"), reflejando un promedio estadístico. SR preferentemente está entre 1 y 5, más preferentemente entre 2,5 y 3,5.

Otro aspecto de esta invención es un compuesto adaptado para la conjugación con un anticuerpo, representado por la fórmula (II)



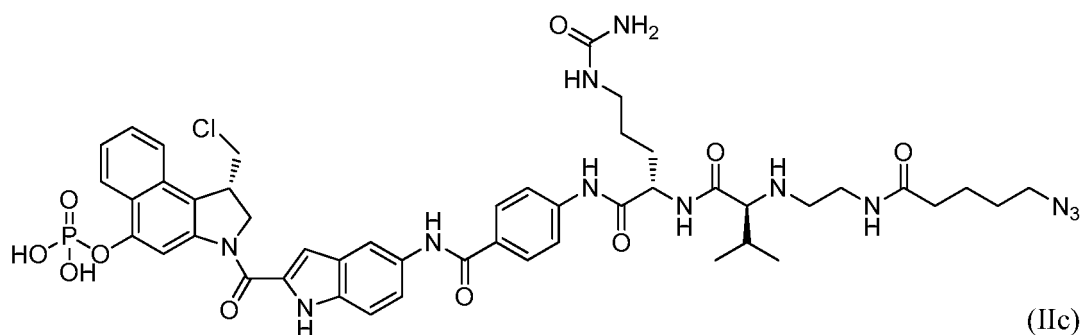
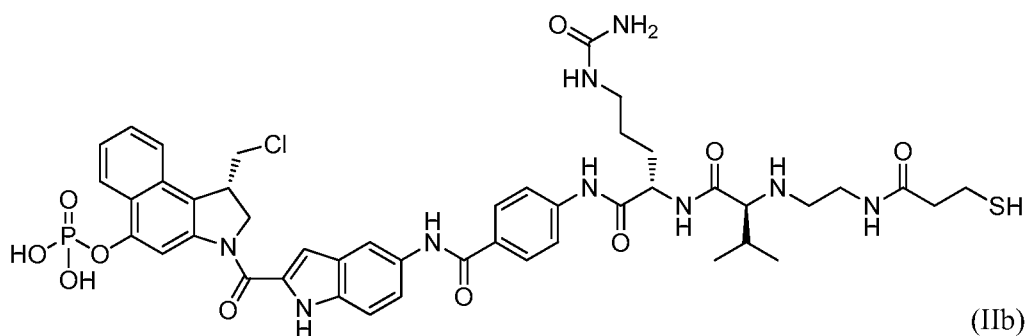
10 en donde AA^a, AA^b, m, Y y Z son como se han definido anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las realizaciones y/o combinaciones preferidas de AA^a, AA^b, m, Y y Z se describen anteriormente en el presente documento.

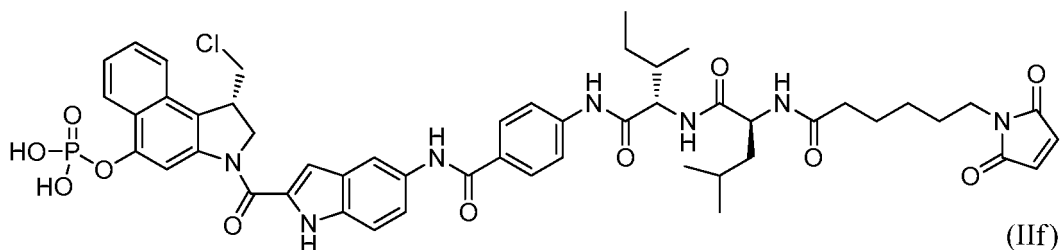
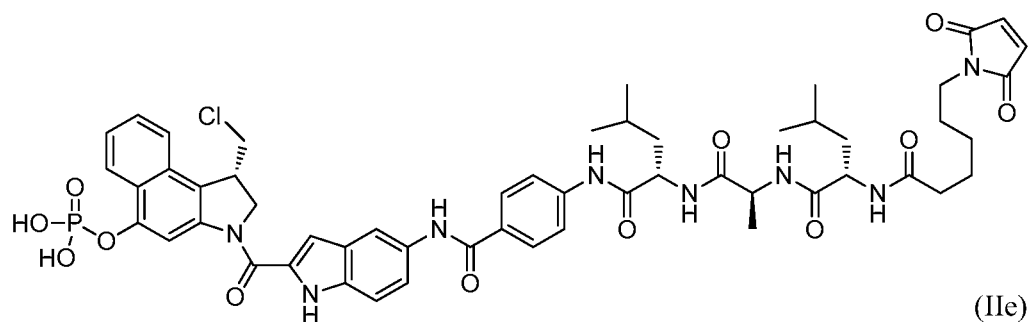
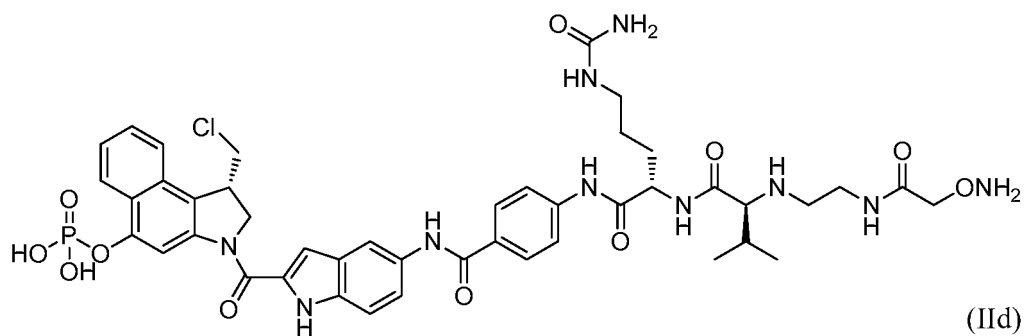
Una realización preferida de acuerdo con la fórmula (II) tiene la estructura de fórmula (IIa)



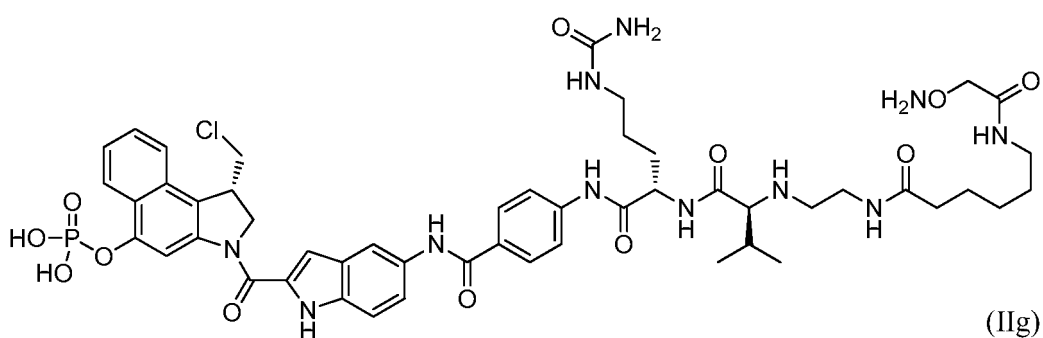
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otras realizaciones preferidas de acuerdo con la fórmula (II) tienen las estructuras de fórmulas (IIb)-(IIg):





5



o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

10

En las fórmulas (I) y (II), X es un grupo nucleofílicamente desplazable, preferentemente Cl, Br o tosilato, más preferentemente Cl.

15

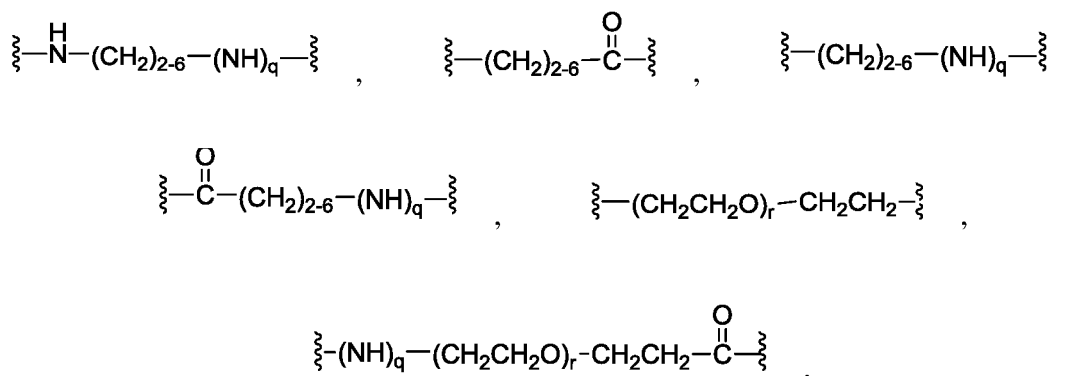
En las fórmulas (II), (IIIa) y (IIIb), AA^a y cada AA^b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina (Cit), cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Preferentemente, AA^a y AA^b se seleccionan entre el grupo que consiste en arginina, ácido aspártico, citrulina, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, lisina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

20

La fracción $-AA^a-[AA^b]_m-$ en las fórmulas (II), (IIIa) y (IIIb), representa un enlazador peptídico donde aminoácidos consecutivos se unen mediante enlaces peptídicos. Es preferible que sea escindible mediante una enzima intracelular o extracelular asociada a la célula diana. La enzima puede ser, por ejemplo, catepsina B, catepsina E, legumina o CD10. El enlazador peptídico consiste preferentemente en de uno a seis, más preferentemente de uno a tres, y lo más preferentemente, de uno a dos aminoácidos. Preferentemente AA^a es Cit, Lys, Glu, Ser, Ile, Leu o Thr, más preferentemente Cit o Lys, especialmente en combinación con m igual a 0, 1 o 2.

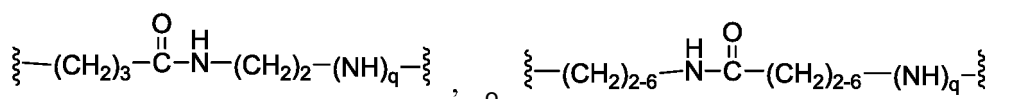
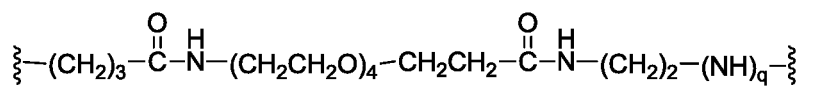
El sufijo m en las fórmulas (II), (IIIa) y (IIIb), es 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Preferentemente, m es 0, 1 o 2, más preferentemente 1. Por tanto, $-AA^a-[AA^b]_m-$ representa un solo enlazador aminoacídico, un enlazador dipeptídico, un enlazador tripeptídico, y así sucesivamente, de acuerdo con el valor de m, estando AA^a en el extremo C y AA^b en el extremo N. Cuando m es 1, de manera que AA^a y AA^b en combinación forman un dipéptido, los dipéptidos preferidos son Val-Cit, Phe-Cit, Phe-Lys, Val-Lys, Val-Glu, Val-Asp, Val-Ser y Val-Gly, cada dipéptido se nombra en la dirección N a C convencional. Se prefiere especialmente un enlazador dipeptídico de Val-Cit. Cuando el enlazador peptídico consiste en un solo aminoácido (es decir, m es 0), este es preferentemente Cit, Glu, Lys o Ser, como se enseña en Chen *et al.* 2010. Preferentemente, los enlazadores dipeptídicos y mono-peptídicos anteriores, pueden escindirse con catepsina B. Otra enzima que puede utilizarse para escindir enlazadores peptídicos es la legumina, una cisteína proteasa lisosómica que escinde preferentemente en Ala-Ala-Asn. Los péptidos Leu-Ala-Leu y Leu-Ile están diseñados para escindirse con CD10 y catepsina E, respectivamente.

El espaciador Y en las fórmulas (II), (IIIa) y (IIIb), proporciona una separación espacial entre el MGBA-seco que forma un profármaco y el anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo), no sea que el primero interfiera estéricamente con la unión al antígeno por el segundo o que el segundo interfiera estéricamente con la escisión del enlazador peptídico. Además, el espaciador Y puede usarse para conferir mayor solubilidad o propiedades de agregación disminuidas a los conjugados. El espaciador Y puede comprender uno o más segmentos modulares, que pueden ensamblarse en cualquier número de combinaciones. Son ejemplos de segmentos adecuados para el espaciador Y:



y combinaciones de las mismas,

en donde el subíndice q es 0 o 1 independientemente para cada aparición del mismo y el subíndice r es de 1 a 24, preferentemente de 2 a 4, independientemente para cada aparición del mismo. Estos segmentos se pueden combinar tal como se muestra a continuación:

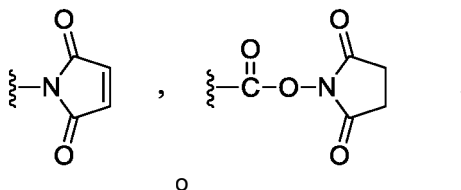


El separador Y preferentemente proporciona una separación lineal de 5 a 20 átomos, más preferentemente de 5 a 15 átomos, entre el aminoácido AA^a o AA^b al que está unido y el grupo funcional reactivo Z.

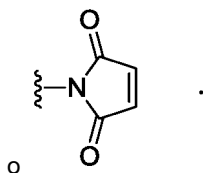
En otra realización preferida, el separador Y está conectado a AA^a o AA^b , según sea el caso, por otro que no sea un grupo acilo directamente unido al grupo alfa-amino de AA^a o AA^b . Preferentemente, el separador Y está conectado al grupo alfa-amino de AA^a o AA^b , según sea el caso, a través de un grupo metileno en el separador Y.

En la fórmula (II), Z es un grupo funcional reactivo capaz de conjugarse con un anticuerpo. Preferentemente, -Z es -

NH₂, -OH, -ONH₂ (hidroxilamina), -CO₂H, -SH, ciclooctino, azida (-N₃),



5 Más preferentemente, -Z es -ONH₂, -SH, -N₃,



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

Un grupo -CO₂H puede esterificarse con un grupo -OH o amidarse con un grupo amino (por ejemplo, en una cadena lateral de lisina) en el anticuerpo.

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

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

20 Un grupo -SH es particularmente útil para la conjugación en la que el anticuerpo se ha modificado para introducir un grupo maleimida al mismo, en una reacción de adición de Michael que es la "imagen especular" de la descrita anteriormente. Los anticuerpos pueden modificarse para tener grupos maleimida con N-succinimidil 4-(maleimidometil)-ciclohexanocarboxilato (SMCC) o su variante sulfonada sulfo-SMCC, ambos reactivos están disponibles de Sigma-Aldrich.

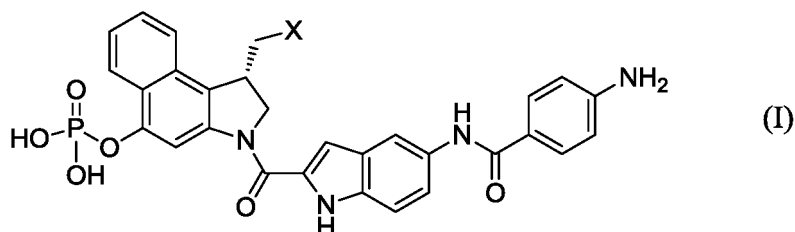
30 La azida y el ciclooctino son grupos funcionales complementarios que pueden efectuar la conjugación a través de la llamada "química de clic", en la que la azida se añade a través del enlace alquino tenso del ciclooctino para formar un anillo de 1,2,3-triazol. La azida puede ser el grupo Z en un compuesto de fórmula (II) y el ciclooctino puede situarse en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o viceversa. Un grupo ciclooctino puede ser proporcionado por un reactivo DIBO (disponible en Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, Oregón).

35 Se pueden utilizar técnicas para introducir aminoácidos no naturales en anticuerpos, proporcionando el aminoácido no natural una funcionalidad para la conjugación con el grupo funcional reactivo. Por ejemplo, el aminoácido no natural p-acetilfenilalanina puede incorporarse en un anticuerpo, como se enseña en Tian *et al.*, documento WO 2008/030612 A2 (2008). El grupo cetona en p-acetilfenilalanina puede ser un sitio de conjugación mediante la formación de una oxima con un grupo funcional reactivo con hidroxilamino. También se pueden incorporar otros aminoácidos no naturales usando la tecnología ReCODE™ de Ambrx, Inc. (La Jolla, California).

40 En los inmunoconjugados anteriores, el anticuerpo es, preferentemente, un anticuerpo contra un antígeno asociado a tumor, permitiendo que el inmunoconjugado se dirija selectiva o preferentemente a células cancerosas. Los ejemplos de dichos antígenos incluyen: mesotelina, antígeno prostático específico de membrana (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H4 (también conocido como O8E), proteína tirosina cinasa 7 (PTK7), glicicano 3, RG1, CTLA-4 y CD44. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de un animal (por ejemplo, de un murino), un anticuerpo quimérico, humanizado, o, preferentemente, humano. El anticuerpo es, preferentemente, monoclonal, especialmente, un anticuerpo monoclonal humano. La preparación de anticuerpos monoclonales humanos contra algunos de los antígenos mencionados anteriormente, se divulga en Korman *et al.*, documento US 2009/0074660 A1 (B7H4); Rao-Naik *et al.*, documento 8 097 703 B2 (CD19); King *et al.*, documento US 2010/0143368 A1 (CD22); Keler *et al.*, documento US 7 387 776 B2 (2008) (CD30); Terrett *et al.*, documento US 8 124 738 B2 (CD70); Korman *et al.*, documento US 6 984 720 B1 (2006) (CTLA-4); Korman *et al.*, documento US 2009/0217401 A1 (PD-1); Huang *et al.*, documento US 2009/0297438 A1 y Cardarelli *et al.*, documento US 7 875 278 B2 (PSMA); Lu *et al.*, documento US 2010/0034826 A1 (PTK7); Terrett *et al.*, US 2010/0209432 (A1) (glicicano 3); Harkins *et al.*, documento US 7 335 748 B2(2008) (RG1); Terrett *et al.*, US 2011/0262448 A1 (mesotelina); y Xu *et al.*, documento US 2010/0092484 A1 (CD44). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano contra CD70, mesotelina, CD19, glicicano 3,

B7H4, RG-1, CD22 o PTK7.

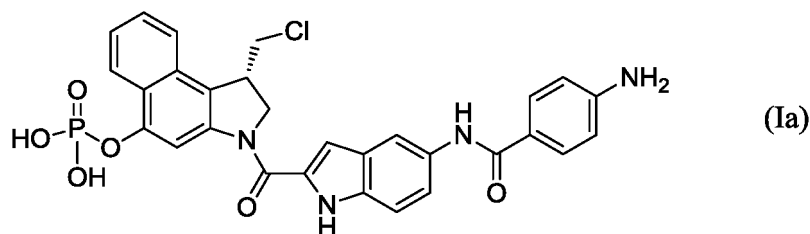
Otro aspecto de la invención es un compuesto profármaco de fórmula (I)



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde X es un grupo saliente desplazable nucleofílicamente, el cual preferentemente es Cl, Br o tosilato y más preferentemente es Cl. Un compuesto de fórmula (I) puede conjugarse con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para hacer un inmunoconjugado terapéuticamente útil mediante el empleo de un enlazador, espaciador y grupo funcional reactivo apropiado, como se discutió anteriormente. Una realización preferida de fórmula (I) en la que X es Cl corresponde a una estructura de fórmula (Ia):

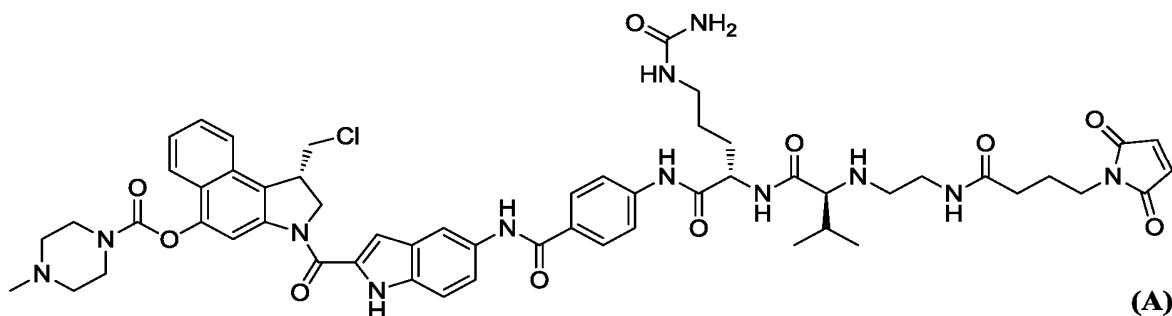
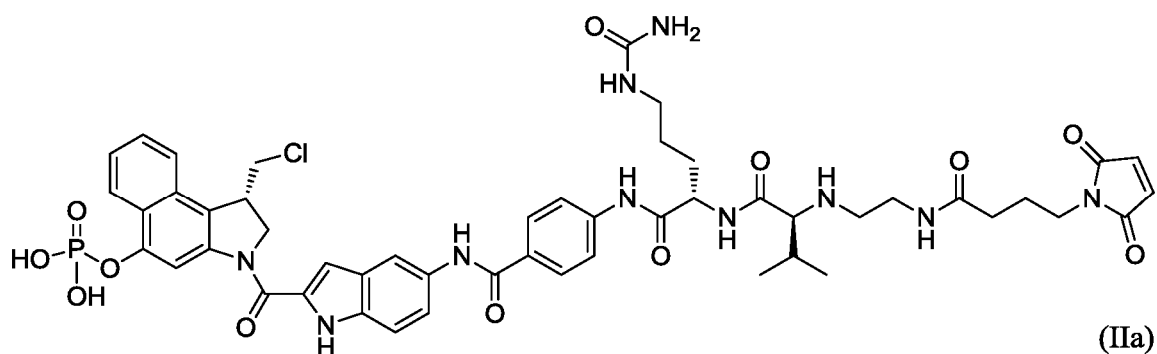
10



15 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Se realizó una serie de experimentos de proliferación celular, en la que se comparó la capacidad de los inmunoconjugados preparados a partir del compuesto (IIa) y el compuesto (A) de la técnica anterior (A). En cada caso, la técnica utilizada fue la del ensayo de incorporación de timidina tritiada (timidina-³H), cuyos detalles procedimentales se proporcionan en más adelante en los Ejemplos del presente documento.

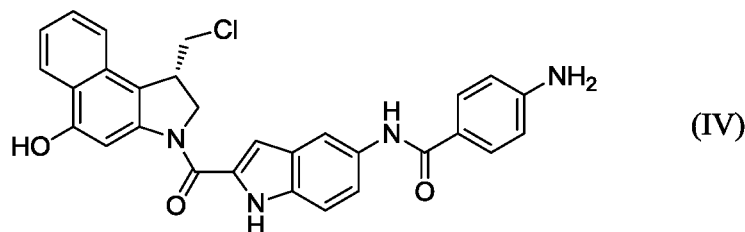
20



25

Dado que los inmunoconjugados son idénticos, excepto por el grupo profarmacológico - fosfato frente a carbamato -

y que después de la escisión del enlazador peptídico y de la eliminación del grupo profarmacológico, se libera el mismo fármaco de fórmula (IV), los experimentos proporcionan una comparación del efecto del grupo profarmacológico sobre la fuerza del inmunoc conjugado. Estos resultados paralelos muestran que, inesperadamente, los inmunoc conjugados del compuesto (IIa) son significativamente más fuertes que los del compuesto (A), aunque en cada caso intervenga el mismo compuesto activo final (IV).



La **figura 4A** muestra la actividad inhibitoria de los dos inmunoc conjugados sobre la proliferación de células 786-O, que son células de cáncer renal humano que expresan CD70. En cada caso, el anticuerpo conjugado era 2H5, un anticuerpo monoclonal humano contra CD70. El inmunoc conjugado del compuesto (IIa) no solo tenía una CE_{50} más baja (0,1000 nM frente a 0,5725 nM) sino que también tuvo un mayor porcentaje de inhibición global, como lo demuestra la profundidad de su curva de inhibición. (La información de la secuencia completa del anticuerpo 2H5 se desvela en Coccia *et al.* 2010 y Terret *et al.* 2012b). Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 2H5, se dan en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, respectivamente).

La **figura 4B** es un estudio similar, pero usando células HPAC, que son células humanas de cáncer de páncreas que expresan mesotelina. En cada caso, el anticuerpo conjugado era 6A4, un anticuerpo monoclonal humano contra mesotelina. En este experimento, se prepararon dos conjugados diferentes de compuesto (IIa), con proporciones de sustitución de 1,25 y 3. (Las concentraciones de citotoxina en el eje X se ajustan para reflejar la proporción de sustitución). La **figura 4B** muestra que el inmunoc conjugado del compuesto (A) estaba esencialmente inactivo, mientras que los inmunoc conjugados del compuesto (IIa) tenían valores de CE_{50} aproximadamente nanomolares. También cabe señalar que el inmunoc conjugado del compuesto (IIa) con la mayor proporción de sustitución, mostró un mayor porcentaje de inhibición global (curva más profunda). (La información de la secuencia completa del anticuerpo 6A4 se desvela en Terrett *et al.* 2011b. Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 6A4, se dan en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, respectivamente).

La **figura 4C** es otro estudio similar, esta vez usando células CHO que expresaban mesotelina, que son células de ovario de hámster chino transfectadas para expresar mesotelina. El anticuerpo conjugado fue, de nuevo, 6A4. El inmunoc conjugado del compuesto (A) estaba esencialmente inactivo, mientras que el inmunoc conjugado del compuesto (IIa) tenía un valor de CE_{50} de aproximadamente 2 nM.

La **figura 4D** es otro estudio similar, esta vez usando células OVCAR3, que son células de cáncer de ovario humano que expresan mesotelina. De nuevo, el anticuerpo conjugado fue 6A4. La CE_{50} del inmunoc conjugado del compuesto (IIa) fue aproximadamente 1 000 veces menor que la del inmunoc conjugado del compuesto (A).

La **figura 4E** es otro estudio similar, esta vez usando células Ramos, que son células de linfoma de Burkitt humano que expresan CD19. El anticuerpo conjugado fue 21D4, un anticuerpo monoclonal humano contra CD 19. La disparidad entre los inmunoc conjugados del compuesto (A) y (IIa) fue de nuevo notable, siendo el primero esencialmente inactivo mientras que el segundo tenía una CE_{50} subnanomolar. (La información de la secuencia completa del anticuerpo 21D4 se desvela en King *et al.* 2010a y Rao-Naik *et al.* 2012. Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 21D4, se dan en la SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18, respectivamente).

La **figura 4F** es otro estudio similar, esta vez con células NCI-H226 (H226), que son células de mesotelioma procedentes de pulmón humano que expresan mesotelina. El anticuerpo conjugado fue, de nuevo, 6A4. Adicionalmente, como control de isotipo, el compuesto (IIa) se conjugó con 2A10, que es un anticuerpo monoclonal humano contra el antígeno prostático específico de membrana ("PSMA"). Como cabía esperar, el inmunoc conjugado de PSMA tuvo muy poca o ninguna actividad, ya que las células H226 no expresan PSMA. El inmunoc conjugado del compuesto (A) tuvo una actividad similarmente baja o nula. Por el contrario, cada uno de los dos inmunoc conjugados del compuesto (IIa) tenía una CE_{50} subnanomolar. Como en ejemplos anteriores, el inmunoc conjugado con la mayor proporción de sustitución, mostró un mayor porcentaje de inhibición de proliferación global. (La información de la secuencia completa del anticuerpo 2A10 se desvela en Huang *et al.* 2009 y Cardarelli *et al.* 2011. Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2, y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 2A10, se dan en la SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23 y SEQ ID NO:24, respectivamente).

La **figura 4G** muestra la actividad de un inmunoconjugado de anticuerpo 6A4 contra mesotelina y compuesto (IIa) contra células N87 de carcinoma gástrico humano, que expresan mesotelina. Se observó una CE_{50} subnanomolar.

- 5 La **figura 4H** muestra la actividad de inmunoconjugados de anticuerpo 6A4 y compuesto (IIa) a diversas proporciones de sustitución (PS) contra células H292, que son células de carcinoma mucoepidermoide pulmonar que expresan mesotelina. Como control, se usó un inmunoconjugado de anticuerpo 2A10 contra PSMA y compuesto (IIa). Los valores de CE_{50} se muestran en la Tabla I, a continuación. Estos valores muestran que hay un aumento significativo de la fuerza cuando la PS (proporción de sustitución) se aumenta a un valor de aproximadamente dos o por encima

10 de este valor.

Tabla I - Actividad contra células H292	
Inmunoconjugado	CE_{50} (nM)
PSMA - Cpto IIa	44,8
Mesotelina - Cpto IIa (PS 1,17)	86,5
Mesotelina - Cpto IIa (PS 2,1)	8,36
Mesotelina - Cpto IIa (PS 3,6)	11,9

- 15 La **figura 4I** muestra un estudio similar al de la **figura 4H**, pero contra células H1650, que son células de adenocarcinoma humano que expresan mesotelina. En la Tabla II se presentan los valores de CE_{50} . De nuevo, se observó un salto en la fuerza a una PS por encima de aproximadamente dos.

Tabla II - Actividad contra células H1650	
Inmunoconjugado	CE_{50} (nM)
PSMA - Cpto IIa	95,3
Mesotelina - Cpto IIa (PS 1,17)	180
Mesotelina - Cpto IIa (PS 2,1)	16,6
Mesotelina - Cpto IIa (PS 3,6)	12,1

- 20 **Las figuras 4J y 4K** son estudios de inmunoconjugados de esta invención contra dos líneas celulares de carcinoma hepatocelular humano, Hep 3B y Hep G2, ambas de las cuales expresan glipicano 3. La fuerza del anticuerpo monoclonal humano 4A6 contra glipicano 3, se comparó solo y cuando se conjugó con el compuesto (IIa), junto con un inmunoconjugado de control de anticuerpo 2H5 contra CD70 y compuesto (IIa). (Ninguna de las células Hep 3B ni Hep G2 expresaron CD70). Los resultados muestran que el inmunoconjugado con 4A6 era muy fuerte, aproximadamente 1 000 veces más activo que el inmunoconjugado de control con CD70. El anticuerpo 4A6 contra glipicano 3 solo era inactivo. (La información de secuencia completa del anticuerpo 4A6 se describe en Terrett *et al.* 2010b. Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 4A6, se dan en la SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 y SEQ ID NO:30, respectivamente).

- 30 Las **figuras 4L, 4M y 4N** son estudios de la actividad de un inmunoconjugado del anticuerpo monoclonal humano 2A7 contra B7H4 y el compuesto (IIa) contra las líneas celulares MDA-MB-468, HCC-1954 y OVCAR3. Las dos primeras son líneas celulares de cáncer de mama humano, mientras que la tercera es una línea celular de cáncer de ovario humano, todas ellas expresan B7H4 pero no CD70. Como control, se usó un inmunoconjugado de anticuerpo 2A10 contra PSMA y compuesto IIa. En las figuras puede observarse que hubo alguna actividad específica contra las líneas celulares de cáncer de mama, pero poca o ninguna contra las células OVCAR3. (La información de la secuencia completa del anticuerpo 2A7 se desvela en Korman *et al.* 2009 y Terrett *et al.* 2011a. Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 2A7, se dan en la SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35 y SEQ ID NO:36, respectivamente).

- 40 La **figura 4O** es un estudio de la actividad de inmunoconjugados del anticuerpo monoclonal humano 2A10 contra PSMA y el anticuerpo monoclonal humano 19G9 contra RG-1, cada uno conjugado con el compuesto (IIa), contra células de cáncer de próstata humano LNCap, que expresan tanto PSMA como RG-1. Se proporcionan datos de comparación de un inmunoconjugado de anticuerpo 6A4 contra mesotelina y compuesto (IIa), como control. Puede observarse que los dos conjugados de PSMA y RG-1 fueron eficaces, cada uno con valores de CE_{50} subnanomolares. (La información de la secuencia completa del anticuerpo 19G9 se desvela en King *et al.* 2011. Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 19G9, se dan en

45

la SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42, respectivamente).

La **figura 4P** es un estudio de la actividad de inmunoconjugados del anticuerpo monoclonal humano 21D4 contra CD 19 y el anticuerpo monoclonal humano 12C5 contra CD22, cada uno conjugado con el compuesto (IIa), contra células de Ramos, que expresan tanto CD19 como CD22. Se proporcionan datos de comparación de inmunoconjugados de anticuerpo 6A4 contra mesotelina y compuesto de anticuerpo 2H5 contra CD70 (IIa). Los inmunoconjugados contra CD19 y contra CD22 fueron muy fuertes, cada uno con valores de CE_{50} subnanomolares. (La información de la secuencia completa del anticuerpo 12C5 se desvela en King *et al.* 2010b. Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 12C5, se dan en la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:48, respectivamente).

La **figura 4Q** muestra la actividad de un inmunoconjugado de anticuerpo monoclonal humano 4D5 contra PTK7 con compuesto IIa contra células HCT116, que son células de carcinoma de colon humano. El inmunoconjugado tenía una CE_{50} de 1,87 nM, mientras que un inmunoconjugado de control del anticuerpo 2A10 contra PSMA era mucho menos fuerte, con una CE_{50} de 951 nM. (La información de la secuencia completa del anticuerpo 4D5 se desvela en Terrett *et al.* 2010a y Terrett *et al.* 2012a. Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 4D5, se dan en la SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53 y SEQ ID NO:54, respectivamente).

La **figura 4R** muestra la actividad de un inmunoconjugado del anticuerpo 4D5 contra PTK7 mencionado anteriormente, contra células H520, que son células de carcinoma de células escamosas de pulmón humano. El inmunoconjugado de PTK7 tenía una CE_{50} de 0,224 nM, mientras que, de nuevo, el inmunoconjugado de control con PSMA fue mucho menos fuerte, con una CE_{50} de 61,6 nM.

Los resultados anteriores demuestran que, inesperadamente, la naturaleza del grupo profarmacológico - fosfato frente a carbamato - desempeña un papel importante en la fuerza de los inmunoconjugados que, de otro modo, sería idéntica. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, nuestra hipótesis es que diferentes células humanas (incluidas las células cancerosas) contienen diferentes niveles de carboxiesterasa y que muchas, si no la mayor parte, contienen niveles insuficientes de carboxiesterasa para escindir el grupo profarmacológico de carbamato de manera eficaz. Sin embargo, los inmunoconjugados que forman un profármaco con un grupo fosfato, no se ven afectados por dicho problema, supuestamente porque en la mayoría de las células, si no en todas, el nivel de actividad de fosfatasa es suficientemente alto para la escisión eficiente del grupo fosfato.

USOS

Los inmunoconjugados de esta invención se utilizarán para tratar enfermedades tales como enfermedades hiperproliferativas, incluyendo: cánceres de cabeza y cuello que incluyen tumores de la cabeza, cuello, cavidad nasal, senos paranasales, nasofaringe, cavidad oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, glándulas salivales y paragangliomas; cánceres de hígado y vías biliares, particularmente carcinoma hepatocelular; cánceres intestinales, particularmente cáncer colorrectal; cáncer de ovario; cáncer de pulmón microcítico y no microcítico (CPM y CPNM); sarcomas de cáncer de mama, tal como fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, rhabdomyosarcoma embrionario, leiomiomasarcoma, neurofibrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma sinovial, liposarcoma y sarcoma alveolar de partes blandas; leucemias tal como leucemia promielocítica aguda (LPA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), y leucemia mielógena crónica (LMC); neoplasias del sistema nervioso central, particularmente cáncer de cerebro; mieloma múltiple (MM), linfomas tal como el linfoma de Hodgkin, linfoma linfoplasmocitoide, linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa, linfoma de células del manto, linfoma de células grandes de linaje B, linfoma de Burkitt y linfoma anaplásico de células grandes de linfocitos T. Clínicamente, la práctica de los métodos y el uso de las composiciones descritas en el presente documento, darán como resultado una reducción del tamaño o número del crecimiento canceroso y/o una reducción de los síntomas asociados (cuando corresponda). Patológicamente, la práctica del método y el uso de las composiciones descritas en el presente documento, producirán una respuesta patológicamente relevante, tal como: inhibición de la proliferación de células cancerosas, reducción del tamaño del cáncer o tumor, prevención de metástasis adicionales e inhibición de angiogénesis tumoral. El método para tratar dichas enfermedades comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de la invención. El método puede repetirse según sea necesario. En especial, el cáncer puede ser un cáncer cuyas células expresan CD70, mesotelina, CD19, glipicano 3, B7H4, RG-1, CD22 o PTK7. En una realización preferida, el cáncer que se está tratando es cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, linfoma, cáncer de colon, mesotelioma, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, adenocarcinoma, cáncer de hígado o cáncer de mama.

Los inmunoconjugados de esta invención pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, incluyendo anticuerpos, agentes alquilantes, inhibidores de angiogénesis, antimetabolitos, escindidores de ADN, reticulantes de ADN, intercaladores de ADN, aglutinantes del surco menor del ADN, enediínas, inhibidores de la proteína de choque térmico 90, inhibidores de histona desacetilasa, inmunomoduladores, estabilizador de microtúbulos, análogos de nucleósidos (purina o pirimidina), inhibidores de exportación nuclear, inhibidores de proteosoma, inhibidores de topoisomerasa I o II, inhibidores de tirosina cinasa e inhibidores de serina/treonina cinasa. Los agentes terapéuticos específicos incluyen adalimumab, ansamitocina P3, auristatina, bendamustina,

5 bevacizumab, bicalutamida, bleomicina, bortezomib, busulfán, calistatina A, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cetuximab, cisplatino, cladribina, citarabina, criptoficinas, dacarbazina, dasatinib, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, duocarmicina, dinemicina A, eptilonas, etopósido, floxuridina, fludarabina, 5-fluorouracilo, gefitinib, gemcitabina, ipilimumab, hidroxiurea, imatinib, infliximab, interferones, interleucinas, β -lapachona, lenalidomida, irinotecán, maitansina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptapurina, metotrexato, mitomicina C, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, procarbazona, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), 6-tioguanidina, tiotepa, tenipósido, topotecán, trastuzumab, tricostatina A, vinblastina, vincristina y vindesina.

10 Los inmunoconjugados de esta invención pueden formularse y administrarse usando técnicas convencionales para fármacos biológicos. Las formulaciones pueden incluir excipientes, tal como se enseña en Gennaro, ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003). Los excipientes a modo de ejemplo incluyen agentes tamponantes (por ejemplo, fosfatos, acetato, tris(hidroximetil)aminometano (Tris)), solubilizantes y emulsionantes (por ejemplo, polisorbato), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico), sales (por ejemplo, NaCl, KCl) quelantes (por ejemplo, EDTA), carbohidratos (por ejemplo, sacarosa, dextrosa, 15 maltosa, trehalosa), portadores (por ejemplo, albúmina), aminoácidos y sus respectivas sales clorhidrato, citratos, sorbitol, dextrano y similares.

20 Los inmunoconjugados pueden proporcionarse como polvos liofilizados con o sin excipientes, que después pueden disolverse en un medio tal como agua para inyección estéril, solución para inyección de cloruro sódico o solución para inyección de dextrosa, con o sin excipientes adicionales.

25 Como alternativa, el inmunoconjugado puede proporcionarse como una solución concentrada, el cual incluye opcionalmente excipientes, que después se diluye a la concentración deseada antes de la administración. Las formas alternativas incluyen dispersiones, microemulsión y liposomas.

30 Preferentemente, una composición farmacéutica es adecuada para vía intravenosa ("IV"), intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). La frase "administración parenteral" significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intramedular, epidural e intraesternal e infusión. Los modos de administración preferidos incluyen infusión IV, bolo IV, subcutáneo e intramuscular.

35 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" preferentemente da como resultado una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la afección de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos con tumor, una "cantidad terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente un 60 %, y aún más preferentemente en al menos aproximadamente un 80 % en relación con sujetos no tratados. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar los síntomas en un sujeto, que normalmente es un ser humano pero puede ser otro mamífero.

45 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar una respuesta terapéutica. Por ejemplo, se puede administrar una dosis única, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. "Forma de unidad de dosificación" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir la respuesta terapéutica deseada, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Se pueden usar dispositivos como jeringas prellenadas, jeringas de dos cámaras y autoinyectores.

50 La dosis variará de acuerdo con la enfermedad que se esté tratando, los rasgos del paciente, como la edad, el sexo y el genotipo, y la etapa del régimen de tratamiento. Normalmente, la dosis puede ser de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg.

Ejemplos

60 Además, la práctica de esta invención puede entenderse mejor por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración.

Ejemplo 1 - Compuesto (IIa)

65 Este ejemplo describe la síntesis del compuesto **12** de esta invención (también denominado en el presente documento como compuesto (IIa)). Las **FIGS. 1A** y **1B** se combinan para mostrar el esquema para su síntesis.

Compuesto 2. Se añadió ácido trifluoroacético ("TFA", Fisher, 5 ml) a una solución del compuesto **1** (1 g, 2,36 mmol) en diclorometano anhidro ("DCM", Sigma-Aldrich, 5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente ("TA", alrededor de 25 °C) durante 30 min. El análisis por cromatografía líquida de alta presión ("HPLC") mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró y se secó a alto vacío durante una noche para producir 1,15 g del compuesto **2** en forma de un sólido de color parduzco (sal TFA).

Compuesto 4. se añadieron dicarbonato de di-*tert*-butilo (" $(\text{Boc})_2\text{O}$ ", 10,24 g, 46,97 mmol) en metanol anhidro (Acros, 100 ml) y paladio (Aldrich, 10 % sobre carbono activado, 400 mg) a una suspensión de 5-nitroindolo-2-carboxilato de etilo (compuesto **3**, Acros, 10 g, 42,7 mmol). La mezcla de reacción se hidrogenó en H_2 (0,21 MPa (30 psi)) durante 8 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró y se secó a alto vacío para producir el compuesto **4** (10,5 g, 81 %) en forma de un sólido de color amarillo. RMN ^1H (DMSO) δ 11,68 (s, 1 H), 9,19 (s, 1 H), 7,76 (s, 1H), 7,26 (m, 2 H), 7,02 (d, 1 H), 4,30 (c, 2 H), 1,46 (s, 9 H) 1,33 (t, 3 H).

Compuesto 5. Una solución de monohidrato de LiOH (Sigma-Aldrich) en agua (150 ml, 0,57 M) se añadió a una solución del compuesto **4** (10,5 g, 34,5 mmol) en acetonitrilo (150 ml). La mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante una noche, después de lo cual se completó la hidrólisis por análisis de HPLC. La mezcla de reacción se diluyó con agua (300 ml) y se concentró al vacío para retirar el acetonitrilo. La solución resultante se extrajo con EtOAc (2 x 150 ml) y las capas orgánicas se desecharon. La capa acuosa se acidificó a pH 4 añadiendo una solución al 10 % de KHSO_4 (Aldrich). La mezcla resultante se extrajo de nuevo con EtOAc (3 x 150 ml). Las capas orgánicas de las tres últimas extracciones se combinaron, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se concentraron al vacío para producir el compuesto **5** en forma de un sólido de color pardo (9,7 g, 84 %). RMN ^1H (DMSO) δ 12,84 (s, 1 H), 11,65 (s, 1 H), 9,20 (s, 1 H), 7,73 (s, 1 H), 7,23 (m, 2 H), 6,92 (s, 1 H), 1,42 (s, 9 H); EM (IEN) m/z 299 (M+Na) $^+$.

Compuesto 6. Se preparó una solución del compuesto **5** (779 mg, 2,83 mmol) y hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio ("HATU", Oakwood, 1,07 g, 2,83 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra ("DMF", Sigma-Aldrich, 10 ml). Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina ("DIPEA") para ajustar el pH de la solución de reacción a más de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min. Se añadió el compuesto **2** en bruto (1,15 g, estimado como 2,36 mmol), seguido de la adición de más DIPEA para ajustar el pH de la mezcla de reacción a más de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. El análisis por HPLC mostró que la reacción estaba casi completa. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua y después salmuera. Las fases orgánicas se concentraron hasta una suspensión con 2 g gel de sílice. La suspensión se purificó en una columna CombiFlash de 40 g con un gradiente de EtOAc al 0-50 % en hexanos para producir el compuesto **6** en forma de un sólido de color amarillo (1,05 g, 76 %). RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 11,61 (s, 1H), 9,18 (s, 1H), 8,22 (d, 1H), 8,16 (m, 1H), 7,95 (m, 1H), 7,81 (s, 1H), 7,58 (m, 3H), 7,42 (m, 3H), 7,33 (m, 3H), 7,15 (s, 1H), 5,15 (s, 2H), 4,82 (t, 1H), 4,59 (d, 1H), 4,30 (m, 1H), 4,04 (m, 1H), 3,90 (m, 1H), 1,48 (s, 9H).

Compuesto 7. Una mezcla de reacción que consiste en el compuesto **6** (780 mg, 1,34 mmol) y Pd/C (Sigma-Aldrich, 10 %, 150 mg) en DCM anhidro (Sigma-Aldrich, 10 ml) y metanol anhidro (5 ml) se agitó en un globo de hidrógeno durante una noche. El análisis HPLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró a través de CELITETM y el filtrado se concentró para producir el compuesto **7** en forma de un sólido de color ligeramente amarillo (562 mg, 86 %), que se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Compuesto 9. Una solución del compuesto **7** (260 mg, 0,53 mmol), dietilfosforamidita de di-*tert*-butilo (Sigma-Aldrich, 0,58 ml, 2,1 mmol) y tetrazol (Sigma-Aldrich, 0,45 M en acetonitrilo, 14 ml) en tetrahidrofurano ("THF", Sigma-Aldrich, anhidro, 25 ml) se agitó a TA durante 2 h. El análisis por HPLC mostró que el material de partida **7** se transformó completamente al compuesto **8**. Sin aislar el compuesto **8**, se añadió una solución de ácido *m*-cloroperbenzoico ("mCPBA", Sigma-Aldrich, 365 mg, 2,12 mmol) en DCM (anhidro, Sigma-Aldrich, 10 ml). La mezcla de reacción resultante se agitó a TA durante 0,5 h. El análisis HPLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró con 0,5 g de gel de sílice para formar una suspensión. La suspensión se purificó en una columna CombiFlash de 4 g con un gradiente de EtOAc al 10-50 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **9** en forma de un sólido de color blanco (212 mg, 59 %).

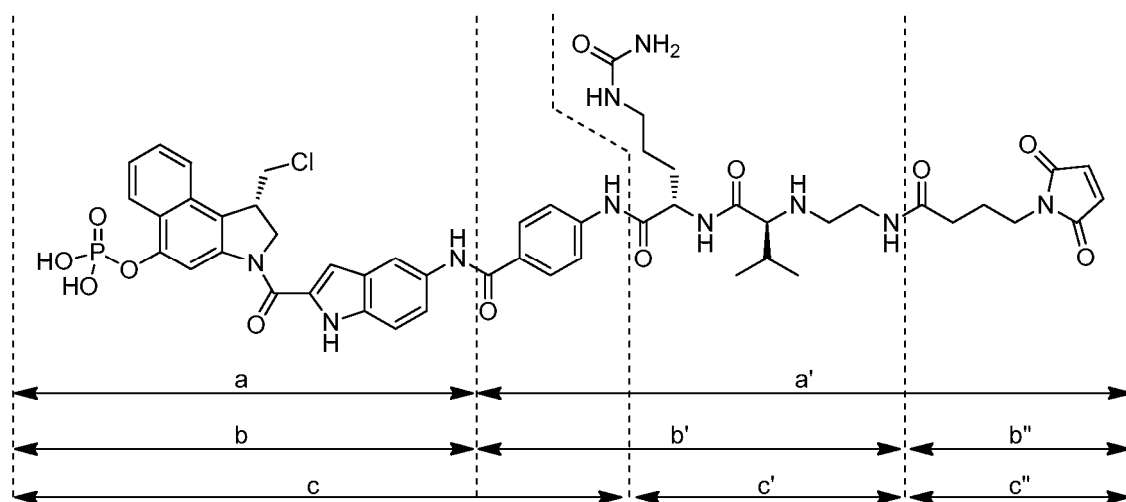
Compuesto 10. Se añadió TFA (Fisher, 3 ml) a una solución del compuesto **9** (212 mg, 0,031 mmol) en DCM anhidro (Sigma-Aldrich, 3 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. El análisis HPLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró y se secó a alto vacío durante una noche para producir el compuesto **10** en forma de un sólido de color parduzco (271 mg). RMN ^1H de sal TFA (DMSO- d_6): δ 11,81 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,12 (d, 1H), 7,94 (d, 1H), 7,55 (m, 1H), 7,42 (m, 3H), 7,18 (s, 1H), 7,02 (d, 1H), 4,78 (t, 1H), 4,68 (d, 1H), 4,32 (s, 1H), 4,02 (m, 1H), 3,90 (m, 1H).

Compuesto 12. El pH de una solución del compuesto **11** (179 mg, 0,25 mmol suponiendo sal mono-TFA, preparado por Sufi *et al.* 2010) y HATU (Oakwood, 84,4 mg, 0,222 mmol) en DMF anhidra (Sigma-Aldrich, 3 ml) se ajustó a más de 8 mediante la adición de DIPEA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min. El análisis por HPLC mostró que la mayoría del compuesto **11** estaba activado. El Compuesto **10** (130 mg, 0,222 mmol suponiendo sal mono-TFA) se añadió a la mezcla de reacción. El pH se ajustó a más de 8 añadiendo DIPEA. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min. El análisis por HPLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se

inyectó en una HPLC preparativa y se purificó con un gradiente de acetonitrilo al 10-100 % en agua (con TFA al 0,1 %) como eluyente. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **12** en forma de un sólido de color blanco (138 mg, 55 %). EM: [M+H] 1055.

- 5 Los expertos en la materia apreciarán que la síntesis descrita anteriormente y en las **figuras 1A y 1B**, implica el ensamblaje convergente de precursores de fragmentos a y a' y que pueden emplearse estrategias sintéticas alternativas, por ejemplo, a través del ensamblaje de precursores con fragmentos b, b' y b'' o fragmentos c, c' y c'', como se muestra a continuación. Las dos últimas estrategias se ilustran en Sufi *et al.* 2010 y pueden adaptarse para la síntesis de compuestos de esta invención, haciendo los cambios necesarios.

10



Ejemplo 2 - Compuesto (Ia)

- 15 Este ejemplo se refiere a la síntesis del compuesto **14**, también denominado en el presente documento como compuesto (Ia). El esquema para la síntesis se muestra en la **FIG. 2**.

20 **Compuesto 13.** Se añadió DIPEA (Aldrich, 17 μ l, 0,1 mmol) a una solución del compuesto **10a** (Sigma-Aldrich, 15,7 mg, 0,051 mmol) y HATU (Oakwood, 19,4 mg, 0,051 mmol) en DMF anhidra (Acros, 1 ml). El pH de la mezcla de reacción era superior a 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min. El análisis por HPLC mostró que el material de partida estaba completamente activado. El compuesto **10** (30 mg, 0,051 mmol suponiendo sal mono-TFA) se añadió a esta solución. Se añadió más DIPEA para ajustar el pH de la mezcla de reacción a más de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. El análisis HPLC mostró que la reacción se había completado. El producto en bruto se purificó por HPLC preparativa con gradiente de acetonitrilo al 10-100 % en agua (con TFA al 0,1 % por volumen) como eluyente para producir el compuesto **13** (25 mg, 71 %) en forma de un sólido de color blanquecino.

30 **Compuesto 14.** Se añadió TFA (VWR, 1 ml) a una solución del compuesto **13** (25 mg, 0,036 mmol) en DCM anhidro (Acros, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. El análisis HPLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró y se purificó por HPLC preparativa con gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 % por volumen) como eluyente para producir el compuesto **14** (21 mg, 82 % suponiendo sal mono-TFA) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN ^1H (DMSO- d_6): δ 11,65 (s, 1H), 9,67 (s, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,07 (d, 2H), 7,91 (m, 2H), 7,69 (d, 2H), 7,35-7,55 (m, 4H), 7,15 (s, 1H), 6,57 (d, 2H), 4,82 (t, 1H), 4,57 (d, 1H), 4,03 (t, 1H), 3,954 (t, 1H). RMN ^{31}P (DMSO- d_6): δ - 5,909 (s, 1P), EM: [M+H] 591.

35 Ejemplo 3 - Compuesto (IIb)

Las **FIGS. 3A-3D** muestran en combinación la síntesis del compuesto **28**, también denominado en el presente documento como compuesto (IIb). Los expertos en la materia apreciarán que la estrategia general empleada en el presente documento corresponde al patrón b/b'/b'' descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

40

La **FIG. 3A** muestra la síntesis de un primer compuesto intermedio **18**.

45 **Compuesto 17.** Una solución de (2-oxoetil)carbamato de *tert*-butilo (compuesto **16**, Aldrich, 5 g, 31,4 mmol) en metanol (anhidro, Acros, 15 ml) se añadió a una solución de 2-amino-3-metilbutanoato de (*S*)-metilo (compuesto **15**, BaChem, sal HCl, 5,26 g, 31,4 mmol), NaOAc (Aldrich, 10,3 g, 82,06 mmol) en metanol (anhidro, Acros, 65 ml). Después, se añadió NaBH_3CN (Aldrich, 3,95 g, 62,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 22,5 $^\circ\text{C}$ durante 16 h y se concentró hasta una suspensión. La suspensión se disolvió en agua (100 ml) y la solución resultante se extrajo con EtOAc (3 X 100 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera (1x100 ml), se concentraron y se secaron al vacío para producir el compuesto **17** (aceite, 9,4 g en bruto). [M+H] 275.

Compuesto 18. Una solución de hidrato de LiOH (Aldrich, 2,88 g, 68,6 mmol) en agua (40 ml) se añadió a una solución del compuesto **17** en bruto (9,4 g) en metanol (40 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante una noche y se diluyó con agua (40 ml). La solución resultante se extrajo con DCM (40 ml). La capa acuosa se separó y se acidificó con una solución de KHSO₄ (Aldrich, 20 % en agua) a pH 5. La suspensión se filtró y el sólido se secó a alto vacío para producir el compuesto **18** (4,85 g, 60,2 % del compuesto **15**) en forma de un sólido de color blanco. EM: [M+H] 261. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 6,82 (t, 1 H), 3,06 (m, 2 H), 2,83 (d, 1 H), 2,62 (m, 2 H), 2,31 (m, 1 H), 1,88 (m, 1 H), 1,38 (s, 9 H), 0,86 (d, 6 H).

La **FIG. 3B** muestra la síntesis de un segundo compuesto intermedio **22**.

Compuesto 21. Se añadieron 4-aminobenzoato de *tert*-butilo (compuesto **19**, Fluka, 8,75 g, 45,3 mmol), clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida ("EDC", Fluka, 8,68 g, 45,3 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (Chem-Impex, 6,12 g, 45,3 mmol) en DMF anhidra (Acros, 150 ml), y CuCl₂ (Aldrich, 6,08 g, 45,3 mmol) a una solución de N_α-Fmoc-L-citrulina (compuesto **20**, Fluka, 15 g, 37,74 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (600 ml) y la solución resultante se lavó con una solución de Na₂CO₃ (5 %, 200 ml), solución saturada de NaHCO₃ (1 x 200 ml) y salmuera (1 x 200 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se concentraron para producir el compuesto **21** en bruto, en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 10,39 (s, 1 H), 7,82 (c, 4 H), 7,68 (m, 4 H), 7,28-7,40 (m, 5 H), 6,01 (t, 1 H), 5,42 (s, 2 H), 4,10-4,29 (m, 4 H), 2,90-3,05 (m, 2 H), 1,32-1,70 (m, 13 H); EM: [M+H] 573.

Compuesto 22. Se añadió piperidina (Aldrich, 14 ml) a una solución del compuesto **21** en bruto, en DMF anhidra (Acros, 140 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. El análisis HPLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se disolvió en EtOAc (600 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (1 x 200 ml), se secó sobre MgSO₄ anhidro y se concentró con gel de sílice hasta una suspensión. La suspensión se purificó por cromatografía ultrarrápida con un gradiente de metanol al 0-20 % en DCM como eluyente para producir el compuesto **22** en forma de un sólido de color blanco (9,5 g, rendimiento del 72 % a partir del compuesto **20**). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 7,82 (d, 2 H), 7,72 (d, 2 H), 5,97 (t, 1 H), 5,38 (s, 2 H), 3,43 (m, 1 H), 2,98 (t, 2 H), 1,30-1,62 (m, 13 H); EM: [M+H] 351.

La **FIG. 3C** muestra la síntesis de un tercer compuesto intermedio **25**.

Compuesto 23. Se añadió DIPEA (Aldrich) a una solución del compuesto **18** (1,5 g, 5,77 mmol), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)-fosfonio ("BOP", BaChem, 2,87 g, 6,5 mmol) y el compuesto **22** (1,84 g, 5,26 mmol) en DMF (Acros, anhidra, 15 ml), en una cantidad suficiente para ajustar el pH de la solución a más de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h. El análisis HPLC mostró que la reacción se había completado. Se añadieron DCM (100 ml) y una solución saturada de NaHCO₃ (100 ml) a la mezcla de reacción. La capa acuosa se extrajo con DCM (2 x 25 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron con gel de sílice (8 g) hasta una suspensión. La suspensión se purificó en una columna CombiFlash de 80 g con un gradiente de metanol al 0-10 % en DCM como eluyente. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **23** en forma de un sólido de color blanco (2,1 g, 68 %). EM: [M+H] 593.

Compuesto 24. Se añadió HCl en diocesano (Aldrich, 4 N, 7 ml) a una solución del compuesto **23** (1,8 g, 3,03 mmol) en acetonitrilo (grado de HPLC, Aldrich, 20 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h. El análisis HPLC mostró que la reacción se había completado. El producto se recogió por filtración y se secó a alto vacío durante una noche para producir el compuesto **24** en forma de un sólido de color casi blanco (1,45 g, 94 %). EM: [M+H] 437.

Compuesto 25. Se añadió DIPEA a una solución del compuesto **24** (200 mg, 0,39 mmol, suponiendo una doble sal HCl) y (Boc)₂O (94,2 mg, 0,43 mmol) en DMF (anhidra, 2 ml), en una cantidad suficiente para ajustar el pH de la mezcla de reacción a más de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h. El análisis HPLC mostró que la reacción se había completado. Se añadió éter di etílico (20 ml) y la mezcla se agitó a TA durante 15 min. El producto se separó como un semisólido. El disolvente se decantó y el producto se secó a alto vacío durante una noche para producir el compuesto **25** en forma de un sólido de color blanco (178 mg, 85 %, sal HCl). EM: [M+H] 537. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ 10,51 (s, 1 H), 8,85 (a, 1 H), 7,88 (d, 2 H), 7,71 (d, 2 H), 7,03 (a, 1 H), 6,18 (d, 1 H), 5,42 (a, 2 H), 4,48 (s, 1 H), 2,75-3,10 (m, 7 H), 2,18 (a, 1 H), 1,42-1,78 (m, 4 H), 1,38 (s, 9 H), 0,92 (m, 6 H).

La **FIG. 3D** muestra la finalización de la síntesis del compuesto **28**, también denominado en el presente documento como compuesto (IIb).

Compuesto 26. Se añadió DIPEA (Aldrich, 0,142 ml, 0,816 mmol) a una solución del compuesto **25** (394 mg, 0,734 mmol) y HATU (Oakwood, 186 mg, 0,489 mmol) en DMF (Acros, anhidra, 3 ml). El pH de la mezcla de reacción era superior a 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min. Se añadió el compuesto **10** (Ejemplo 1, 192 mg, 0,407 mmol). Se añadió más DIPEA para mantener el pH de la mezcla de reacción por encima de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. La mezcla de reacción se inyectó en una HPLC preparativa y se purificó por elución con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **26** (205 mg, 51 %) en forma de un sólido de color

blanco. EM: [M+H] 990.

Compuesto 27. Se añadió TFA (VWR, 5 ml) a una solución del compuesto **26** (205 mg, 0,207 mmol) en DCM (Acros, anhídrido, 5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. La mezcla de reacción se concentró y se secó por congelación para producir el compuesto **27** como su sal TFA (210 mg, 100 %). EM: [M+H] 890.

Compuesto 28. Se añadió DIPEA (Aldrich, 0,147 ml, 0,842 mmol) a una solución de ácido 3-mercaptopropanoico (Aldrich, 59,6 mg, 0,562 mmol), compuesto **27** (100 mg, 0,112 mmol) y BOP (Aldrich, 124 mg, 0,281 mmol) en DMF (Acros, anhídrido, 2 ml). El pH de la mezcla de reacción era superior a 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se inyectó en una HPLC preparativa y se purificó por elución con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,01 %) para producir el compuesto **28** (45 mg, 45,5 %). EM: [M+H] 978.

Ejemplo 4 - Preparación de inmunocóncugados

El siguiente es un procedimiento general ilustrativo para la preparación de inmunocóncugados de esta invención, basado en la introducción de grupos tiol libres en un anticuerpo por reacción de grupos lisina s-amino con 2-iminotiolano, seguido de reacción con un resto profármaco que contiene maleimida, tal como el compuesto (IIa). Inicialmente, se cambia el tampón del anticuerpo a tampón fosfato 0,1 M (pH 8,0) que contiene NaCl 50 mM y ácido dietilentiámino pentaacético 2 mM ("DTPA") y se concentra hasta 5-10 mg/ml. La tiolación se logra mediante la adición de 2-iminotiolano al anticuerpo. La cantidad de 2-iminotiolano a añadir se puede determinar mediante un experimento preliminar y varía de un anticuerpo a otro. En el experimento preliminar, se añade una titulación de cantidades crecientes de 2-iminotiolano al anticuerpo, y después de la incubación con el anticuerpo durante 1 h TA (25 °C), el anticuerpo se desala en tampón HEPES 50 mM pH 6,0 usando una columna SEPHADEX™ G-25 y el número de grupos tiol introducidos se determina rápidamente por reacción con ditiodipiridina ("DTDP"). La reacción de los grupos tiol con DTDP da como resultado la liberación de tiopiridina, lo que se puede controlar espectroscópicamente a 324 nm. Se utilizan normalmente muestras con una concentración de proteína de 0,5-1,0 mg/ml. Se puede utilizar la absorbancia a 280 nm para determinar con precisión la concentración de proteína en las muestras, y luego se incuban una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre de etanol 5 mM) durante 10 min a TA. También se incuban muestras blanco de tampón solo más DTDP. Después de 10 min, se mide la absorbancia a 324 nm y se cuantifica el número de grupos tiol utilizando un coeficiente de extinción para tiopiridina de 19,800 M⁻¹.

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

Después de verificar la cantidad de tioles introducidos, el resto enlazador del fármaco se añade a un exceso molar de 3 veces por tiol. Se permite que la reacción de conjugación proceda en un tampón de conjugación que también contiene una concentración final de dimetilsulfóxido al 5 % (DMSO) o un disolvente alternativo similar. Habitualmente, la solución madre del enlazador de fármaco se disuelve en DMSO al 100 %. La solución madre se añade directamente al anticuerpo tiolado, la cual tiene suficiente DMSO añadido para llevar la concentración final al 10 %, o se diluye previamente en un tampón de conjugación que contiene una concentración final de DMSO al 10 %, seguido de la adición a un volumen igual de anticuerpo tiolado.

La mezcla de reacción de conjugación se incubó a TA durante 2 h con agitación. Después de la incubación, la mezcla de reacción de conjugación se centrifuga y se filtra a través de un filtro de 0,2 µm. La purificación del cóncugado se puede lograr mediante cromatografía usando varios métodos. En un método, el cóncugado se purifica usando cromatografía de exclusión por tamaño en una columna SEPHACRYL™ S200 preequilibrada con tampón HEPES 50 mM pH 7,2 que contiene glicina 5 mM y NaCl 50 mM. La cromatografía se lleva a cabo a un caudal lineal de 28 cm/h. Las fracciones que contienen cóncugado se recogen, se agrupan y se concentran. En un método alternativo, la purificación se puede lograr mediante cromatografía de intercambio iónico. Las condiciones varían de un anticuerpo a otro y deben optimizarse en cada caso. Por ejemplo, la mezcla de reacción cóncugada anticuerpo-fármaco se aplica a una columna SP-SEPHAROSE™ preequilibrada en HEPES 50 mM pH 5,5 que contiene glicina 5 mM. El cóncugado de anticuerpo se eluye usando un gradiente de NaCl 0-1 M en tampón de equilibrio a pH 5,5. Las fracciones relevantes que contienen el inmunocóncugado se agrupan y se dializan contra el tampón de formulación (tampón HEPES 50 mM pH 7,2 que contiene glicina 5 mM y NaCl 100 mM).

Siguiendo el procedimiento anterior, los inmunocóncugados del compuesto (IIa) se prepararon con un anticuerpo monoclonal humano contra PSMA (2A10, Huang *et al.* 2009 y Cardarelli *et al.* 2011); un anticuerpo monoclonal humano contra mesotelina (6A4, Terrett *et al.* 2009b), un anticuerpo monoclonal humano contra CD70 (2H5, Terrett *et al.* 2009a), y un anticuerpo monoclonal humano contra CD19 (21D4, Rao-Naik *et al.* 2009). Igualmente se prepararon inmunocóncugados comparativos con el compuesto (A).

Los expertos en la materia entenderán que las condiciones y la metodología descritas anteriormente son a modo de

ejemplo y que en la técnica se conocen otros enfoques para la conjugación y que pueden usarse en la presente invención.

Ejemplo 5 - Ensayos de incorporación de timidina tritiada (timidina-³H)

5 Este ejemplo describe, en líneas generales, el procedimiento utilizado para analizar la actividad antiproliferativa de los inmunoconjugados de esta invención. Se obtuvieron líneas celulares tumorales humanas en la American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos, y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones de la ATCC. Se generaron células CHO que expresaban mesotelina transfectando células CHO con
10 ADN que contenía el gen de mesotelina humana y seleccionando clones estables que expresaban mesotelina humana. Para los ensayos de timidina-³H, las células se sembraron a $1,0 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 3 horas, respectivamente. A los pocillos se añadieron diluciones en serie (1:3) del conjugado. Las placas se incubaron durante 72 h. Durante las últimas 24 h del período de incubación total, las placas se pulsaron con $1,0 \mu\text{Ci}$ de timidina-³H por pocillo, se recogieron y se realizó su lectura en un contador de centelleo Top Count (Packard Instruments,
15 Meriden, CT). Los valores de CE_{50} - la concentración a la cual un agente inhibe o reduce la proliferación celular en un 50 % de la inhibición máxima - se determinaron utilizando el programa informático PRISM™, versión 4.0 (programa informático GraphPad, La Jolla, CA, Estados Unidos).

20 En las figuras **4A-4F** se muestran los resultados de la actividad antiproliferativa, comentada anteriormente en el presente documento.

Ejemplo 6 - Desfosforilación mediante lisados celulares

25 Este ejemplo demuestra que los compuestos de MGBA-seco que forman un profármaco con fosfato de acuerdo con esta invención, pueden desfosforilarse mediante lisados de células tumorales humanas.

Células 786-O, en forma de gránulos congelados con una cantidad estimada de 10^7 células por tubo de agitación vorticial, se resuspendieron y homogeneizaron en 500 μl de tampón de lisis (NaOAc 25 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 0,25 M, Triton X-100 al 0,1 %, pH 5,5). La homogeneización implicó el mezclado con agitación vorticial durante 30 segundos, seguido de enfriamiento en hielo durante un minuto. En cada tubo, se realizaron tres ciclos de agitación vorticial y enfriamiento. Después, las muestras celulares se mezclaron tres veces mediante cizallamiento en una aguja de calibre 19.

35 Después de la homogeneización, el ADN del lisado celular se hidrolizó usando ADNasa BENZONASE™. En primer lugar, las muestras se pusieron en MgSO_4 1 mM. Después de mezclar, a cada vial de lisado (4 $\mu\text{l}/\text{ml}$, v/v, concentración final), se añadieron 2 μl de ADNasa BENZONASE™ (pura). Después, las muestras se conservaron a TA durante 15 minutos y a continuación se enfriaron en hielo. Para esta etapa, el éxito de la actividad ADNasa se puso de manifiesto debido a la aparición de precipitado floculante. Después, para eliminar los restos celulares, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a velocidad máxima en una microcentrífuga. El sobrenadante se congeló a -70°C
40 para su uso posterior. La concentración proteica del lisado se determinó utilizando la metodología de determinación de proteínas BCA de Pierce (Thermo Scientific). Se descubrió que, en este estudio, las muestras contenían 2,85 mg/ml de proteína.

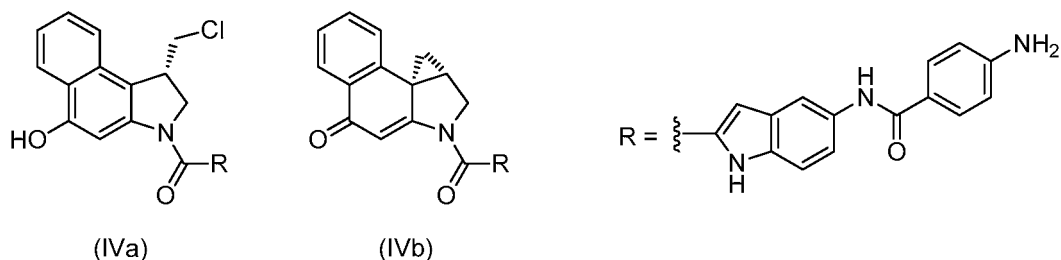
45 Se preparó una disolución madre de 2 000 μM del compuesto de fórmula (Ia). El lisado se diluyó a 2,1 mg/ml en tampón de lisado. Para la reacción, se añadieron 5 μl de la disolución madre de compuesto (Ia) a 95 μl de lisado. Las concentraciones finales fueron 100 μM de compuesto (Ia) en lisado que contenía 2 mg/ml de proteína. Un tampón que contenía NaOAc 25 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 0,25 M, Triton X 100 al 0,1 % y MgSO_4 1 mM, proporcionó un tampón a un pH de 5,5.

50 Se emplearon controles negativos, con tampón de lisado en lugar de lisado celular, con ADNasa BENZONASE™ y también se añadió MgSO_4 .

Las muestras de ensayo y los controles se colocaron en un bloque caliente ajustado a 37°C . A intervalos de tiempo predeterminados (5 minutos, 1, 2, 4 y 8 horas), se retiraron alícuotas de 50 μl , y la reacción en cada alícuota se detuvo mediante la adición de 150 μl (3X) de etanol frío. Las muestras se conservaron en hielo durante una hora y se centrifugaron para eliminar la proteína. El sobrenadante se reservó para el análisis mediante UPLC, con las siguientes condiciones:

60 Columna: UPLC Waters HSS T3 columna C18 de 2,1 x 50 mm
Fase móvil: Tampón "A": agua / TFA al 0,1 %; Tampón "B": Acetonitrilo / TFA al 0,1 %
Sistema de HPLC: UPLC Waters
Volumen de inyección: 4 μl
Elución: "B" del 25 a 140 %, en 1,8 minutos
Caudal: 1 ml/min
65 Detección: A340

Después de la reacción, se monitorizó la producción de los compuestos (IVa) y (IVb), que son las formas seco y ciclopropilo del compuesto (Ia) desfosforilado, respectivamente.



5 Se descubrió que la desfosforilación era bastante rápida, finalizando al cabo de 8 horas. Dado que el pH de la mezcla de reacción era de 5,5, aproximándose al encontrado en los orgánulos lisosómicos, los resultados implican a la fosfatasa ácida en la reacción de desfosforilación.

10 Se realizó un experimento similar, utilizando lisados de células H226. Se descubrió que la desfosforilación finalizaba al cabo de 3 horas.

Ejemplo 7 - Desfosforilación mediante microsomas hepáticos

15 Este ejemplo demuestra la desfosforilación del compuesto (Ia) mediante enzimas microsómicas hepáticas humanas y de ratón.

Los microsomas hepáticos procedentes de fuentes hepáticas combinadas se obtuvieron en Xenotech (número de pieza H-0630). Se suministraron a una concentración proteica nominal de 20 mg/ml en una solución de sacarosa al 20 %. El contenido proteico se verificó con análisis BCA utilizando reactivo de Thermo-Fisher.

20 Los microsomas hepáticos humanos se diluyeron a 8,42 mg/ml en tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl al 0,9 %, pH 7,4). La cantidad de dilución se diseñó para suministrar exactamente 0,8 mg por 95 µl de un volumen de reacción final de 100 µl. Después, las disoluciones madre se diluyeron en serie a una relación 1: 1 de volumen respecto a volumen, produciendo diez disoluciones madre para suministrar entre 8 y 0,0156 mg/ml de microsomas por disolución madre.

30 Se preparó una disolución madre de 2 000 µM del compuesto de fórmula (Ia). Para las reacciones, en un bloque caliente a 37° C, se dejaron equilibrar 95 µl de cada disolución madre de microsomas. Después, a cada vial de reacción, se añadió una alícuota de 5 µl de la disolución madre de compuesto (Ia) a intervalos exactos de 30 segundos escalonados. La concentración final del compuesto (Ia) fue de 100 µM. Las muestras se dejaron reaccionar a temperatura durante 1 hora, después de lo cual la reacción se detuvo con la adición de 100 µl de etanol frío. La detención se realizó nuevamente a intervalos exactos de 30 segundos, de tal manera que se dejó que cada vial reaccionara durante 1 hora exactamente. Las muestras se prepararon por duplicado. La proteína se dejó precipitar en hielo durante 30 minutos. El sobrenadante se recogió después de la centrifugación. El análisis cromatográfico UPLC se realizó utilizando las mismas condiciones que las descritas en el ejemplo anterior, nuevamente monitorizando la producción de los compuestos (IVa) y (IVb). En la **figura 5** se muestran trazados cromatográficos que muestran la conversión del compuesto (Ia) en los compuestos (IVa) y (IVb), en función de la concentración de microsomas.

40 La **figura 6** es un gráfico de la cantidad de compuestos (IVa) y (IVb) producidos a partir del compuesto (Ia) después de 60 minutos en función de la concentración de microsomas. La tasa de producción fue esencialmente lineal para concentraciones de microsomas entre 0,00156 y 0,0125 mg/ml. Usando los datos en este intervalo, se calculó una tasa para la producción de los compuestos (IVa) y (IVb) de 0,0054 µmol/min/mg.

45 Empleando el mismo procedimiento pero con microsomas de hígado de ratón (Xenotech, número de pieza M-3000), se obtuvo una tasa de 0,0018 µmol/min/mg.

Ejemplo 8 - Compuesto (IIc)

50 Este ejemplo y la **FIG. 7** describen la síntesis del compuesto **30**, también denominado en el presente documento como compuesto (IIc).

55 **Compuesto 30.** Se añadió DIPEA (Aldrich, 7,85 µl, 0,045 mmol) a una solución del compuesto **27** (20 mg, 0,022 mmol), ácido 5-azidopentanoico **29** (BaChem, 6,43 mg, 0,045 mmol) y BOP (Aldrich, 19,87 mg, 0,045 mmol) en DMF (Acros, anhídrico, 0,5 ml). El pH de la mezcla de reacción permaneció por encima de 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se inyectó en una columna de HPLC preparativa y se purificó por elución con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %) para producir el compuesto **30** (5 mg, 21,9 %). EM:

[M+H] 1015.

El compuesto **30** (Ilc) tiene un grupo funcional reactivo azido, lo que lo hace adecuado para la conjugación que emplea química "click".

Ejemplo 9 - Compuesto (IId)

Este ejemplo y la **FIG. 8** describen la síntesis del compuesto **34**, también denominado en el presente documento como compuesto (IId).

Compuesto 32. Se añadió dicitohexilcarbodiimida ("DCC", Novabiochem, 277 mg, 1,098 mmol) a una solución de 1-hidroxipirrolidin-2,5-diona (Acros, 126 mg, 1,098 mmol), ácido (Boc-aminoxil)acético **31** (TCI, 200 mg, 1,046 mmol) en 1,4-dioxano (Aldrich, anhidro, 2 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 5 h. La mezcla de reacción se filtró a través de CELITE™ y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en EtOAc (30 ml), se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ (20 ml) y agua (20 ml). Las fases orgánicas se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **32** (275 mg, 91,2 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,66 (s, 1H), 4,78 (s, 2H), 2,87 (s, 4H), 1,49 (s, 9H).

Compuesto 33. Se añadió DIPEA (Aldrich, 36,5 µl, 0,21 mmol) a una solución del compuesto **32** (20 mg, 0,07 mmol) y compuesto **27** (31 mg, 0,035 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **33** (24 mg, 64,5 %). EM: [M+H] 1063.

Compuesto 34. Se añadió TFA (Acros, 0,5 ml) a una solución del compuesto **33** (24 mg, 0,023 mmol) en DCM (Aldrich, anhidro, 0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 0,5 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **34** (10 mg, 45,7 %). EM: [M+H] 963.

El compuesto **34** (IId) tiene un grupo funcional reactivo hidroxilamina, lo que lo hace adecuado para la conjugación por formación de oxima con un anticuerpo modificado para contener un grupo cetona, por ejemplo mediante la incorporación del aminoácido no natural de p-acetilfenilalanina.

Ejemplo 10 - Compuesto (Ile)

Este ejemplo y las **FIGS. 9A-9B** en combinación, describen la síntesis del compuesto **48**, también denominado en el presente documento como compuesto (Ile).

Compuesto 37. Se añadió cloruro de cobre (II) (Aldrich, 1,252 g, 9,31 mmol) a una solución de 4-aminobenzoato de *tert*-butilo **36** (Fluka, 1,5 g, 7,76 mmol), leucina protegida con Fmoc **35** (BaChem, 2 g, 5,66 mmol), EDC (Fluka, 1,786 g, 9,31 mmol) y *t*-butanol (Chem-impex, 1,426 g, 9,31 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 15 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla de reacción se trató con EtOAc (30 ml), agua (30 ml) y salmuera (30 ml). Las fases orgánicas se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **37** (3,7 g). EM: [M+H] 529.

Compuesto 38. Se añadió piperidina (Aldrich, 3 ml) a una solución del compuesto **37** en bruto (3,7 g) en DMF (Aldrich, anhidra, 15 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 1 h y después se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **38** (1,7 g, 70,8 % en dos etapas). EM: [M+H] 307.

Compuesto 41. Se añadió DIPEA (Aldrich, 0,97 ml, 5,5 mmol) a una solución de clorhidrato de éster *t*-butílico de alanina **39** (BaChem, 0,4 g, 2,22 mmol) y compuesto **40** (Bachem, 1 g, 2,22 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 20 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y se trató con EtOAc (100 ml), agua (50 ml) y salmuera (50 ml). Las fases orgánicas se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **41** (1,3 g). EM: [M+H] 481.

Compuesto 42. Se añadió TFA (Acros, 10 ml) a una solución del compuesto **41** en bruto (1,3 g) en DCM (Acros, anhidro, 10 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 1 h, se concentró y se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-100 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **42** (0,68 g, 72,2 % en dos etapas). EM: [M+H] 425.

Compuesto 43. Se añadió DIPEA (Aldrich, 0,246 ml, 1,413 mmol) a una solución del compuesto **38** (289 mg, 0,842 mmol), compuesto **42** (200 mg, 0,471 mmol) y BOP (Bachem, 313 mg, 0,707 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 3 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h y se trató con EtOAc (30 ml), agua (20 ml) y salmuera (20 ml). Las fases orgánicas se concentraron y se purificaron en una columna CombiFlash™ de 4 g, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 0-60 % en hexano. Las fases orgánicas se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para

producir el compuesto **43** (126 mg, 37,5 %). EM: [M+H] 713.

Compuesto 44. Se añadió TFA (Acros, 3 ml) a una solución del compuesto **43** (126 mg) en DCM (Acros, anhidro, 3 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 0,5 h, se concentró y se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-100 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **44** (84 mg, 72 %). EM: [M+H] 657.

Compuesto 45. Se añadió DIPEA (Aldrich, 21 µl, 0,122 mmol) a una solución del compuesto **44** (40 mg, 0,061 mmol), HATU (Oakwood, 18,53 mg, 0,049 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 1 ml). El pH de la mezcla de reacción era superior a 8. La mezcla de reacción se agitó a TA durante 15 min. A esta mezcla de reacción se le añadió el compuesto **10** (34,5 mg, 0,073 mmol), seguido de DIPEA adicional (Aldrich, 21 µl, 0,122 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min y se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-100 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **45** (20 mg, 30 %). EM: [M+H] 1110.

Compuesto 46. Se añadió piperidina (Aldrich, 0,2 ml, 2,02 mmol) a una solución del compuesto **45** (20 mg) en DMF (Acros, anhidra, 0,5 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **46** (8 mg, 50 %). EM: [M+H] 888.

Compuesto 48. Se añadió DIPEA (Aldrich, 10 µl, 0,006 mmol) a una solución del compuesto **46** (8 mg, 0,009 mmol) y 6-maleimidohexanoto de N-succinimidilo **47** (TCI, 5,55 mg, 0,018 mmol) en DMF (Acros, anhidra, 1 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-100 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **48** (2 mg, 20 %). EM: [M+H] 1081.

El tripéptido Leu-Ala-Leu del compuesto **48** (Ile) es un motivo de sustrato para la enzima CD10, por lo que los conjugados preparados con este compuesto deberían ser susceptibles de escisión por CD10.

30 *Ejemplo 11 - Compuesto (Ilf)*

Este ejemplo y las **FIGS. 10A-10B** en combinación, describen la síntesis del compuesto **56**, también denominado en el presente documento como compuesto (Ilf).

Compuesto 50. Se añadió cloruro de cobre (II) (Aldrich, 0,913 g, 6,79 mmol) a una solución de 4-aminobenzoato de *tert*-butilo **36** (Fluka, 1,312 g, 6,79 mmol), isoleucina protegida con Fmoc **49** (BaChem, 2 g, 5,66 mmol), EDC (Fluka, 1,302 g, 6,79 mmol) y *t*-butanol (Chem-impex, 1,040 g, 6,79 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 20 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla de reacción se trató con EtOAc (30 ml), agua (30 ml) y salmuera (30 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron en una columna CombiFlash™ de 40 g, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 0-20 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **50** (0,85 g, 28,4 %). EM: [M+H] 529.

Compuesto 51. Se añadió piperidina (Aldrich, 0,5 ml) a una solución del compuesto **50** en bruto (3,7 g) en DMF (Aldrich, anhidra, 5 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se trató con EtOAc (20 ml), agua (15 ml) y salmuera (15 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se concentraron y se purificaron en una columna CombiFlash™ de 12 g, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 0-75 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **51** (0,38 g, 76,9 %). EM: [M+H] 307.

Compuesto 52. Se añadió DIPEA (Aldrich, 0,228 ml, 1,305 mmol) a una solución del compuesto **51** (0,2 g, 0,653 mmol) y el compuesto **40** (Bachem, 294 mg, 0,653 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 3 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se trató con EtOAc (50 ml), agua (20 ml) y salmuera (20 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron en una columna CombiFlash™ de 4 g, eluyendo con un gradiente de EtOAc al 0-40 % en hexano. Las fracciones que contenían el producto se concentraron hasta un residuo, que se secó a alto vacío para producir el compuesto **52** (178 mg, 42,5 %). EM: [M+H] 642.

Compuesto 53. Se añadió TFA (Acros, 3 ml) a una solución del compuesto **52** (178 mg, 0,277 mmol) en DCM (Acros, anhidro, 3 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a TA durante 0,5 h. La mezcla de reacción se concentró y se secó por congelación para producir el compuesto **53** (145 mg, 89,5 %). EM: [M+H] 586.

El dipéptido Leu-Ile del compuesto **56** (Ilf) es un motivo de sustrato para la enzima cathepsina E, por lo que los inmunconjugados elaborados con este compuesto deben ser susceptibles de escisión por la cathepsina E.

65 *Ejemplo 12 - Compuesto (Ilg)*

Este ejemplo y las **FIGS. 11A-11B** en combinación, describen la síntesis del compuesto **67**, también denominado en

el presente documento como compuesto (Ilg).

Compuesto 57. Se añadió cloruro de cobre (II) (Aldrich, 0,913 g, 6,79 mmol) a una solución de 4-aminobenzoato de metilo **56** (Aldrich, 0,913 g, 6,05 mmol), citrulina protegida con Fmoc **20** (BaChem, 2 g, 5,04 mmol), EDC (Fluka, 1,160 g, 6,05 mmol) y *t*-butanol (Chem-impex, 0,926 g, 6,05 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 20 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante la noche. La mezcla de reacción se trató con EtOAc (100 ml), agua (30 ml), y salmuera (30 ml). Las fases orgánicas se concentraron y se purificaron en una columna CombiFlash™ de 40 g, eluyendo con un gradiente de metanol al 0-20 % en DCM. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **57** (1,825 g, 68,2 %). EM: [M+H] 531.

Compuesto 58. Se añadió piperidina (Aldrich, 0,2 ml) a una solución del compuesto **57** (1,25 g, 3,437 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 3 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se trató con EtOAc (40 ml), agua (15 ml) y salmuera (15 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se concentraron y se purificaron en una columna CombiFlash™ de 12 g, eluyendo con un gradiente de metanol al 0-30 % en DCM. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **58** (0,778 g, 73,1 %). EM: [M+H] 309.

Compuesto 59. Se añadió DIPEA (Aldrich, 1,0 ml, 5,71 mmol) a una solución del compuesto **58** (778 mg, 2,52 mmol), compuesto **18** (655 mg, 2,52 mmol) y BOP (Bachem, 1,12 g, 2,52 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 10 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se trató con EtOAc (50 ml), agua (20 ml) y salmuera (20 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron en una columna CombiFlash™ de 40 g, eluyendo con un gradiente de metanol al 0-15 % en DCM. Las fases orgánicas se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **59** (1,06 g, 76 %). EM: [M+H] 551.

Compuesto 60. Se añadió TFA (Acros, 5 ml) a una solución del compuesto **59** (1,06 g, 1,92 mmol) en DCM (Acros, anhidro, 5 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 0,5 h. La mezcla de reacción se concentró y se secó por congelación para producir el compuesto **60** como su sal TFA (1,09 g). EM: [M+H] 451.

Compuesto 62. Se añadió DIPEA (Aldrich, 1,02 ml, 5,838 mmol) a una solución del compuesto **60** (500 mg, 1,109 mmol), ácido 6-((*tert*-butoxicarbonil)amino)hexanoico **61** (Fluka, 450 mg, 1,946 mmol) y BOP (Bachem, 0,720 g, 1,629 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 10 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se trató con EtOAc (60 ml), agua (30 ml) y salmuera (30 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron y se purificaron en una columna CombiFlash™ de 12 g, eluyendo con un gradiente de metanol al 0-20 % en DCM. Las fases orgánicas se combinaron, se concentraron y se secaron a alto vacío para producir el compuesto **62** (427 mg, 58 %). EM: [M+H] 664.

Compuesto 63. Se añadió una solución de LiOH (Aldrich, 150 mg en 10 ml de agua) a una solución del compuesto **62** (0,427 g, 0,643 mmol) en acetona (Baker, 10 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 3 h y se neutralizó con ácido acético (Fisher, glacial, 0,3 ml). La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **63** (325 mg, 77,8 %). EM: [M+H] 650.

Compuesto 64. Se añadió DIPEA (Aldrich, 27 µl, 0,153 mmol) a una solución del compuesto **63** (59,5 mg, 0,092 mmol), HATU (Oakwood, 23,21 mg, 0,061 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 30 min. A esto se le añadió el compuesto **10** (36 mg, 0,076 mmol), seguido de DIPEA adicional (Aldrich, 27 µl, 0,153 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h y se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **64** (38 mg, 55,7 %). EM: [M+H] 1103.

Compuesto 65. Se añadió TFA (Acros, 1 ml) a una solución del compuesto **64** (38 mg, 0,034 mmol) en DCM (Acros, anhidro, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 0,5 h. La mezcla de reacción se concentró y se secó por congelación para producir el compuesto **65** como su sal TFA (43 mg). EM: [M+H] 1003.

Compuesto 66. Se añadió DIPEA (Aldrich, 29 µl, 0,159 mmol) a una solución del compuesto **32** (15,4 mg, 0,053 mmol) y compuesto **65** (43 mg, 0,043 mmol) en DMF (Aldrich, anhidra, 1 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **66** (22 mg, 43,5 %). EM: [M+H] 1176.

Compuesto 67. Una solución del compuesto **66** (22 mg, 0,019 mmol) en una solución 4 N de HCl 1,4-diocesano (Aldrich, 10 ml) se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró y se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un gradiente de acetonitrilo al 10-65 % en agua (con TFA al 0,1 %). Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se liofilizaron para producir el compuesto **67** (12 mg, 58,7 %). EM: [M+H] 1076.

Ejemplo 13 - Resultados in vivo

Las **figuras 12A-12I** demuestran la eficacia *in vivo* de los inmunoconjugados de esta invención en estudios de xenoinjerto con ratones, contra varios tipos de cáncer.

5 *Estudio con células OVCAR3.* Cinco millones de células de cáncer de ovario OVCAR3, resuspendidas en solución salina tamponada con fosfato ("PBS", *phosphate buffered saline*) 0,1 ml más matrigel 0,1 ml, se implantaron por vía subcutánea en el costado de ratones SCID. Las mediciones tumorales comenzaron 23 días después, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de 6 ratones, cada uno con un tamaño promedio de tumor de 90 mm³ calculado mediante $L(\text{longitud})A(\text{anchura})A(\text{altura})/2$ de los tumores. Después de 24 días de la implantación del tumor, los ratones recibieron individualmente, por vía intraperitoneal, una dosis de los compuestos de ensayo. La **figura 12A** muestra que, contra células OVCAR3, los inmunoconjugados de anticuerpo 6A4 contra mesotelina con compuesto (IIa), suprimieron el crecimiento tumoral, especialmente a la dosis más alta de 0,314 μmol/kg de citotoxina. Como control de isotipo, también se presentan los datos comparativos del inmunoconjugado correspondiente del anticuerpo 21D4 contra CD 19.

15 *Estudio con células N87.* Dos millones y medio de células tumorales gástricas N87, resuspendidas en PBS 0,1 ml más matrigel 0,1 ml, se implantaron por vía subcutánea en el costado de ratones SCID. Las mediciones tumorales comenzaron 12 días después, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de 7 ratones, cada uno con un tamaño promedio de tumor de 110 mm³ calculado mediante $LAA/2$ de los tumores. Después de 14 días de la implantación del tumor, los ratones recibieron individualmente, por vía intraperitoneal, una dosis de los compuestos de ensayo. La **figura 12B** muestra que, contra células N87, un inmunoconjugado de anticuerpo 6A4 contra mesotelina con compuesto (IIa), inhibe fuertemente el crecimiento tumoral. Se presentan datos comparativos del tampón de formulación solo o de un inmunoconjugado de anticuerpo 21D4 contra CD 19 y compuesto (IIa), siendo este último un control de isotipo.

25 *Estudio con células H226.* Cinco millones de células de mesotelioma H226, resuspendidas en PBS 0,1 ml más matrigel 0,1 ml, se implantaron por vía subcutánea en el costado de ratones SCID. Las mediciones tumorales comenzaron 14 días después, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de 9 ratones, cada uno con un tamaño promedio de tumor de 110 mm³ calculado mediante $LAA/2$ de los tumores. Después de 15 días de la implantación del tumor, los ratones recibieron individualmente, por vía intraperitoneal, una dosis de los compuestos de ensayo. La **figura 12C** muestra el efecto dependiente de la dosis de un inmunoconjugado de anticuerpo 6A4 contra mesotelina y compuesto (IIa) sobre el crecimiento tumoral. en cada caso, la PS fue de 3,6.

35 *Estudio con células H1650.* Dos millones y medio de células de tumor de pulmón H1650 (adenocarcinoma), resuspendidas en PBS 0,1 ml más matrigel 0,1 ml, se implantaron por vía subcutánea en el costado de ratones SCID. Las mediciones tumorales comenzaron 7 días después, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de 6 ratones, cada uno con un tamaño promedio de tumor de 110 mm³ calculado mediante $L(\text{longitud})A(\text{anchura})A(\text{altura})/2$ de los tumores. Después de 9, 14 y 21 días de la implantación del tumor, los ratones recibieron repetidamente una dosis por vía intraperitoneal de los compuestos de ensayo. La **figura 12D** muestra la inhibición tumoral por un inmunoconjugado de anticuerpo 6A4 contra mesotelina y compuesto (IIa). Se presentan datos comparativos para un control de vehículo y un inmunoconjugado de anticuerpo 21D4 contra CD 19 y el compuesto (IIa), siendo este último un control de isotipo.

40 *Estudio con células Hep 3B.* Cuatro millones de células tumorales hepáticas Hep 3B, resuspendidas en PBS 0,1 ml más matrigel 0,1 ml, se implantaron por vía subcutánea en el costado de ratones SCID. Las mediciones tumorales comenzaron 10 días después, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de 7 ratones, cada uno con un tamaño promedio de tumor de 90 mm³ calculado mediante $LAA/2$ de los tumores. Después de 11 días de la implantación del tumor, los ratones recibieron individualmente, por vía intraperitoneal, una dosis de los compuestos de ensayo. La **figura 12E** muestra el efecto inhibitor del crecimiento tumoral dependiente de la dosis, de un inmunoconjugado de anticuerpo 4A6 contra glicipano 3 y el compuesto (IIa). El efecto más fuerte se observó con una dosis de 0,1 μmol/kg. También se muestran datos comparativos para el vehículo solo, el anticuerpo 4A6 solo, o un inmunoconjugado de anticuerpo 21D4 contra CD 19 y compuesto (IIa), siendo este último un control de isotipo. La **figura 12F** es un gráfico del mismo estudio, pero que demuestra la capacidad del inmunoconjugado de anticuerpo 4A6-compuesto (IIa) para aliviar la caquexia asociada a tumor. También se presentan datos del inmunoconjugado de anticuerpo contra CD 19 y compuesto (IIa), que muestran que aunque el conjugado con anticuerpo contra CD 19 reduce el crecimiento tumoral (según la figura **12E**), no alivia la caquexia (según la **figura 12F**).

55 *Estudio con células LNCaP.* Dos millones y medio de células tumorales de próstata LNCaP, resuspendidas en PBS 0,1 ml más matrigel 0,1 ml, se implantaron por vía subcutánea en el costado de ratones SCID. Las mediciones tumorales comenzaron 30 días después, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de 7 ratones, cada uno con un tamaño promedio de tumor de 150 mm³ calculado mediante $LAA/2$ de los tumores. Después de 31 días de la implantación del tumor, los ratones recibieron individualmente, por vía intraperitoneal, una dosis de los compuestos de ensayo. La **figura 12G** muestra la inhibición del crecimiento tumoral mediante un inmunoconjugado de anticuerpo 2A10 contra PSMA y compuesto (IIa), en comparación con el tampón de formulación y un inmunoconjugado de anticuerpo 21D4 contra CD 19 y compuesto (IIa) como control de isotipo. En cada caso, la concentración de citotoxina fue de 0,1 μmol/kg. La **figura 12H** muestra otro conjunto de resultados del mismo estudio, con un inmunoconjugado de anticuerpo 19G9 contra RG-1 y compuesto (IIa), con un control de isotipo de un inmunoconjugado de anticuerpo contra CD19.

Estudio con células Raji. Diez millones de células Raji de linfoma de Burkitt humano, resuspendidas en PBS 0,1 ml más matrigel 0,1 ml, se implantaron por vía subcutánea en el costado de ratones SCID. Las mediciones tumorales comenzaron 6 días después, y los ratones se distribuyeron al azar en grupos de 8 ratones, cada uno con un tamaño promedio de tumor de 90 mm³ calculado mediante LAA/2 de los tumores. Después de 7 días de la implantación del tumor, los ratones recibieron individualmente, por vía intraperitoneal, una dosis de los compuestos de ensayo. La **figura 121** muestra el efecto inhibitor del crecimiento tumoral por inmunocombinados de anticuerpo 6A4 contra mesotelina, anticuerpo 21D4 contra CD19, anticuerpo 12C5 contra CD22 y anticuerpo 1F4 contra CD70, cada uno con compuesto (IIa). (La información de la secuencia completa del anticuerpo 1F4 se describe en Coccia *et al.* 2010. Las secuencias de la V_H de la CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias de la V_K de la CDR1, CDR2 y CDR3 del anticuerpo 1F4, se dan en la SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59 y SEQ ID NO:60, respectivamente).

La anterior descripción detallada de la invención, incluye fragmentos que se refieren principal o exclusivamente a partes o aspectos particulares de la invención. Debe entenderse que, por conveniencia y con fines aclaratorios, una característica particular puede ser relevante en algo más que el fragmento en el que se desvela, y que la divulgación del presente documento incluye todas las combinaciones apropiadas de información encontradas en los diferentes fragmentos. De manera similar, aunque las diversas figuras y descripciones del presente documento se refieren a realizaciones específicas de la invención, debe entenderse que cuando se desvela una característica específica en el contexto de una figura o realización particular, dicha característica también puede usarse, en la medida apropiada, en el contexto de otra figura o realización, en combinación con otra característica, o en la invención en general.

Además, la presente invención se ha descrito particularmente en cuanto a determinadas realizaciones preferidas. Por supuesto, el alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

25 REFERENCIAS

A continuación se proporcionan citas completas de las siguientes referencias citadas de manera abreviada por el primer autor (o inventor) y la fecha anterior en esta memoria descriptiva.

- 30 Aristoff *et al.*, documento WO 91/16324 (1991).
 Asai *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1999, 9, 2995-2998.
 Best, Biochemistry 2009, 48, 6571-6584.
 Beusker *et al.*, documento WO 2007/089149 A2 (2007).
 Boger *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 1995, 3(11), 1429-1453.
 35 Boger *et al.*, Synthesis 1999, 1505-1509.
 Boyd *et al.*, documento WO 2007/038658 A2 (2007).
 Boyd *et al.*, documento US 2008/0279868 A1 (2008).
 Boyd *et al.*, US 7.691.962 B2 (2010).
 Cacciari *et al.*, Expert Opinion Therapeutic Patents 2000, 10(12), 1853-1871.
 40 Cardarelli *et al.*, documento US 7.875.278 B2 (2011).
 Chen *et al.*, documento US 7.517.903 B2 (2009).
 Chen *et al.*, documento US 2010/0113476 A1 (2010).
 Coccia *et al.*, documento US 2010/0150950 A1 (2010).
 Denny, Eur. J. Med. Chem. 2001, 36, 577-595.
 45 Denny, Cancer Investigation. 2004, 22(4), 604-619.
 Dubowchik *et al.*, Bioconjugate Chem. 2002, 13, 855-869.
 Gangwar *et al.*, documento US 2008/0293800 A1 (2008).
 Glazier, documento WO 03/000201 A2 (2003).
 Huang *et al.*, documento US 2009/0297438 A1 (2009).
 50 King *et al.*, documento US 2010/0104509 A1 (2010) [2010a].
 King *et al.*, documento US 2010/0143368 A1 (2010) [2010b].
 King *et al.*, documento US 2011/0020329 A1 (2011).
 Kobayashi *et al.*, Cancer Res. 1994, 54, 2404-2410.
 Korman *et al.*, documento US 2009/0074660 A1 (2009).
 55 Kutvavin *et al.*, documento US 5.659.022 (1997).
 Ng *et al.*, documento WO 02/096910 A1 (2002).
 Ng *et al.*, documento US 6.989.452 B2 (2006) [2006a].
 Ng *et al.*, US 7.129.261 B2 (2006) [2006b].
 Ng *et al.*, documento US 7.498.302 B2 (2009) [2009a].
 60 Ng *et al.*, US 7.507.420 B2 (2009) [2009b].
 Ng *et al.*, documento US RE41.252 E (2010).
 Rao-Naik *et al.*, documento US 8.097.703 B2 (2012).
 Suckling, Expert Opinion Therapeutic Patents 2004, 14(12), 1693-1724.
 Sufi *et al.*, documento WO 2008/083312 A2 (2008).
 65 Sufi *et al.*, documento US 2010/0145036 A1 (2010).
 Terrett *et al.*, documento US 2010/0034826 A1 (2010) [2010a].

Terrett *et al.*, US 2010/0209432 A1 (2010) [2010b].

Terrett *et al.*, documento US 2011/0085970 A1 (2011) [2011a].

Terrett *et al.*, US 2011/0262448 A1 (2011) [2011b].

Terrett *et al.*, documento US 2012/0027782 A1 (2012) [2012a].

5 Terrett *et al.*, US 8.124.738 B2 (2012) [2012b].

Warpehoski *et al.*, Journal of Medicinal Chemistry. 1988, 31, 590-603.

Zhao *et al.*, Poster 45, 28° National Medicinal Chemistry Symposium (San Diego, CA, 8-12 de junio de 2002), "An improved synthesis of CC-1065 analogs and development of prodrugs" (resumen). [2002a].

10 Zhao *et al.*, Poster MEDI 147, 224° National Meeting of the American Chemical Society (Boston, MA, 18-22 de agosto de 2002), "New water-soluble CC-1065 analog prodrugs: Design, synthesis and evaluation" (resumen) [2002b].

Zhao *et al.*, documento WO 2003/086318 (2003).

Zhao *et al.*, documento US 7.655.660 B2 (2010).

15 LISTADO DE SECUENCIAS

La siguiente tabla resume las descripciones de las secuencias desveladas en esta solicitud.

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA
1	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 2H5
2	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 2H5
3	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 2H5
4	aminoácidos de la V _K de la CDR1 de 2H5
5	aminoácidos de la V _K de la CDR2 de 2H5
6	aminoácidos de la V _K de la CDR3 de 2H5
7	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 6A4
8	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 6A4
9	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 6A4
10	aminoácidos de la V _K de la CDR1 de 6A4
11	aminoácidos de la V _K de la CDR2 de 6A4
12	aminoácidos de la V _K de la CDR3 de 6A4
13	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 21D4
14	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 21D4
15	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 21D4
16	aminoácidos de la V _K de la CDR1 de 21D4
17	aminoácidos de la V _K de la CDR2 de 21D4
18	aminoácidos de la V _K de la CDR3 de 21D4
19	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 2A10
20	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 2A10
21	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 2A10
22	aminoácidos de la V _K de la CDR1 de 2A10

ES 2 814 798 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA
23	aminoácidos de la V _K de la CDR2 de 2A10
24	aminoácidos de la V _K de la CDR3 de 2A10
25	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 4A6
26	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 4A6
27	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 4A6
28	aminoácidos de la V _K de la CDR1 de 4A6
29	aminoácidos de la V _K de la CDR2 de 4A6
30	aminoácidos de la V _K de la CDR3 de 4A6
31	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 2A7
32	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 2A7
33	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 2A7
34	aminoácidos de la V _L de la CDR1 de 2A7
35	aminoácidos de la V _L de la CDR2 de 2A7
36	aminoácidos de la V _L de la CDR3 de 2A7
37	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 19G9
38	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 19G9
39	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 19G9
40	aminoácidos de la V _L de la CDR1 de 19G9
41	aminoácidos de la V _L de la CDR2 de 19G9
42	aminoácidos de la V _L de la CDR3 de 19G9
43	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 12C5
44	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 12C5
45	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 12C5
46	aminoácidos de la V _K de la CDR1 de 12C5
47	aminoácidos de la V _K de la CDR2 de 12C5
48	aminoácidos de la V _K de la CDR3 de 12C5
49	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 4D5
50	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 4D5
51	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 4D5
52	aminoácidos de la V _K de la CDR1 de 4D5

(continuación)

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA
53	aminoácidos de la V _K de la CDR2 de 4D5
54	aminoácidos de la V _K de la CDR3 de 4D5
55	aminoácidos de la V _H de la CDR1 de 1F4
56	aminoácidos de la V _H de la CDR2 de 1F4
57	aminoácidos de la V _H de la CDR3 de 1F4
58	aminoácidos de la V _K de la CDR1 de 1F4
59	aminoácidos de la V _K de la CDR2 de 1F4
60	aminoácidos de la V _K de la CDR3 de 1F4

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Bristol-Myers Squibb Company
 ZHANG, Qian
 GANGWAR, Sanjeev
 PAN, Chin
 DERWIN, Daniel D.

10 <120> INMUNOCONJUGADOS, COMPOSICIONES PARA PREPARARLOS Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y USO

<130> 11770-WO-PCT

15 <150> US 61/490117
 <151> 26/05/2011

<160> 60

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

Ser Tyr Ile Met His
 1 5

30 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 2

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 3

ES 2 814 798 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 3

 Asp Thr Asp Gly Tyr Asp Phe Asp Tyr
 1 5

 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10

 <400> 4
 15

 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20

 <400> 5

 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5
 25

 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30

 <400> 6

 Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5
 35

 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40

 <400> 7

 Ile Tyr Gly Met His
 1 5

 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45

 <400> 8
 50

ES 2 814 798 T3

Val Leu Trp Tyr Asp Gly Ser His Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

10 Asp Gly Asp Tyr Tyr Asp Ser Gly Ser Pro Leu Asp Tyr
 1 5 10

15 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

20 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

25 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

30 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

35 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

40 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

45 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

50 Ser Ser Trp Ile Gly
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> PRT

ES 2 814 798 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

Ile Ile Tyr Pro Asp Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

5 Gly

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

His Val Thr Met Ile Trp Gly Val Ile Ile Asp Phe
1 5 10

15

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

25

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 17

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

35

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

40

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

45

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

50

Ser Asn Trp Ile Gly
1 5

ES 2 814 798 T3

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 20

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 21

Gln Thr Gly Phe Leu Trp Ser Ser Asp Leu
1 5 10

20

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala Leu Ala
1 5 10

30

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

35

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 24

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

45

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50

<400> 25

ES 2 814 798 T3

Ser Tyr Trp Ile Ala
1 5

5 <210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Ile Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

10 Gly

15 <210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Thr Arg Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

20 <210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 28

Arg Ala Val Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

30 <210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 29

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

40 <210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 30

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
1 5

50 <210> 31
<211> 6
<212> PRT

ES 2 814 798 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

Ser Asn Tyr Met Asn Trp

5

1

5

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

Val Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

15

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

Asp Thr Tyr Ala Met Asp Val

1

5

25

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 34

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

35

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

40

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

45

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

ES 2 814 798 T3

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr
 1 5 10

5 <210> 37
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 37

Ser Tyr Val Met His
 1 5

10
 15 <210> 38
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 38

Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 39

Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asn Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10 15

30 <210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 40

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

40 <210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 41

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

50 <210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 42

ES 2 814 798 T3

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Leu Thr
1 5

5 <210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Ser Tyr Ala Met Asn
1 5

10

15 <210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Gly

20

25 <210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Leu Phe Tyr Tyr Tyr Phe Gly Met Asp Val
1 5 10

30 <210> 46
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 46

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser
1 5 10

40 <210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 47

Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

50 <210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 814 798 T3

<400> 48

Cys Ser Tyr Ala Asn Ser Ser Thr Leu Val
1 5 10

5 <210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 49

Ser Tyr Ala Phe His
1 5

15 <210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 50

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

30

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35

<400> 52

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

40

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 53

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

ES 2 814 798 T3

5 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Ile Thr
 1 5

10 <210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 55

Ile Tyr Ala Met Ser
 1 5

20 <210> 56
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 56

Ala Ile Ser Asp Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Phe Ala Asp Ser Val Arg
 1 5 10 15

Gly

30 <210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

35 Val Asp Tyr Ser Asn Tyr Leu Phe Phe Asp Tyr
 1 5 10

40 <210> 58
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

45 <210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 59

ES 2 814 798 T3

<400> 59

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

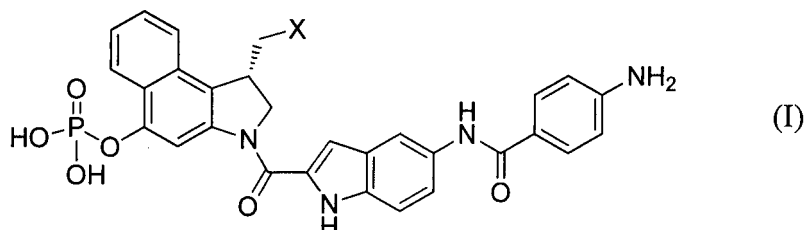
5 <210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 60

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

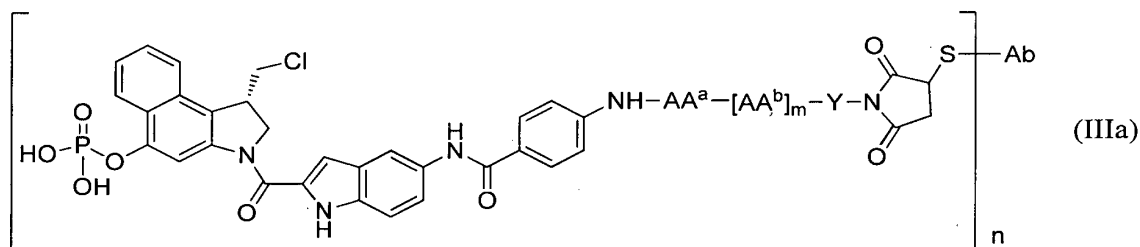
REIVINDICACIONES

1. Un inmunoconjugado en el que un compuesto de fórmula (I)



5 en la que X es un grupo saliente desplazable nucleofílicamente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se conjuga en el grupo -NH₂ del mismo a través de un conector peptídico a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo.

10 2. Un inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (IIIa)



en la que AA^a

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

m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;

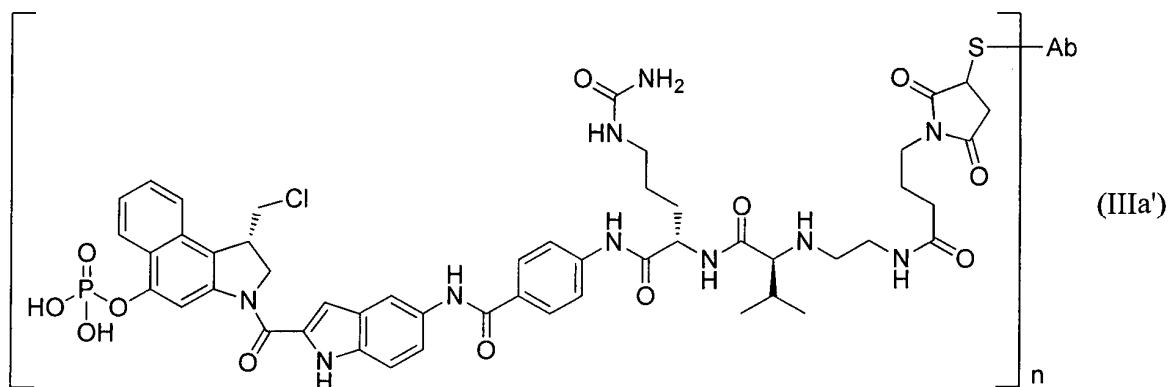
20 Y es un resto espaciador;

n es 1, 2, 3, 4 o 5; y

Ab representa el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 3. Un inmunoconjugado de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (IIIa')



en la que

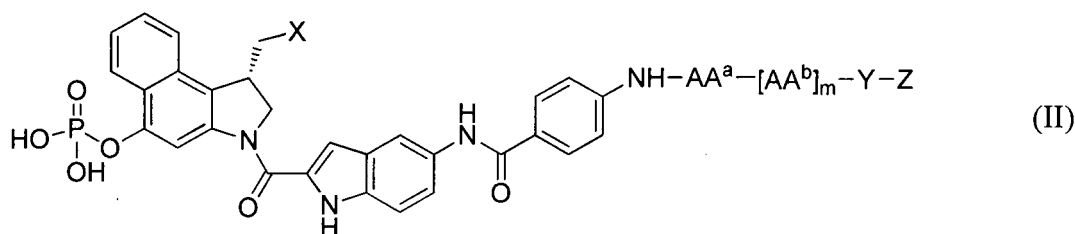
30 n es 1, 2, 3, 4 o 5; y

Ab representa el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un inmunocombinado de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano que reconoce un antígeno humano seleccionado del grupo que consiste en CD70, mesotelina, PSMA, CD19, glicoproteína-3, B7H4, RG-1, CD22 y PTK7.

5. Un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (II)



en la que

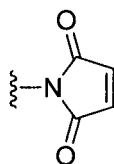
- 10 X es un grupo saliente desplazable nucleofílicamente;
 AA^a y cada AA^b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en alanina, β-alanina, ácido γ-aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido γ-carboxiglutámico, citrulina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, norvalina, ornitina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina;
- 15 m es 0, 1, 2, 3, 4 o 5;
 Y es un resto espaciador; y
 Z es un grupo funcional reactivo capaz de conjugarse con un anticuerpo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

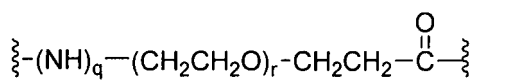
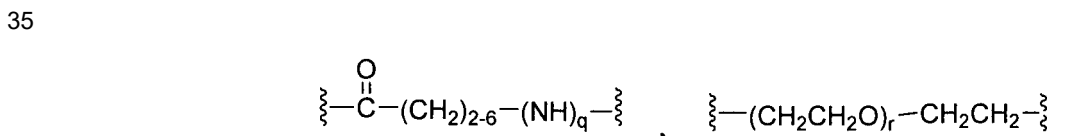
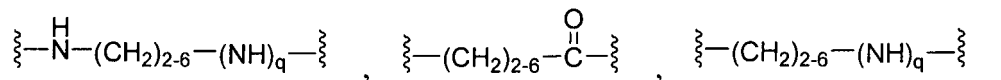
20 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde AA^a se selecciona entre el grupo que consiste en citrulina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, isoleucina, leucina y treonina y m es 0, 1 o 2.

25 7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde -AA^a-[AA^b]_m- es un dipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en Val-Cit, Phe-Cit, Phe-Lys, Val-Lys, Val-Glu, Val-Asp, Val-Ser y Val-Gly, enumerándose cada dipéptido en la dirección de N a C.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde -Z es -ONH₂, -SH, -N₃ o

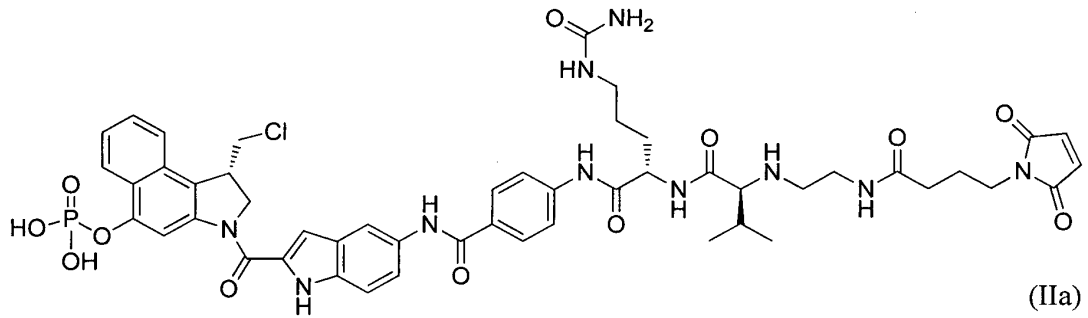


30 9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde Y se selecciona entre el grupo que consiste en



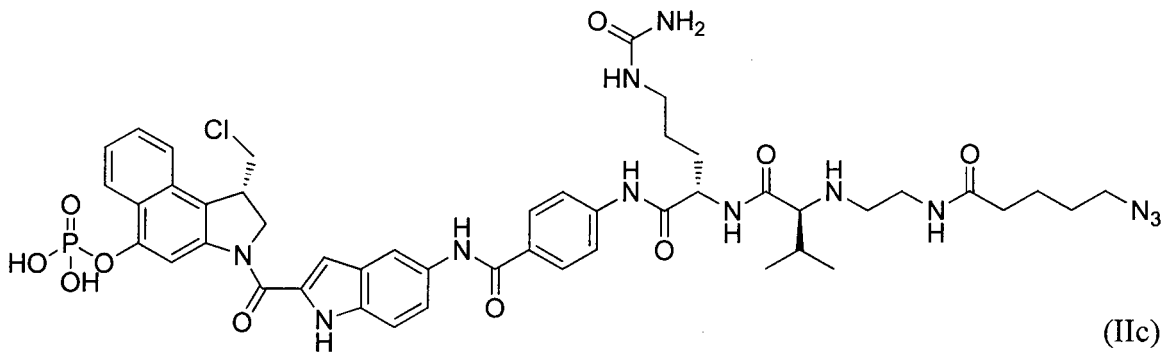
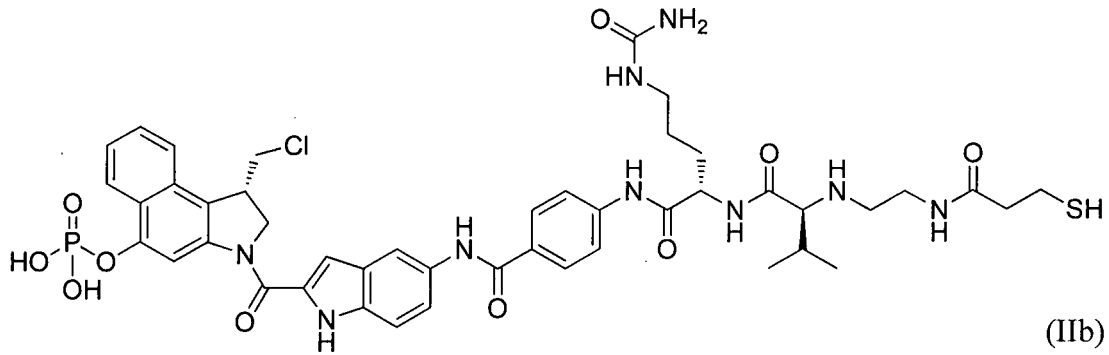
40 y combinaciones de las mismas, en donde el subíndice q es 0 o 1 independientemente para cada aparición del mismo y el subíndice r es 1 a 24 independientemente para cada aparición del mismo.

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (IIa)

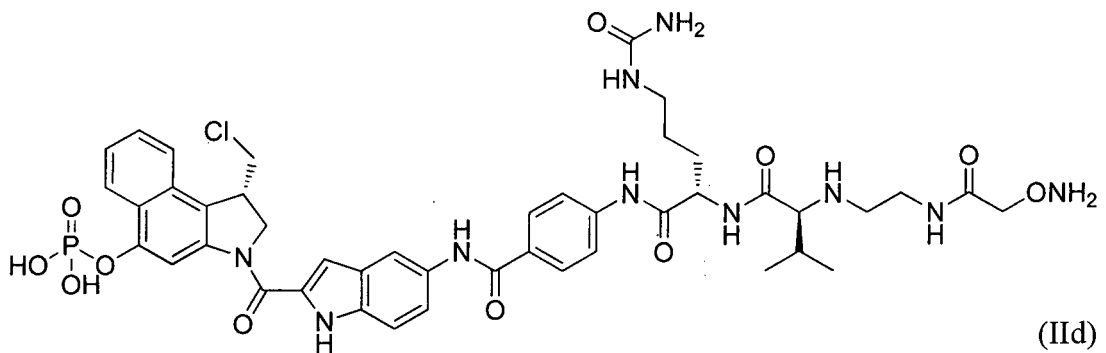


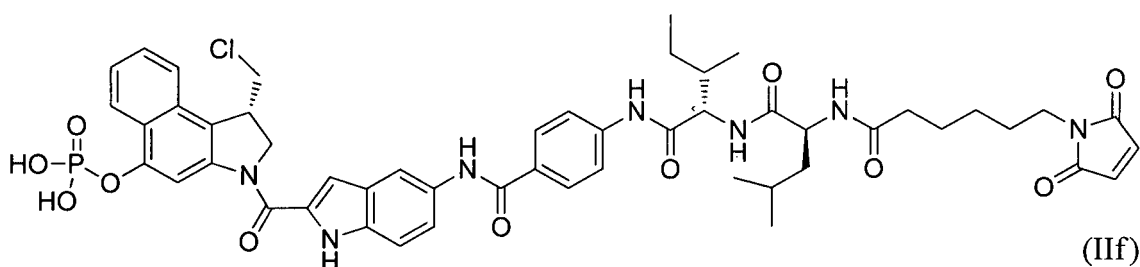
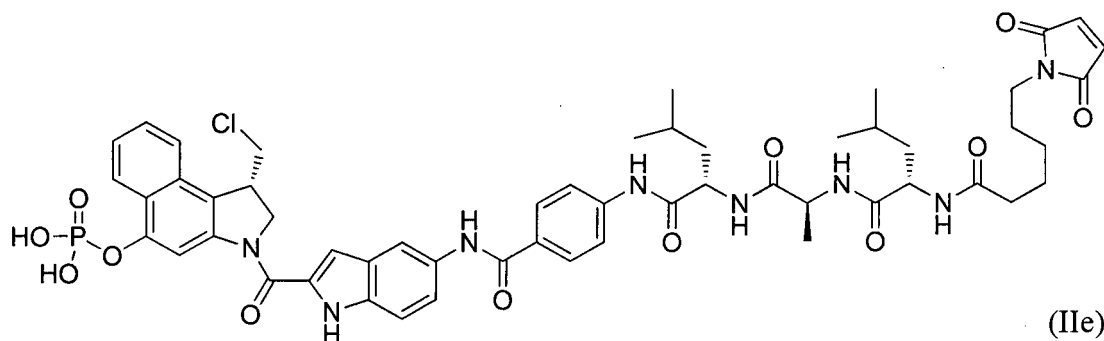
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, que tiene una estructura selecciona entre el grupo que consiste en las fórmulas (IIb)-(IIg):

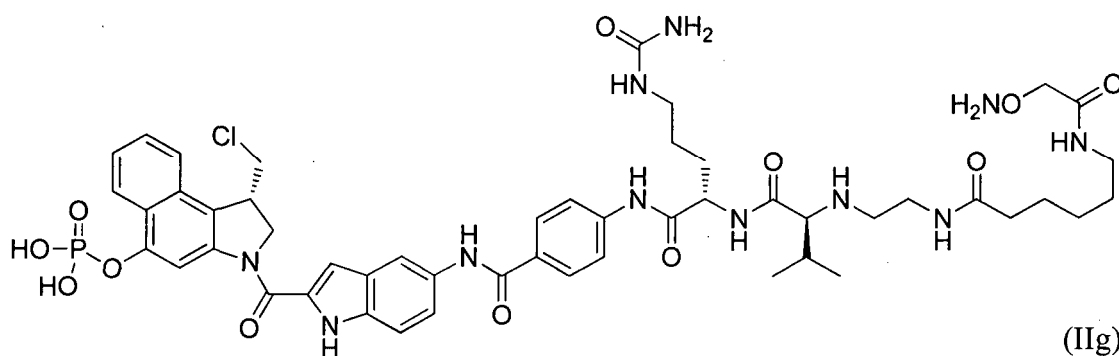


10



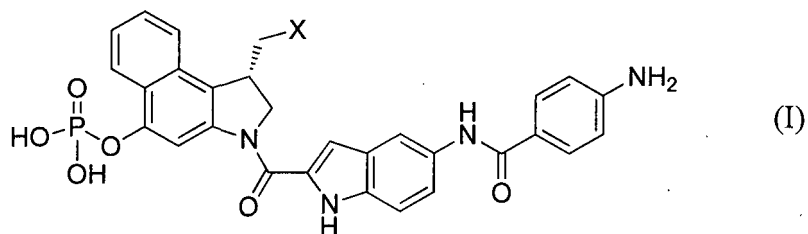


5 y



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 12. Un compuesto de acuerdo con la fórmula (I)



en donde X es un grupo saliente desplazable nucleofílicamente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 13. Un inmunocóncugado que tiene una estructura de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar en un método para tratar un cáncer.

14. El inmunocóncugado para el uso según la reivindicación 13, en donde el cáncer es cáncer renal, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, linfoma, cáncer de colon, mesotelioma, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, adenocarcinoma, cáncer de hígado o cáncer de mama.

20 15. El inmunocóncugado para el uso según la reivindicación 13, en donde el cáncer se **caracteriza por** células

cancerosas que expresan la CD70 humana, mesotelina, PSMA, CD19, glipicano 3, B7H4, RG-1, CD22 o PTK7.

FIG. 1A

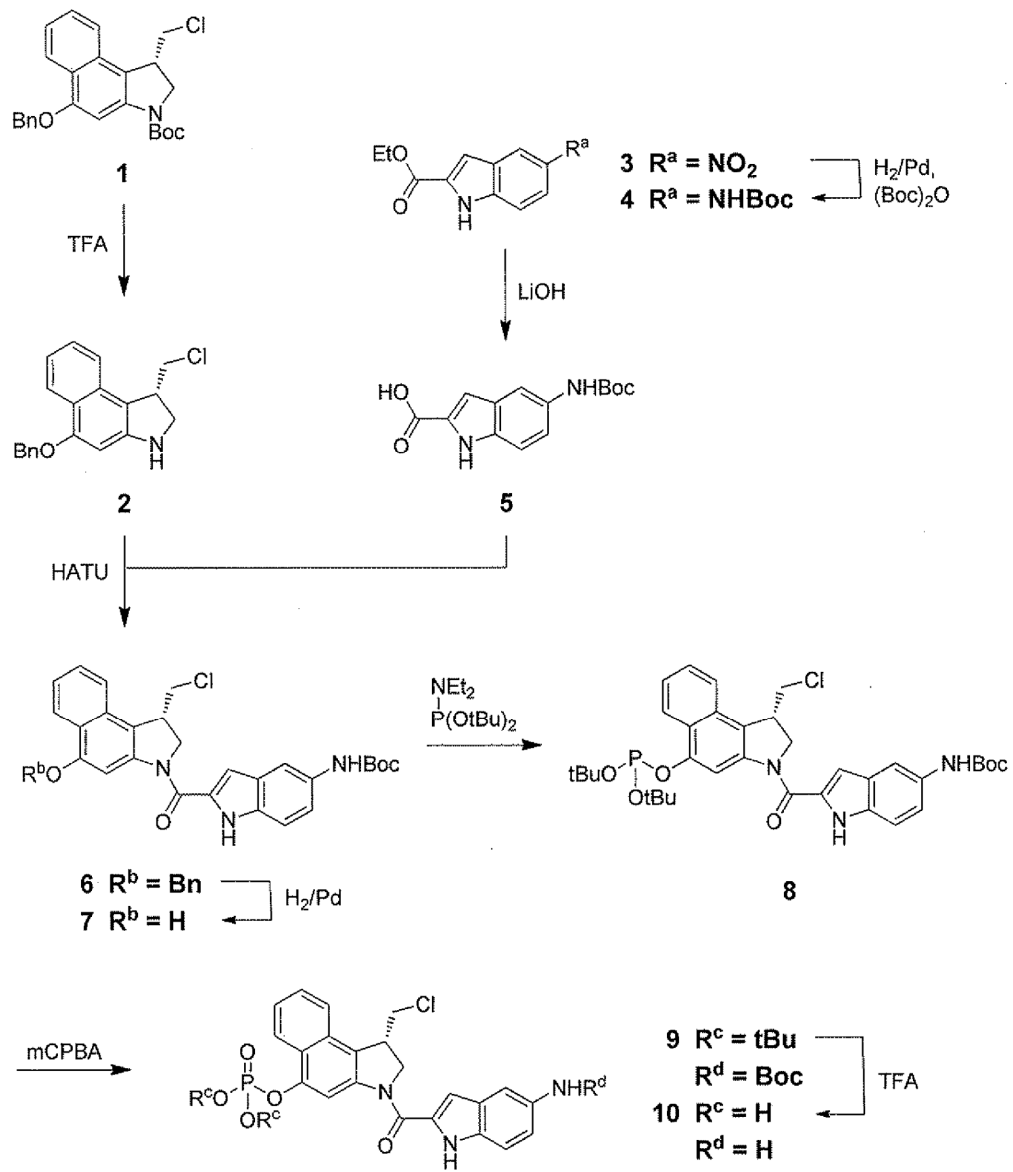


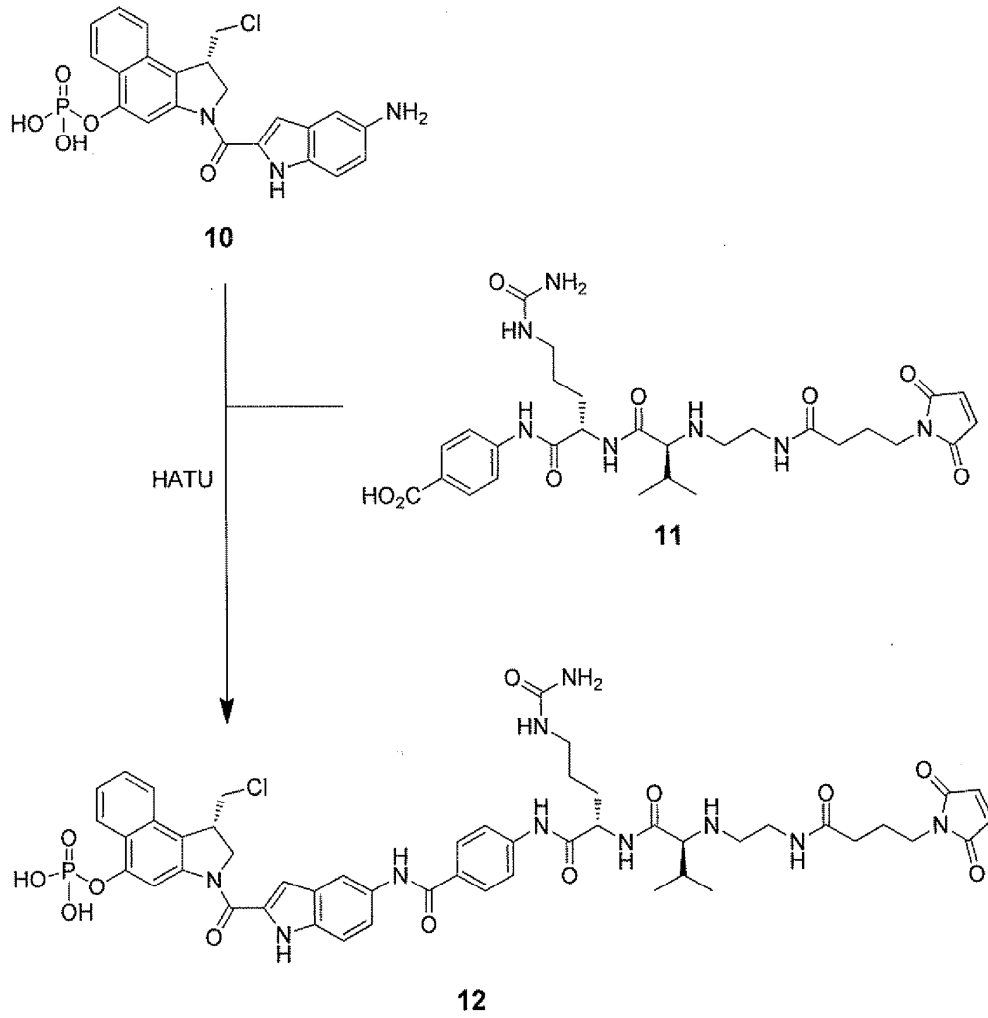
FIG. 1B

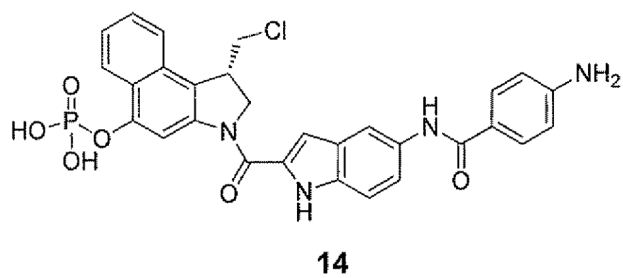
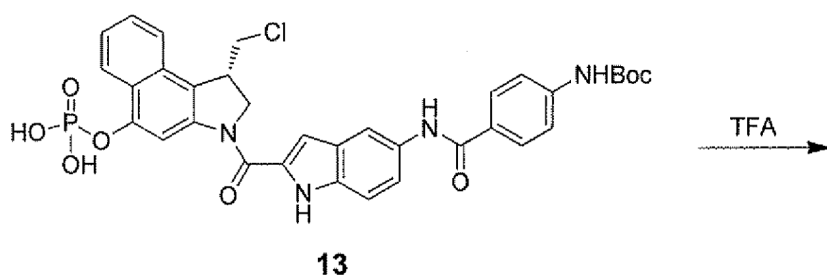
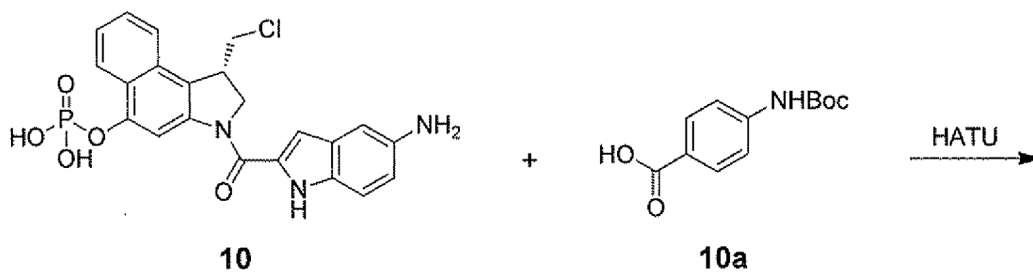
FIG. 2

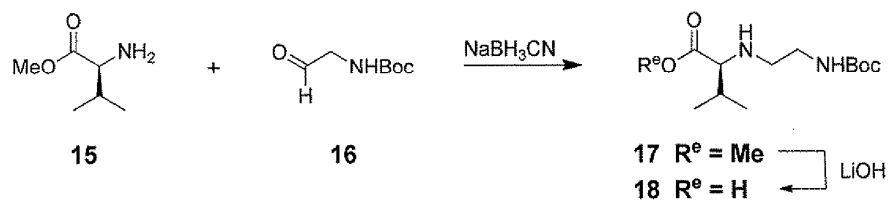
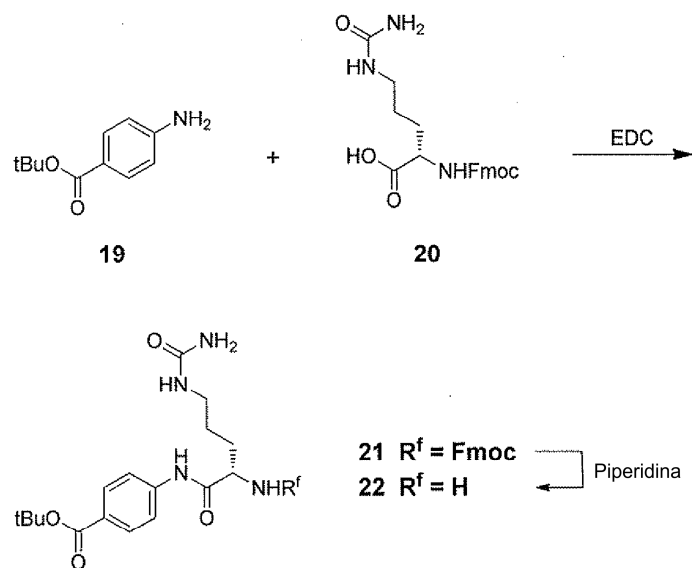
FIG. 3A**FIG. 3B**

FIG. 3C

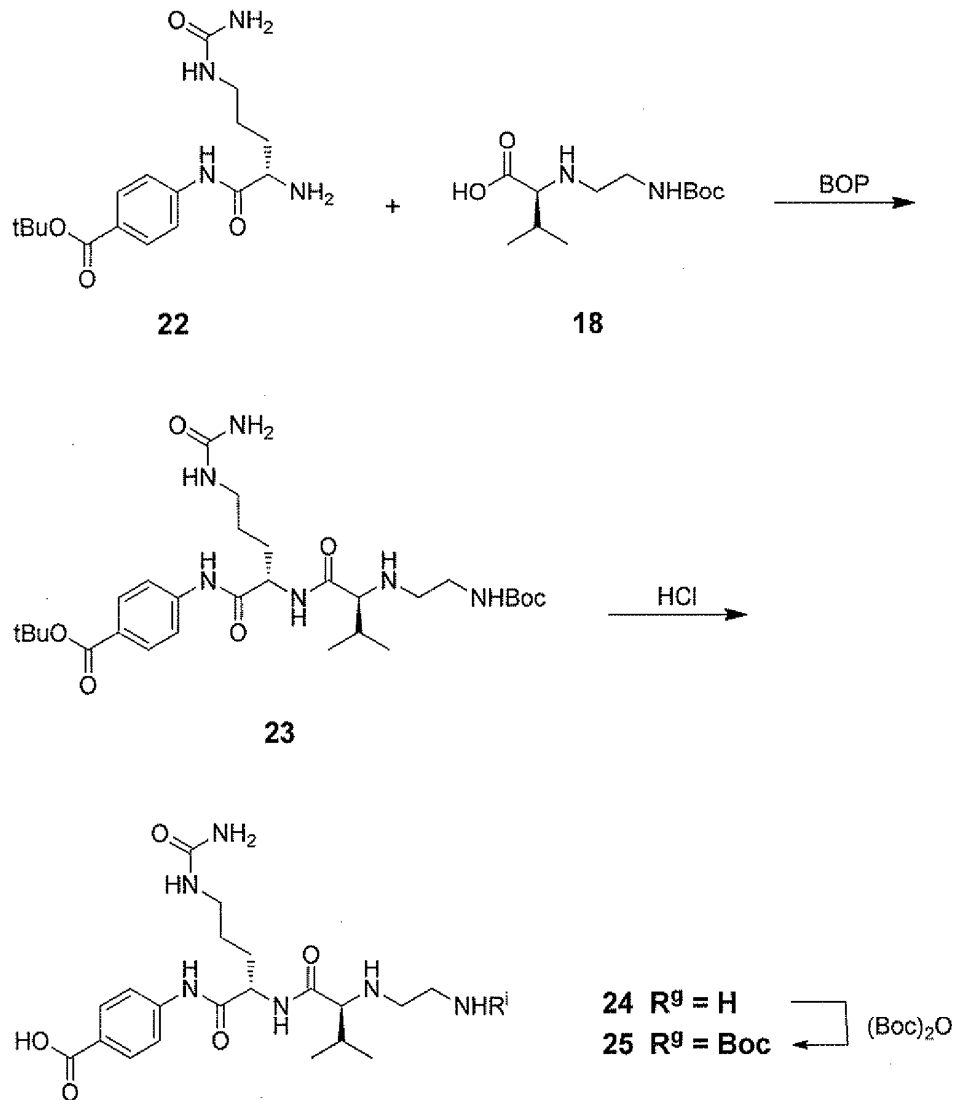


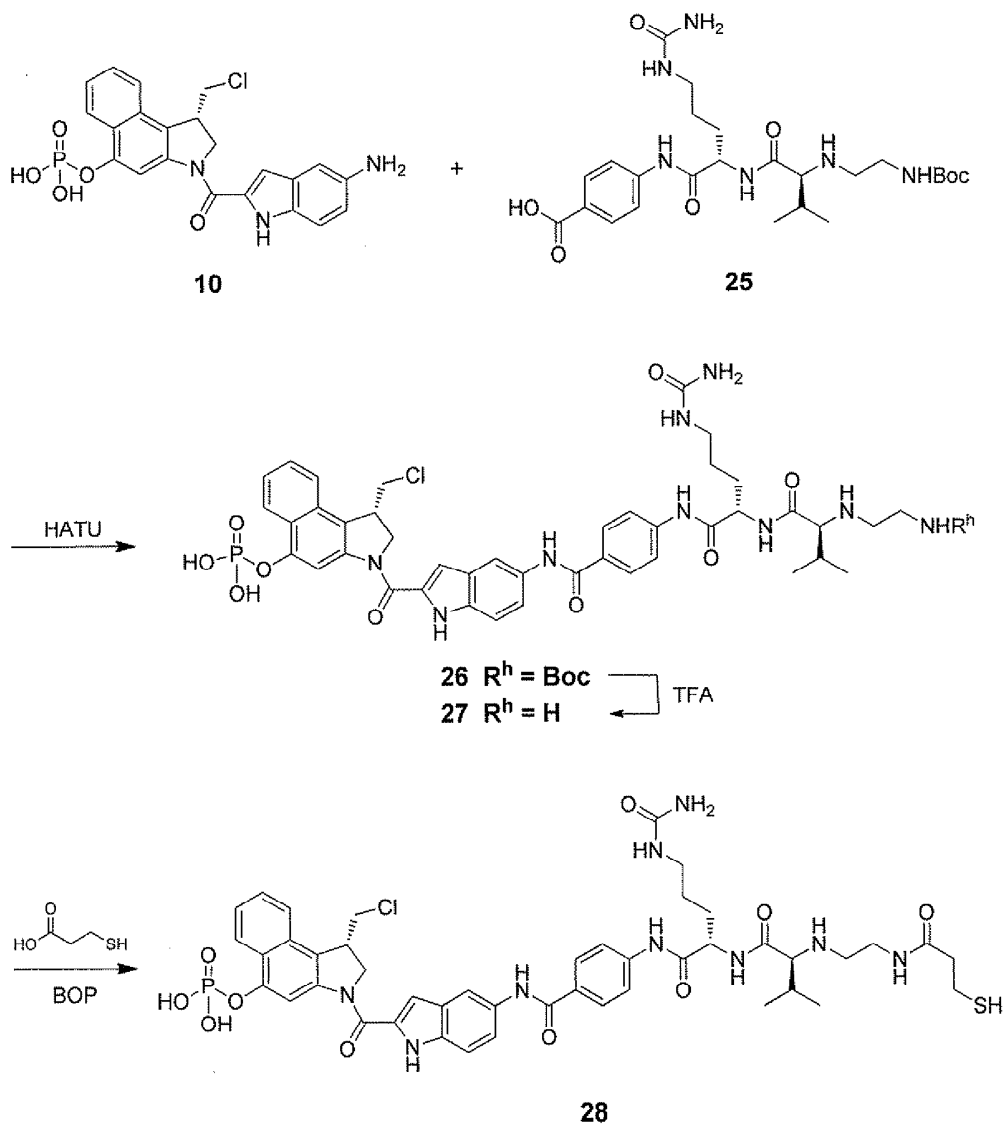
FIG. 3D

FIG. 4A

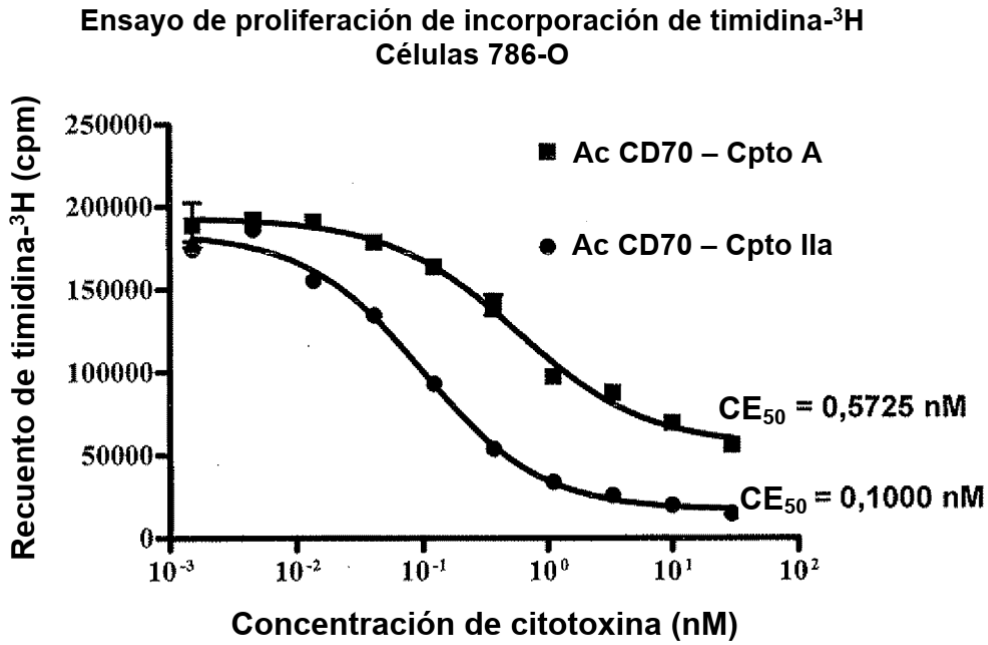


FIG. 4B

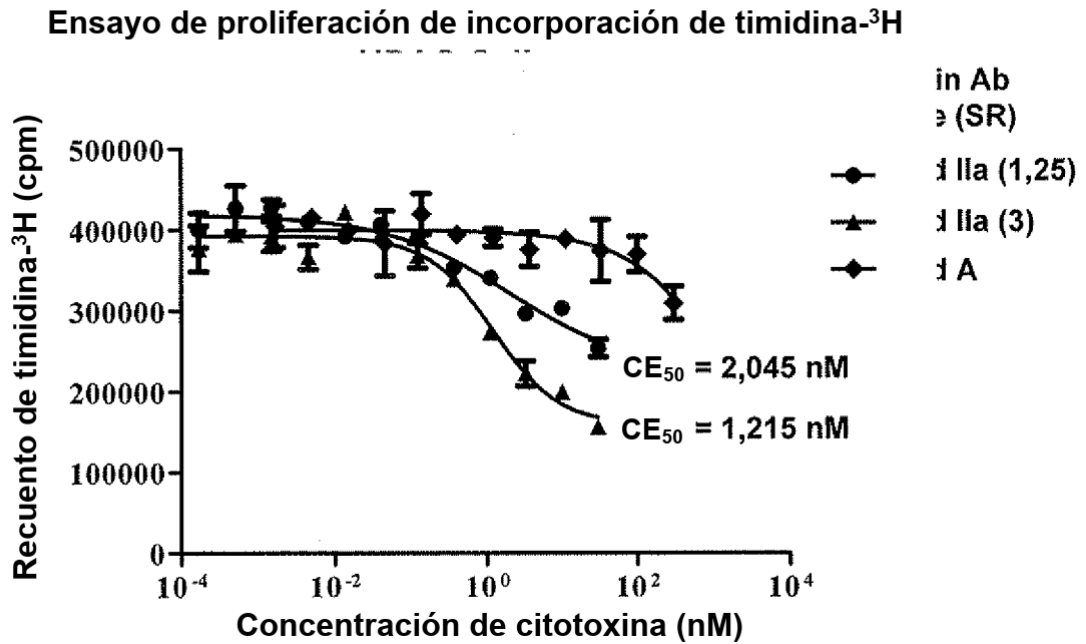


FIG. 4C

Ensayo de proliferación de incorporación de timidina-³H
Células CHO que expresan Mesotelina

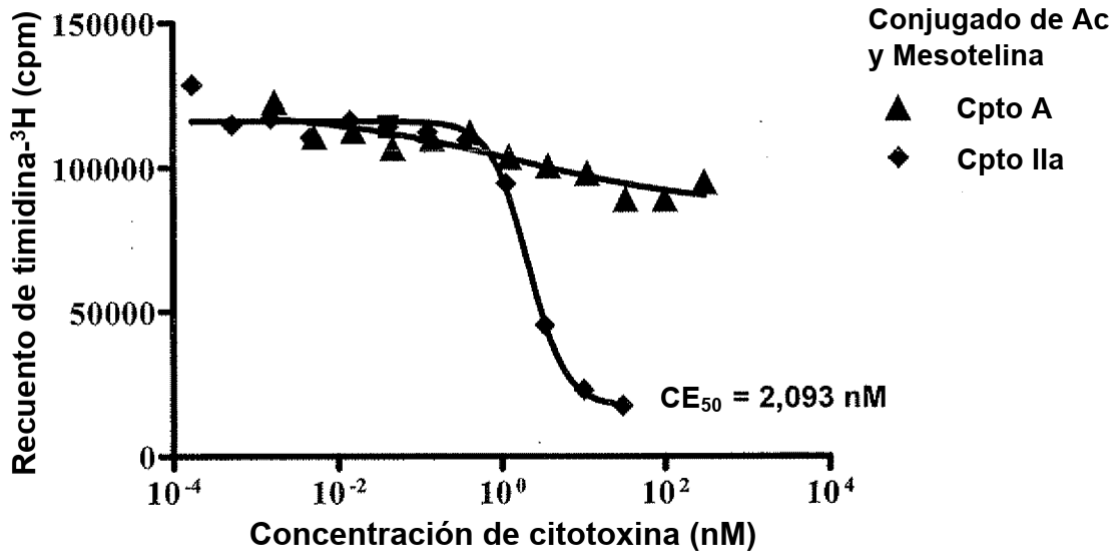


FIG. 4D

Ensayo de proliferación de incorporación de timidina-³H
Células OVCAR3

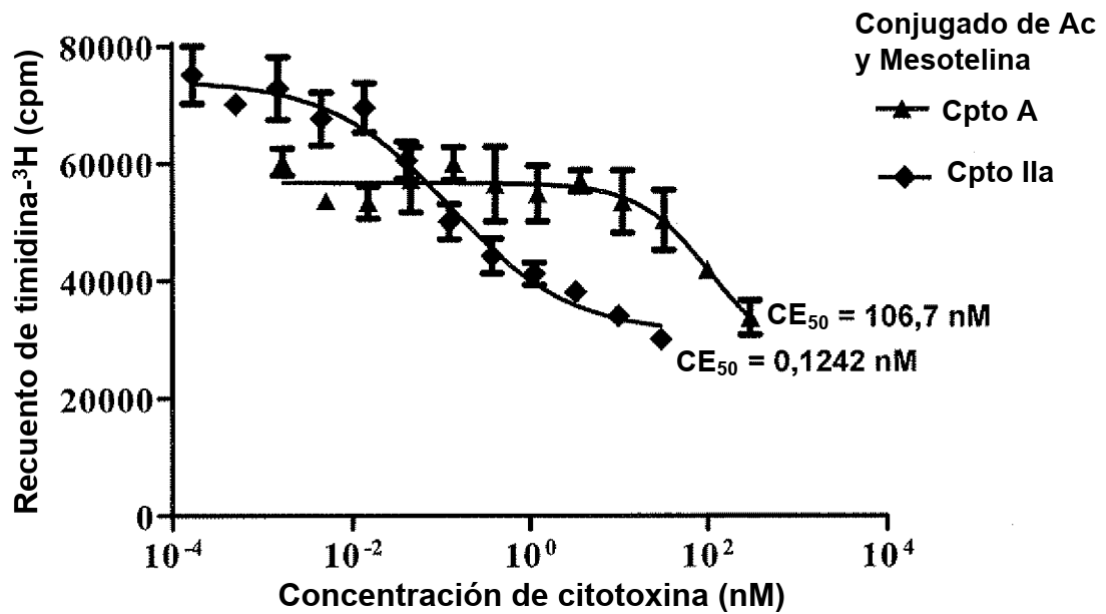


FIG. 4E

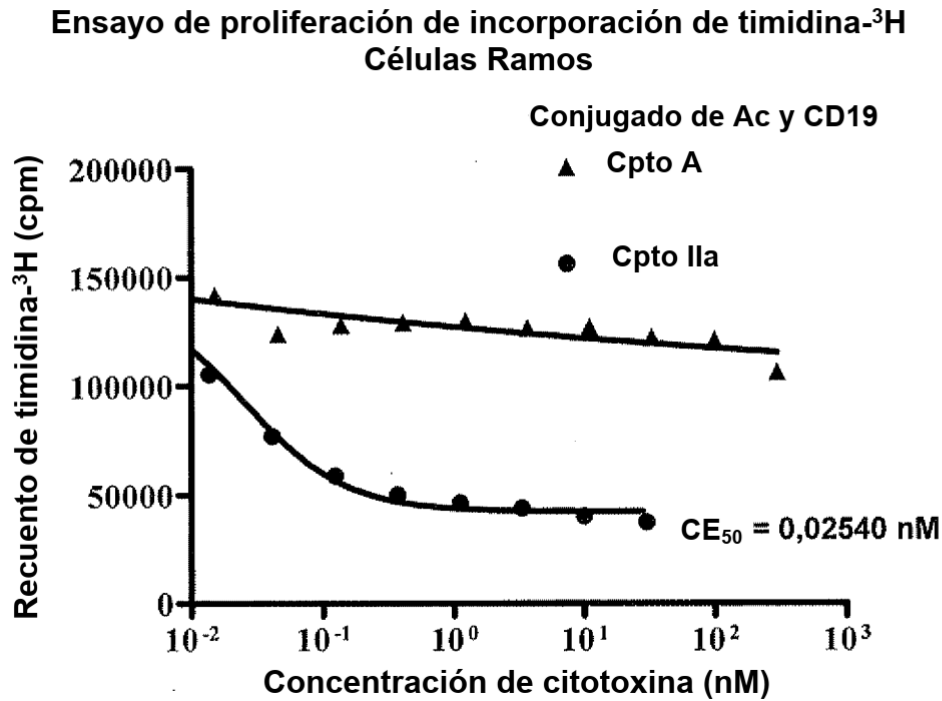


FIG. 4F

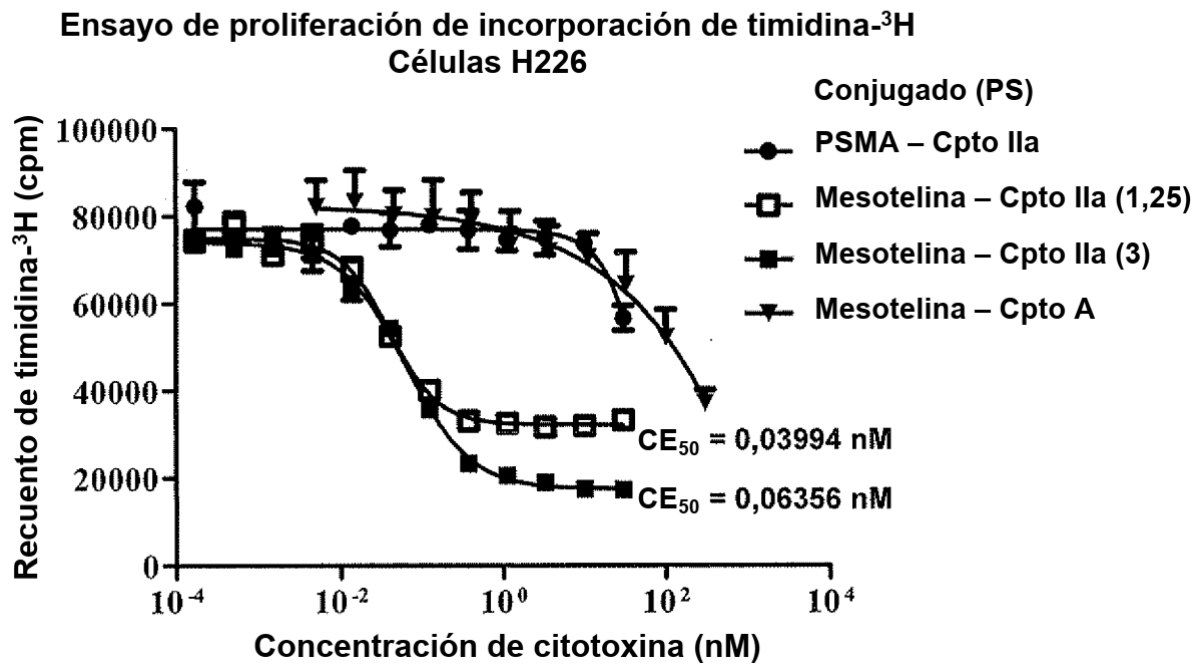


FIG. 4G

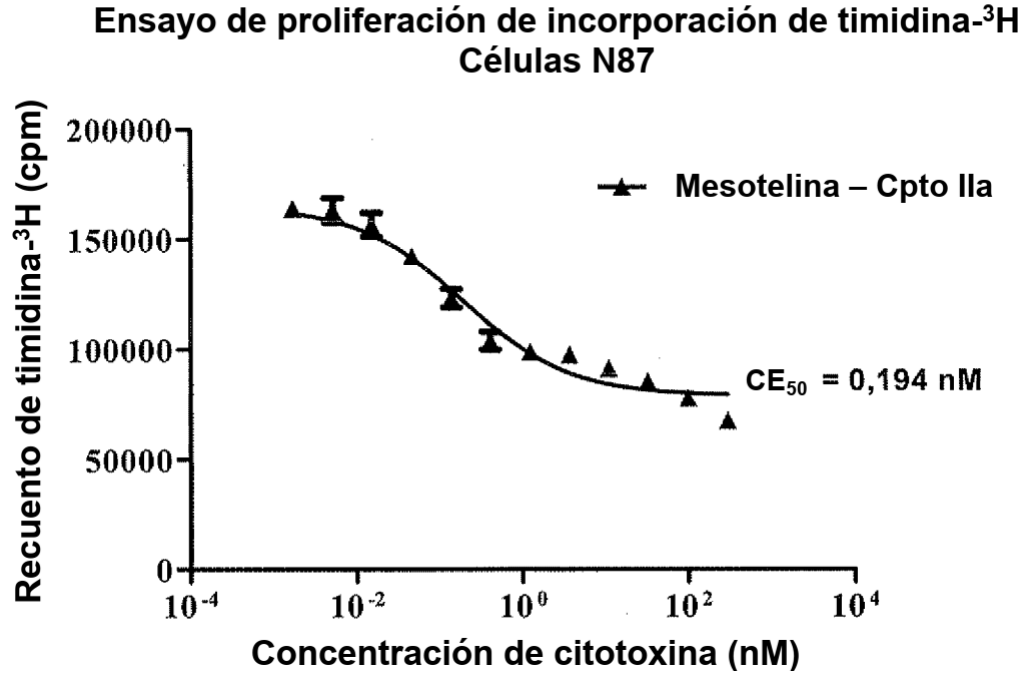


FIG. 4H

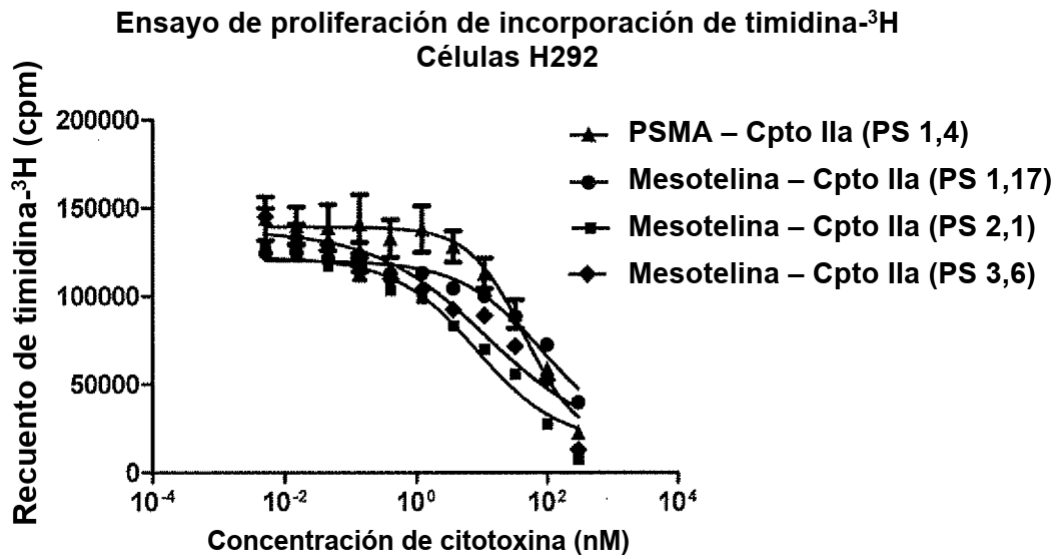


FIG. 4I

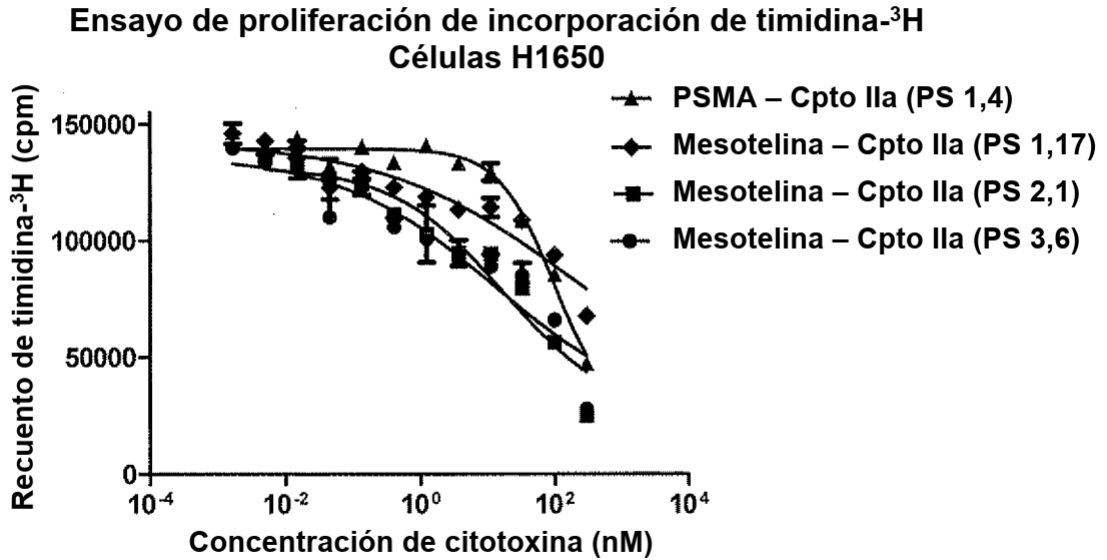


FIG. 4J

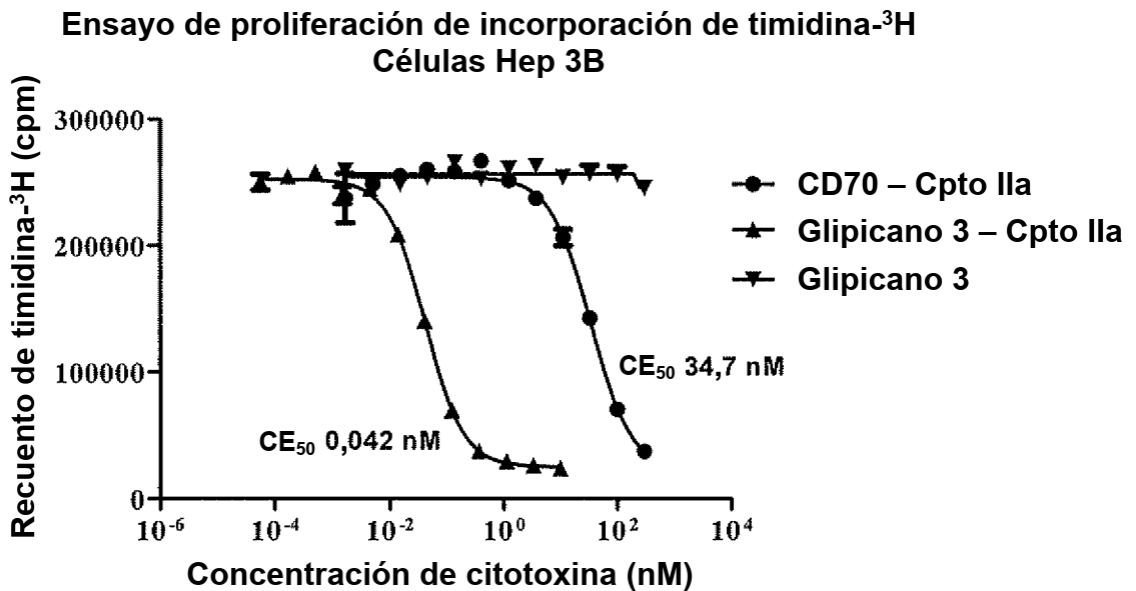


FIG. 4K

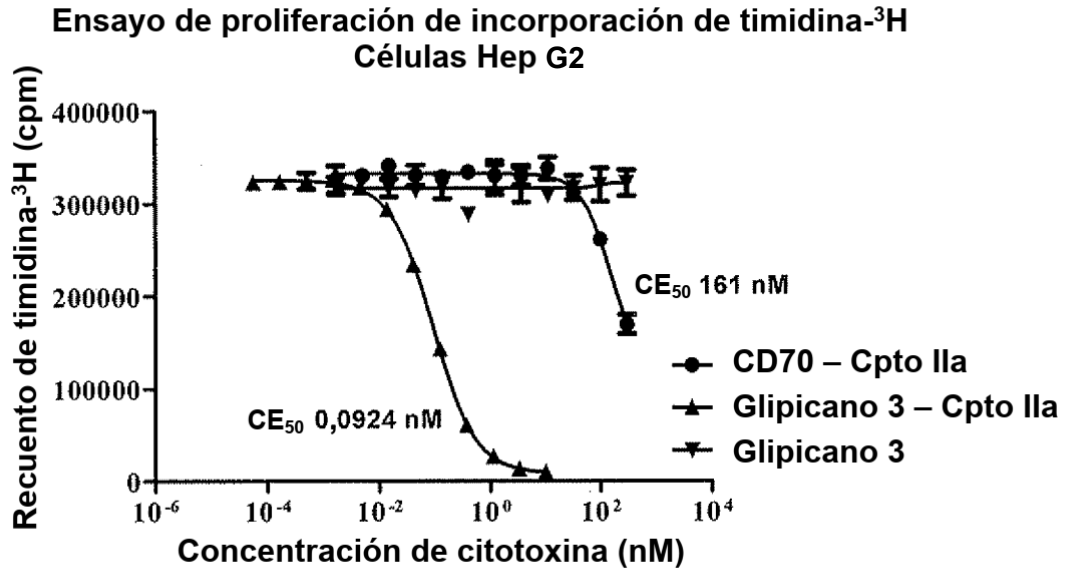


FIG. 4L

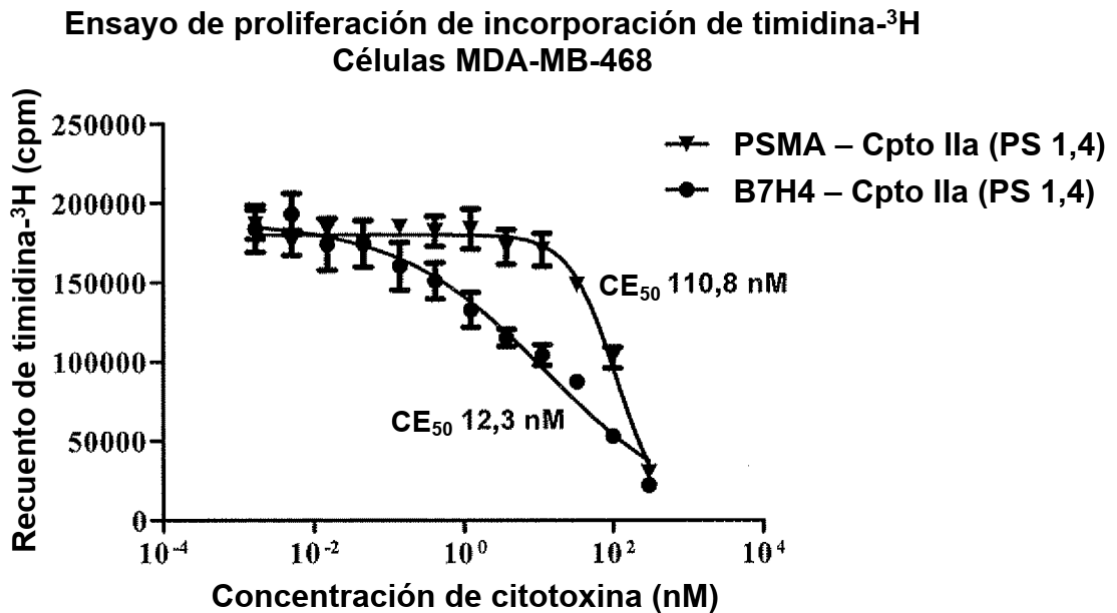


FIG. 4M

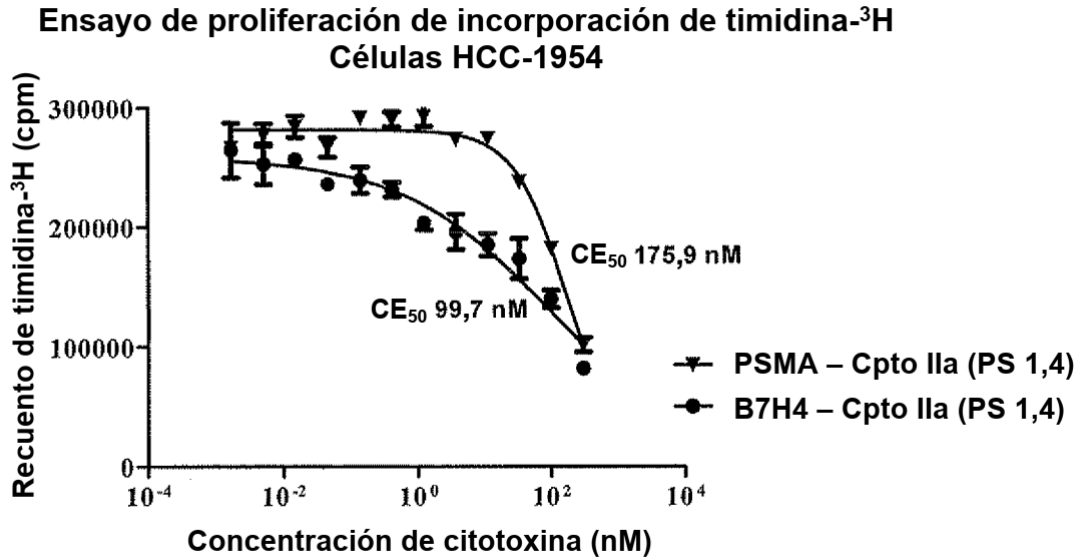


FIG. 4N

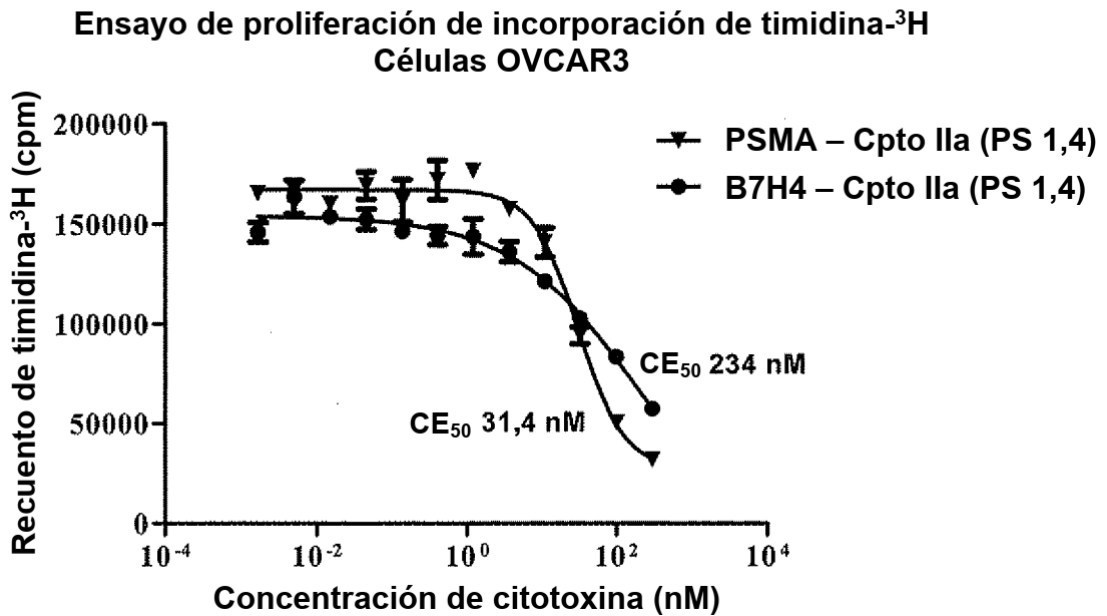


FIG. 40

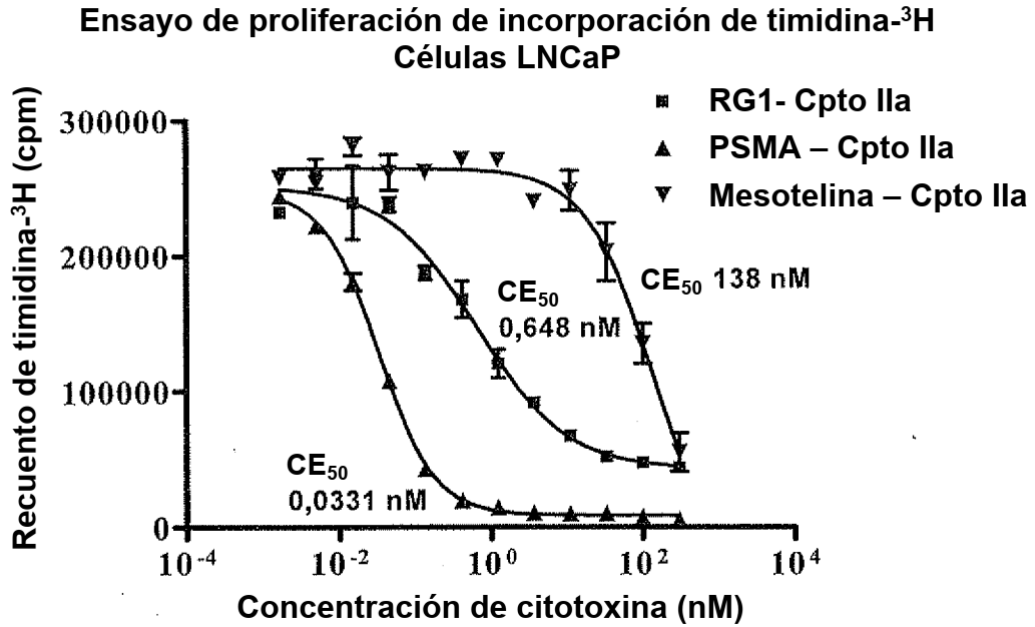


FIG. 4P

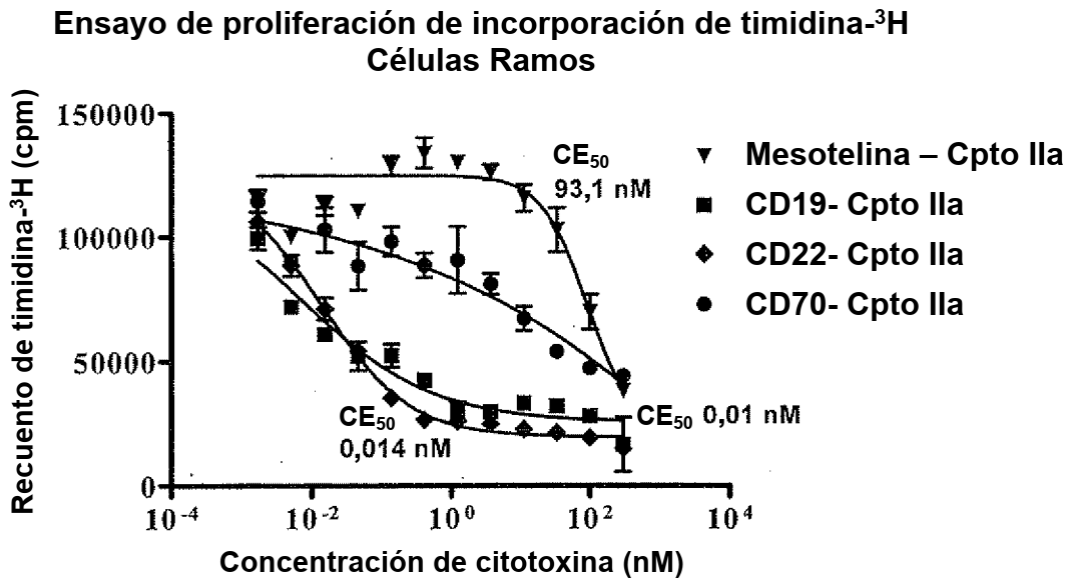


FIG. 4Q

Ensayo de proliferación de incorporación de timidina-³H
Células HCT116

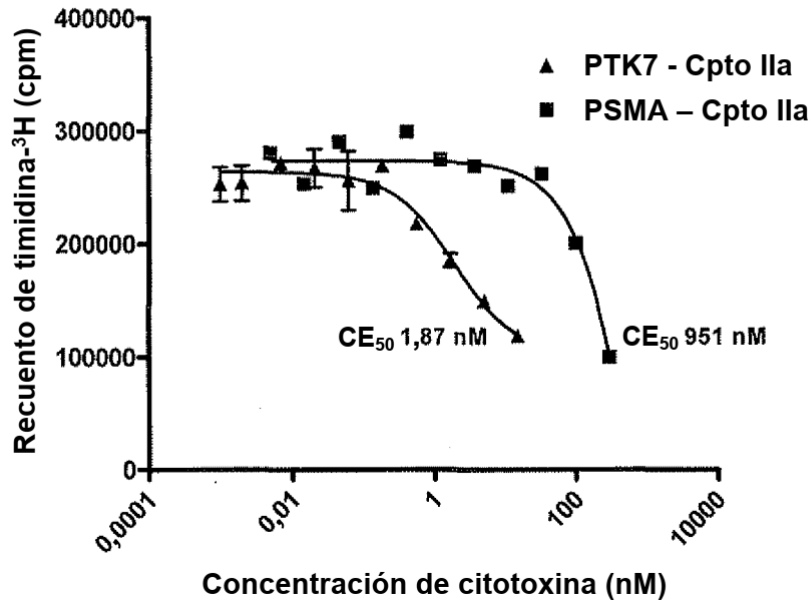


FIG. 4R

Ensayo de proliferación de incorporación de timidina-³H
Células H520

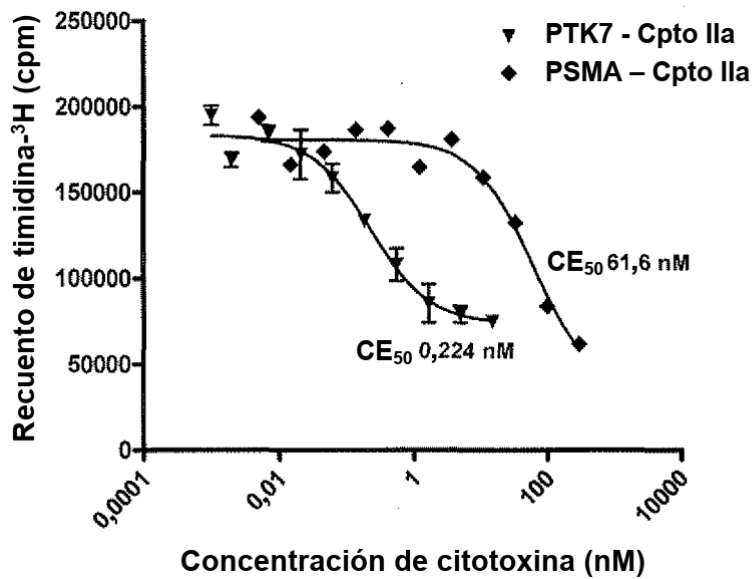


FIG. 5

Desfosforilación del compuesto (Ia) por microsomas hepáticos humanos

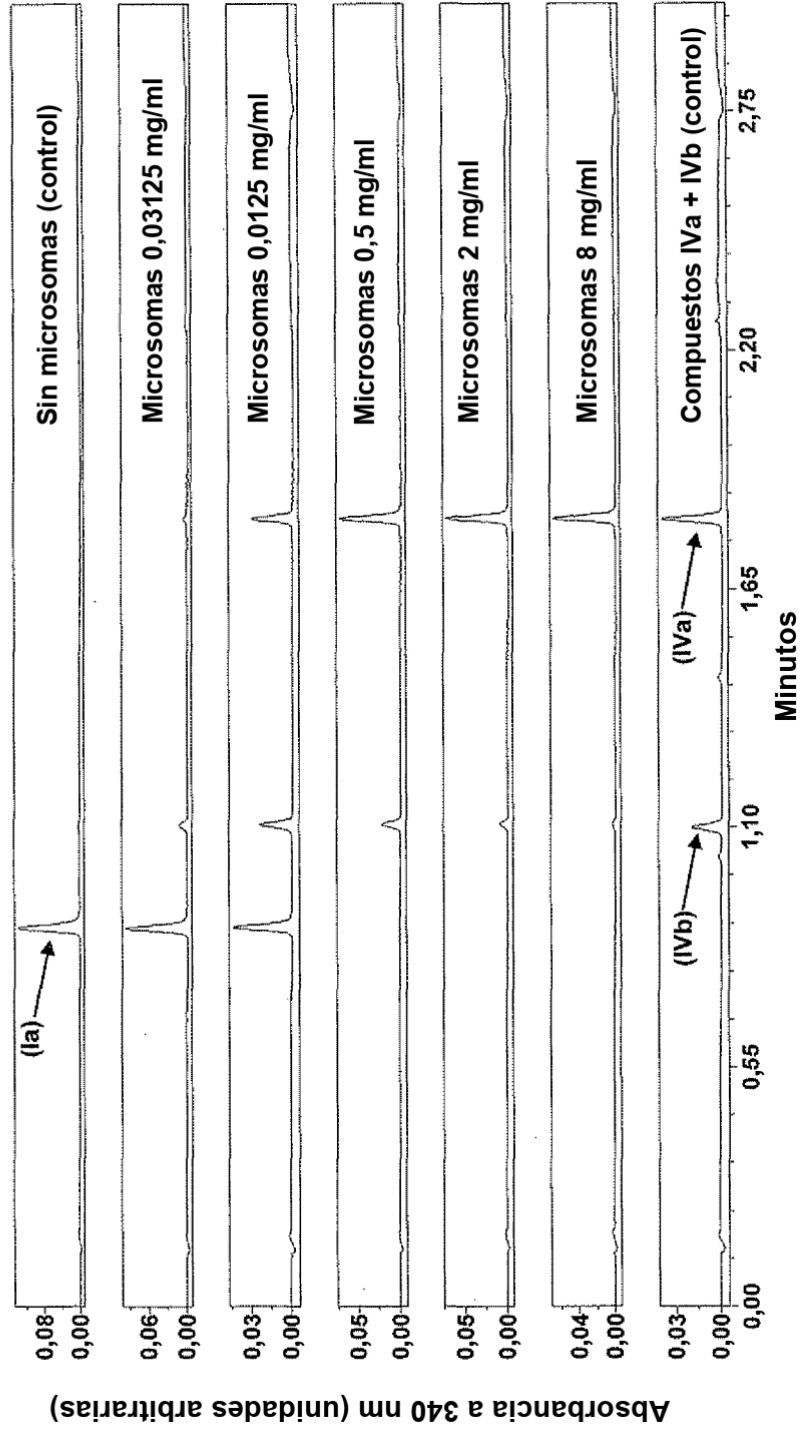


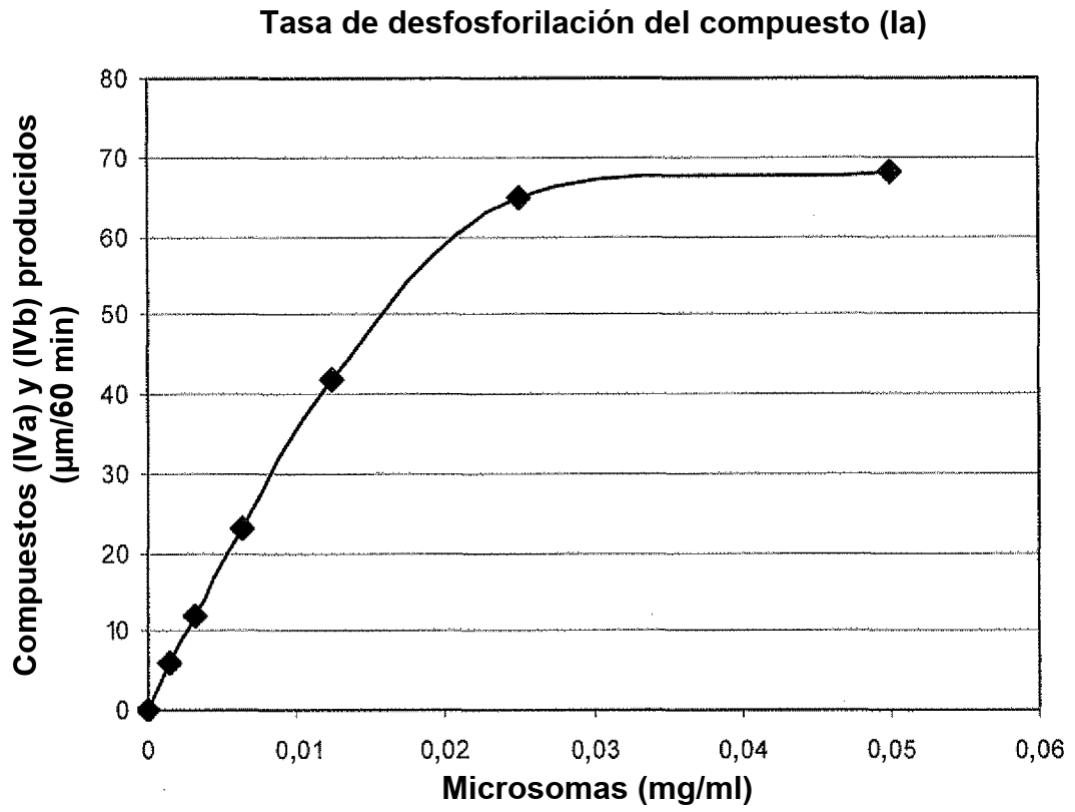
FIG. 6

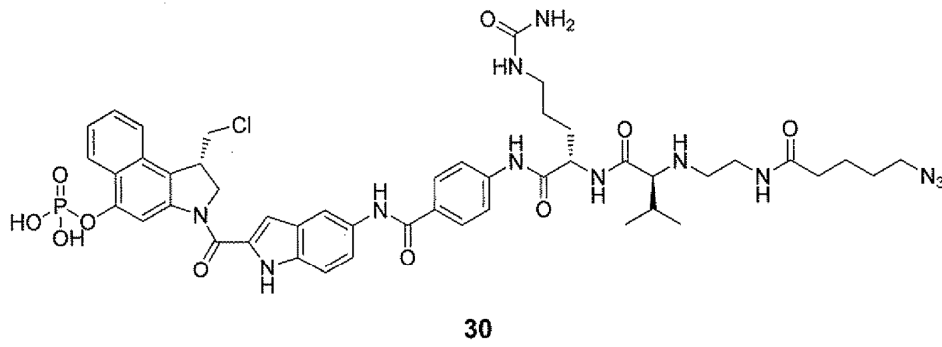
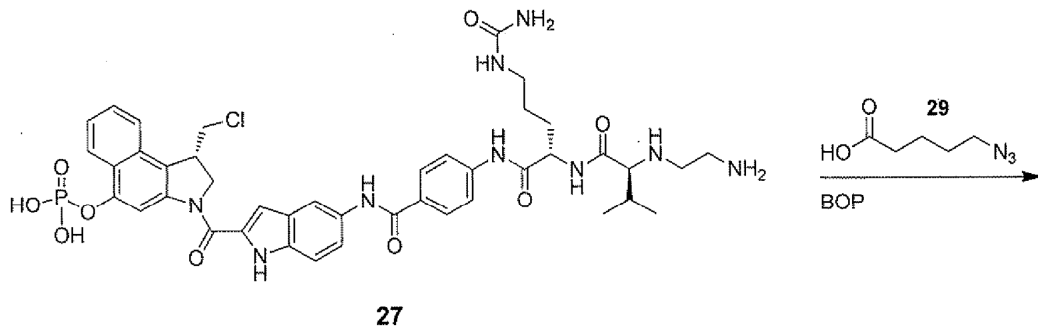
FIG. 7

FIG. 8

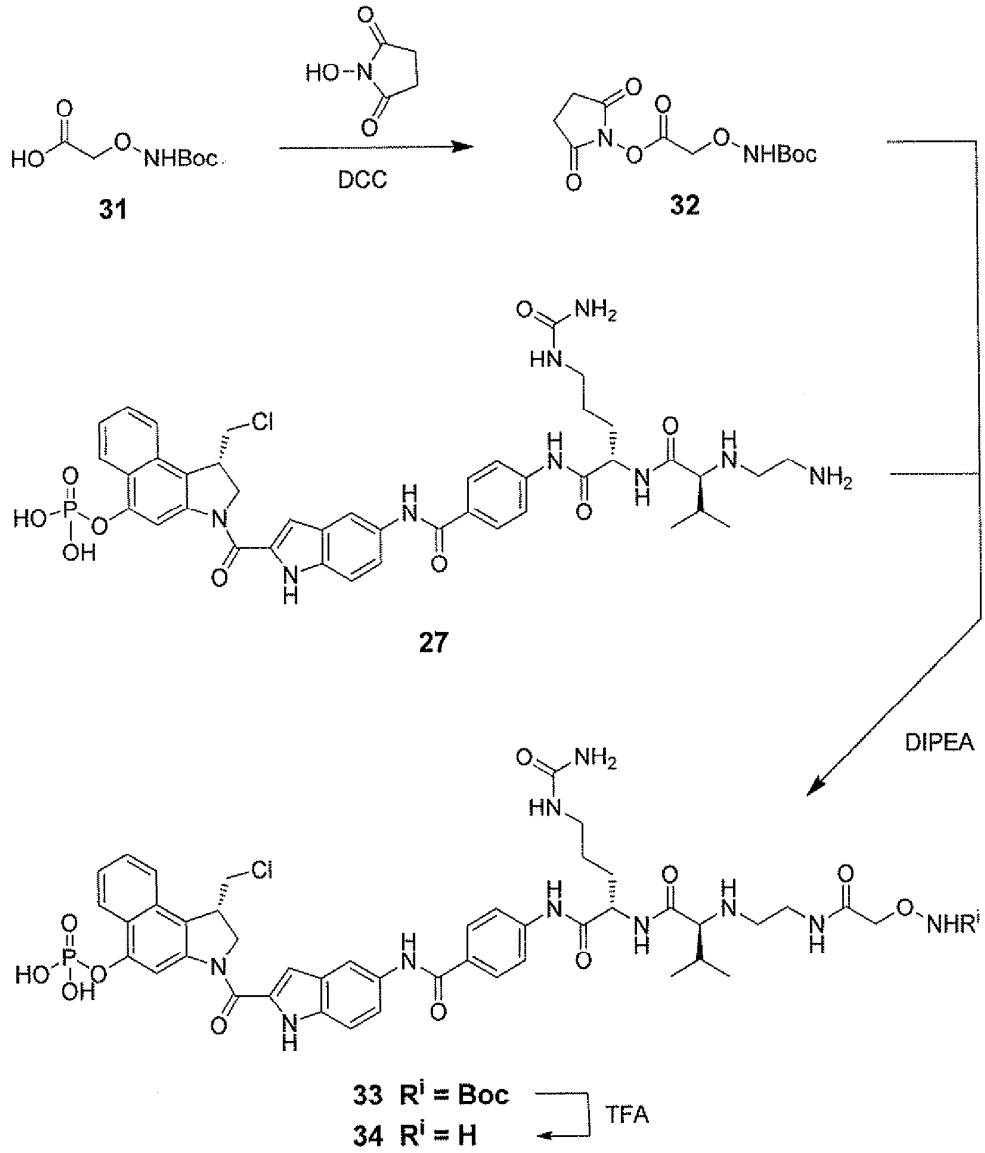


FIG. 9A

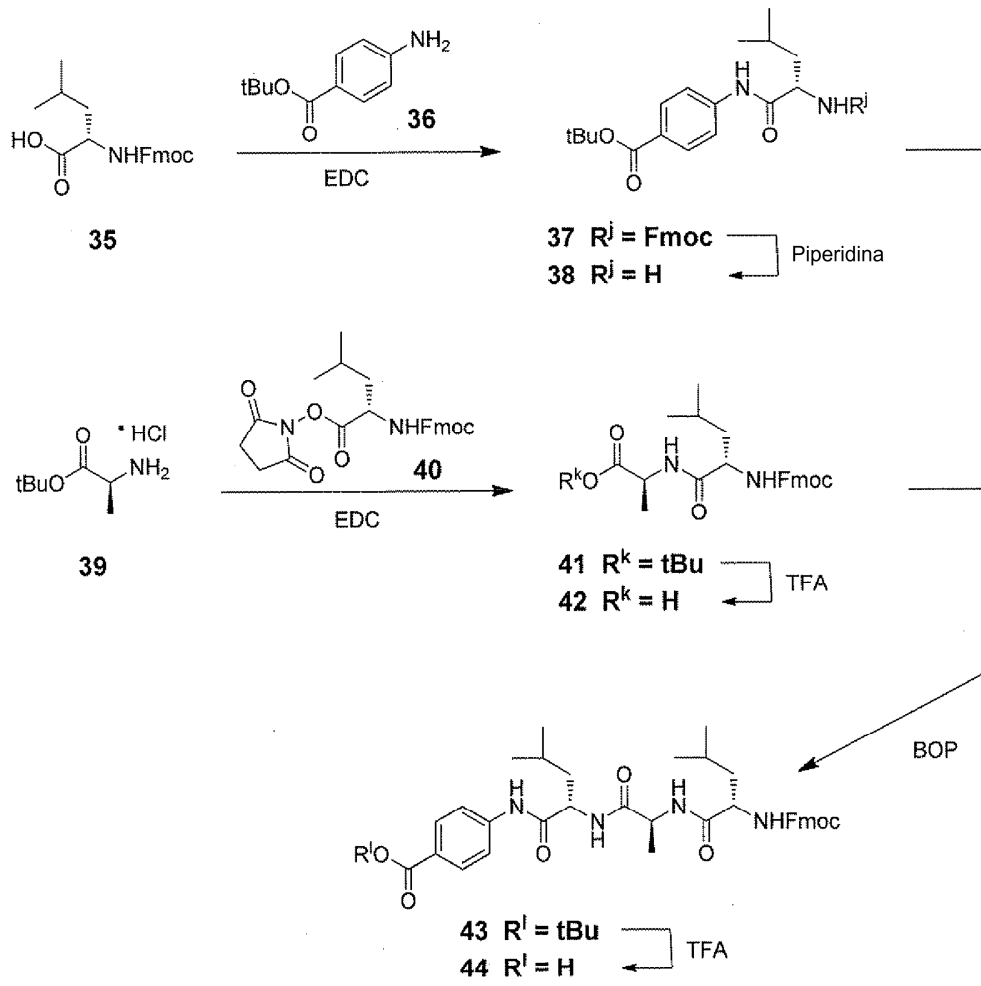


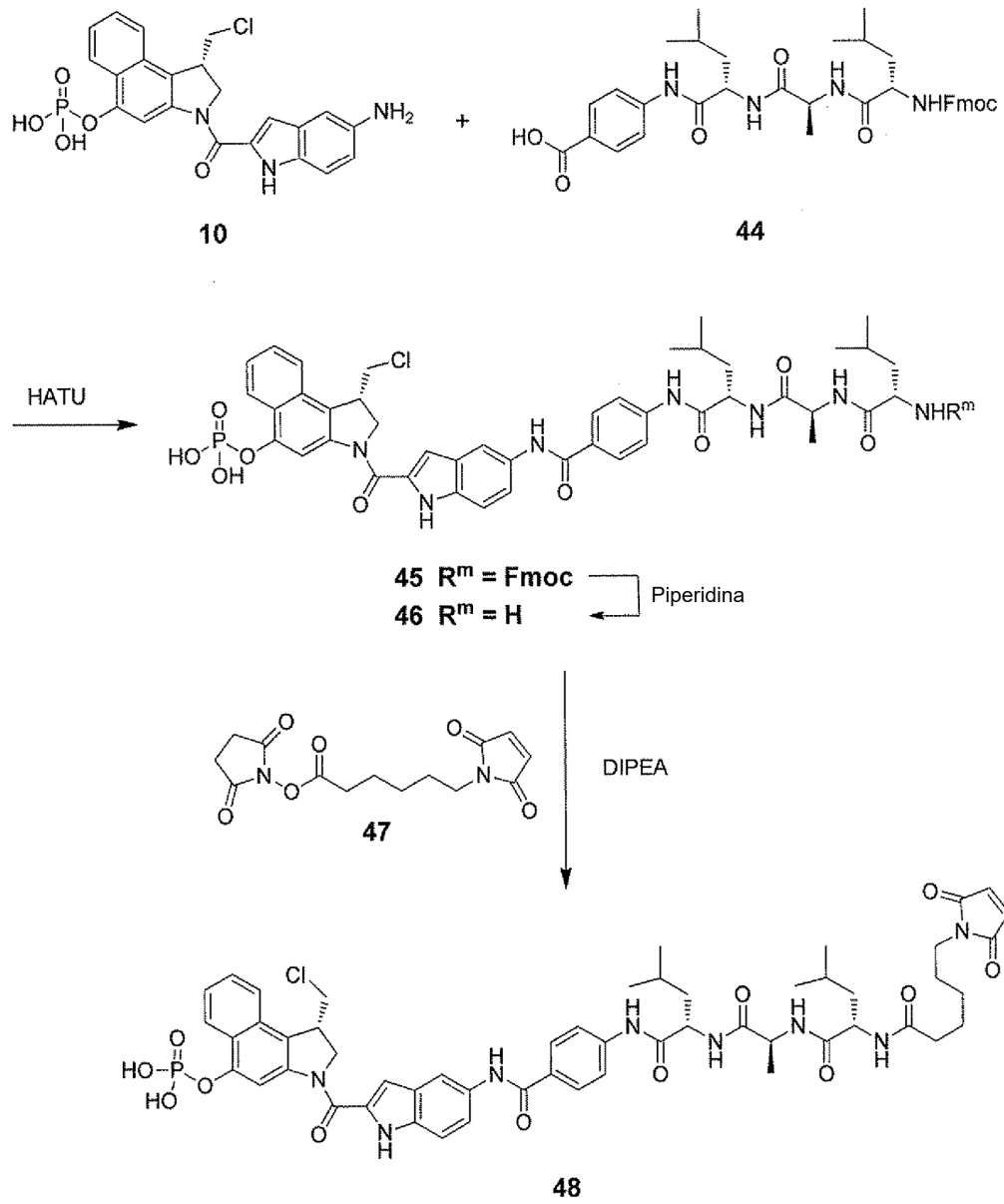
FIG. 9B

FIG. 10A

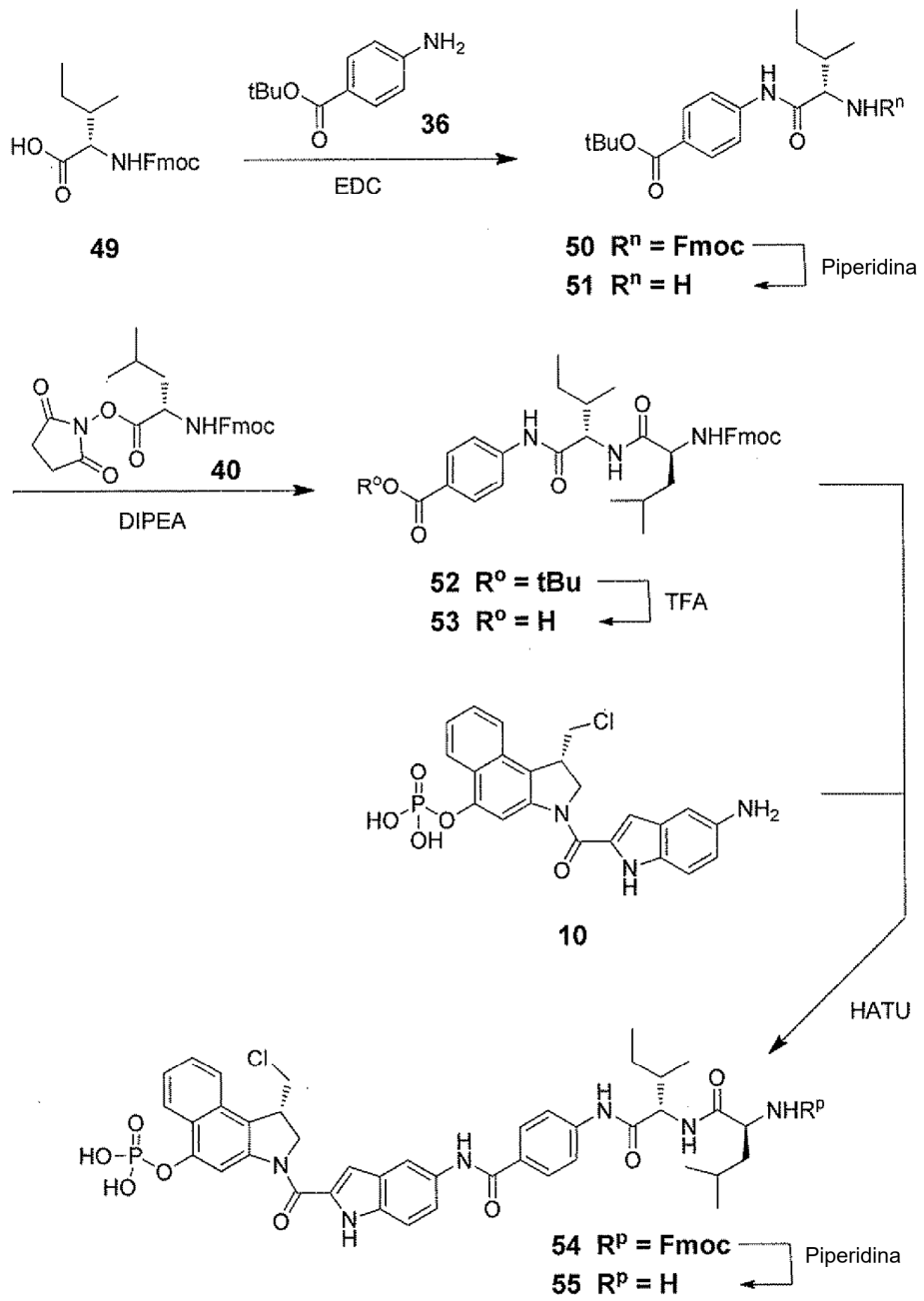


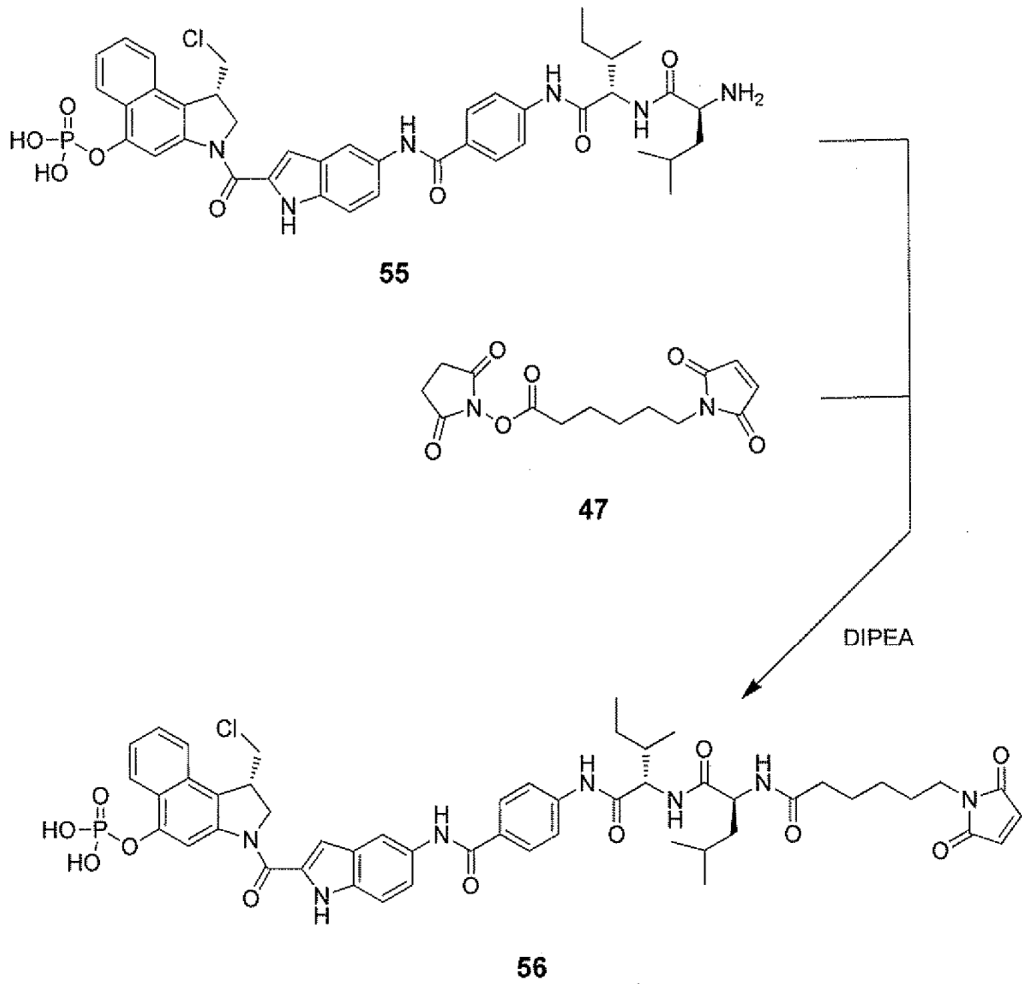
FIG. 10B

FIG. 11A

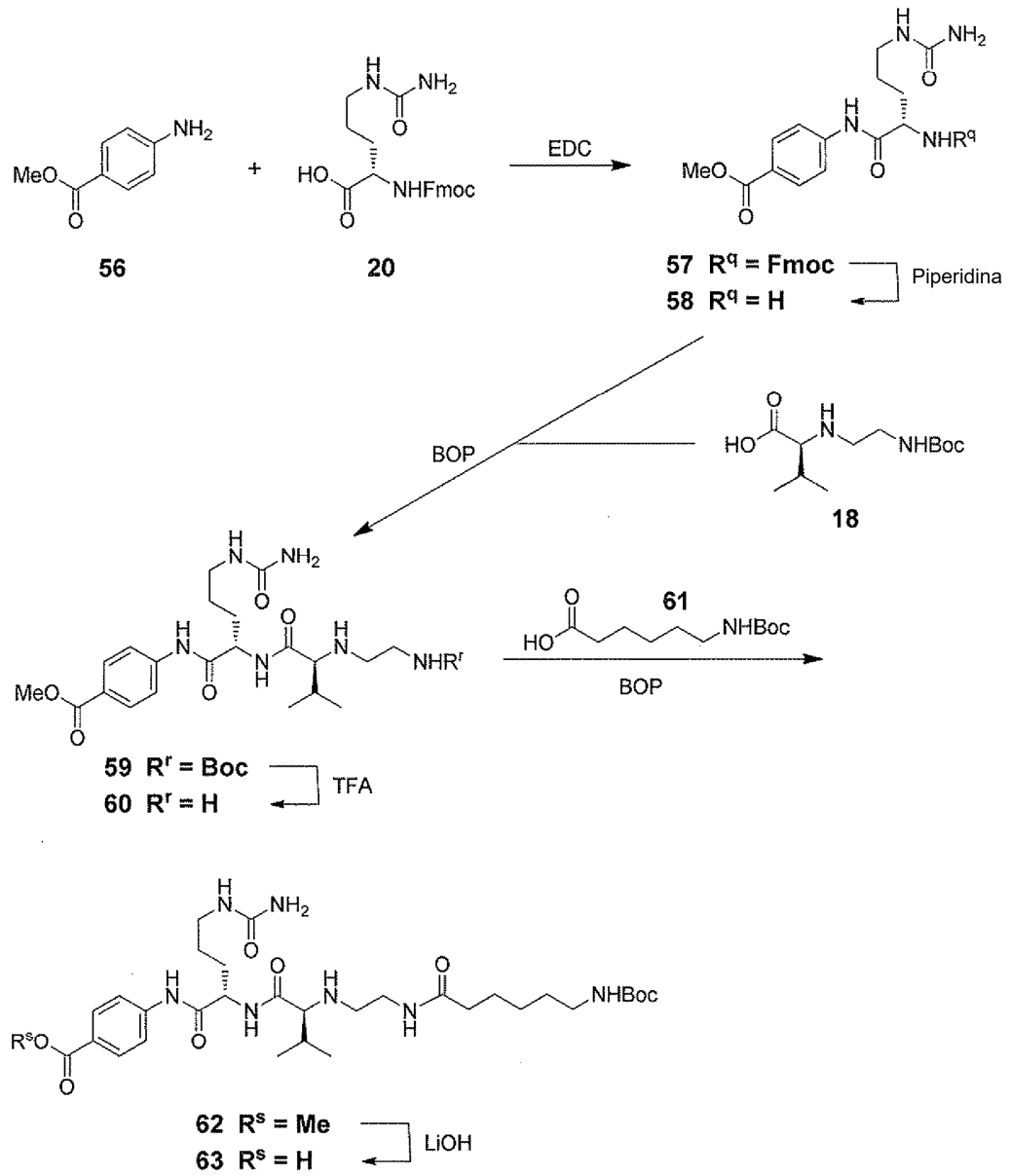


FIG. 11B

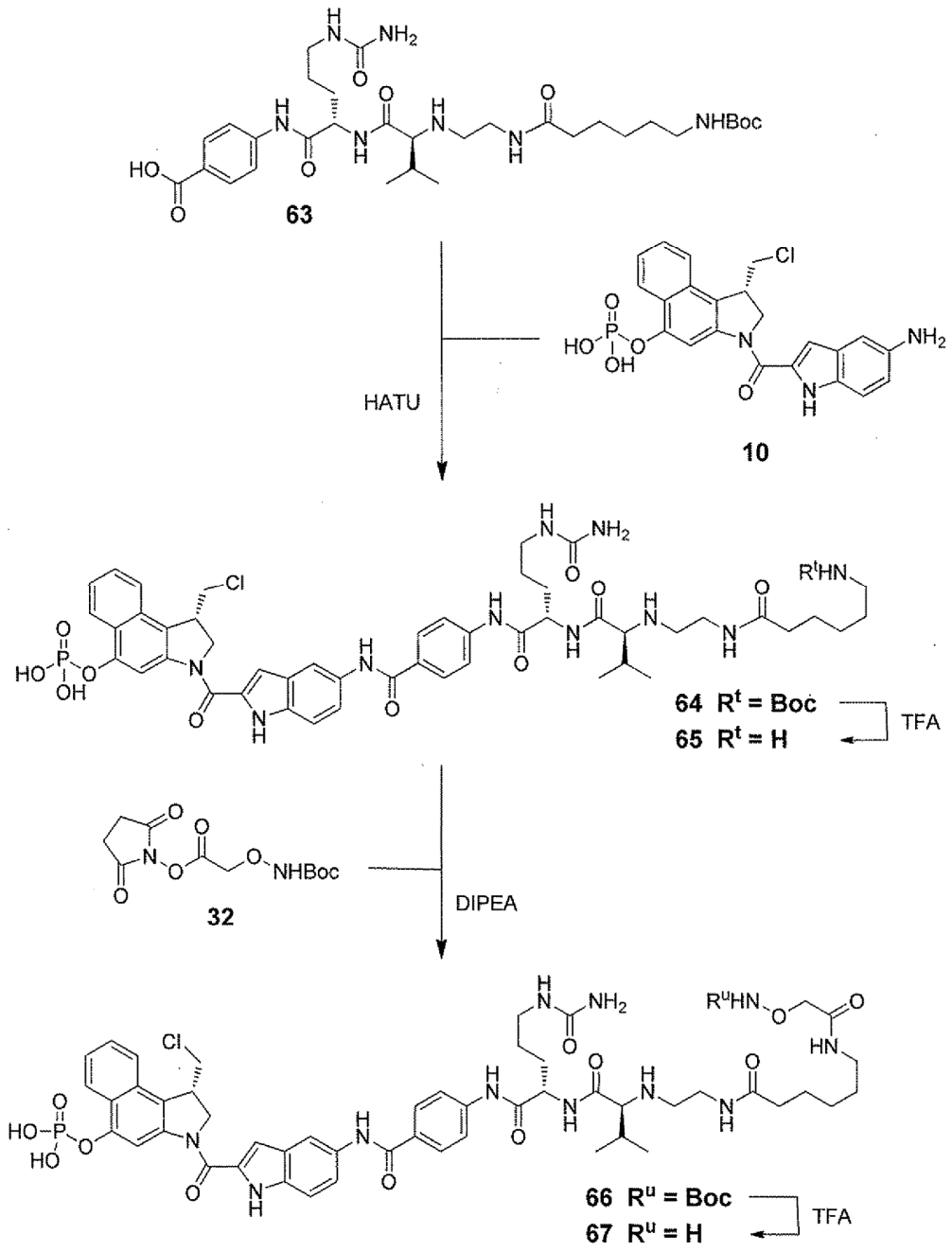


FIG. 12A

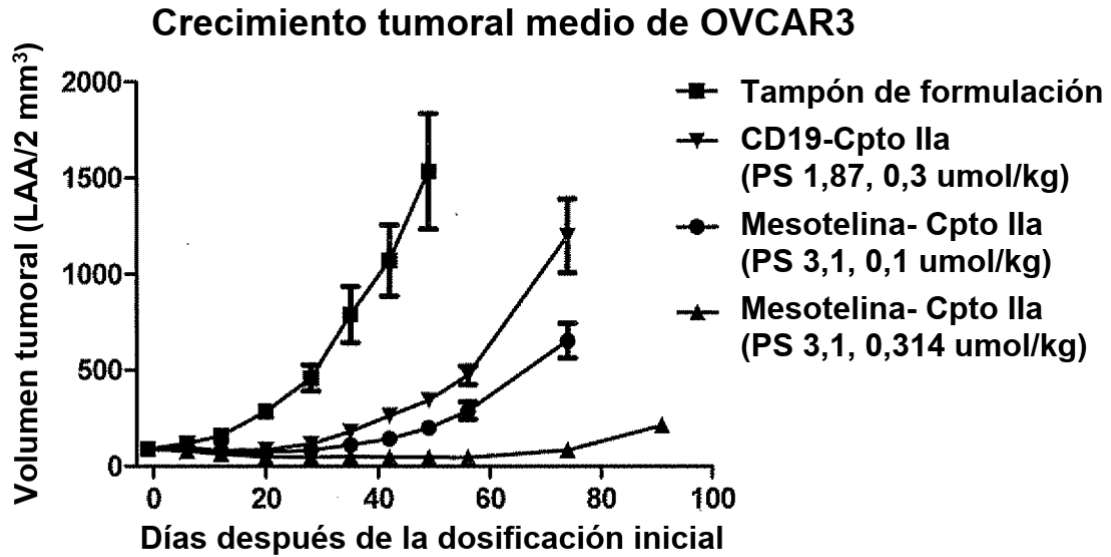


FIG. 12B

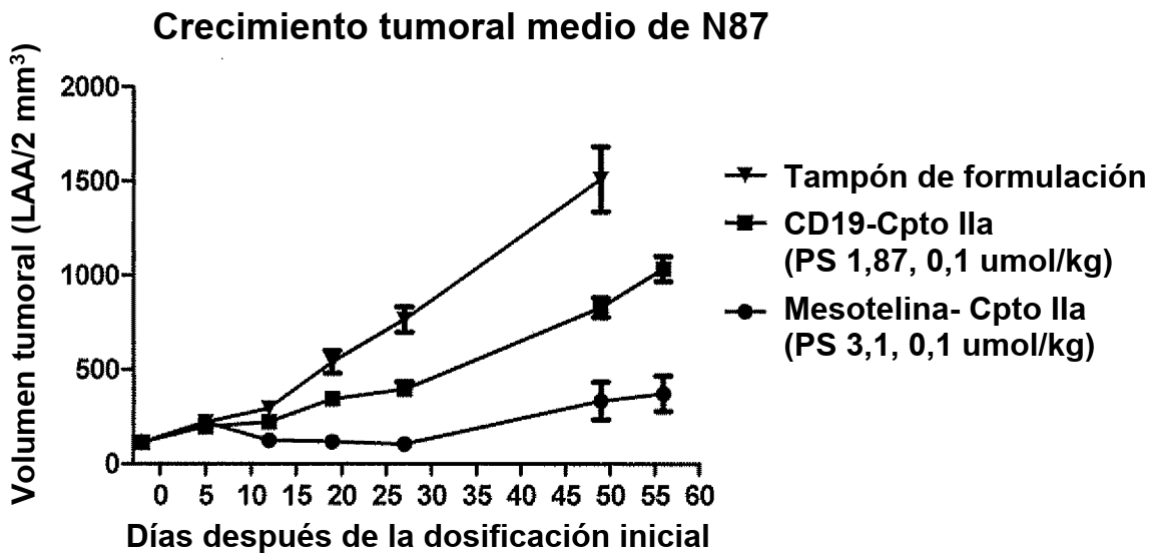


FIG. 12C

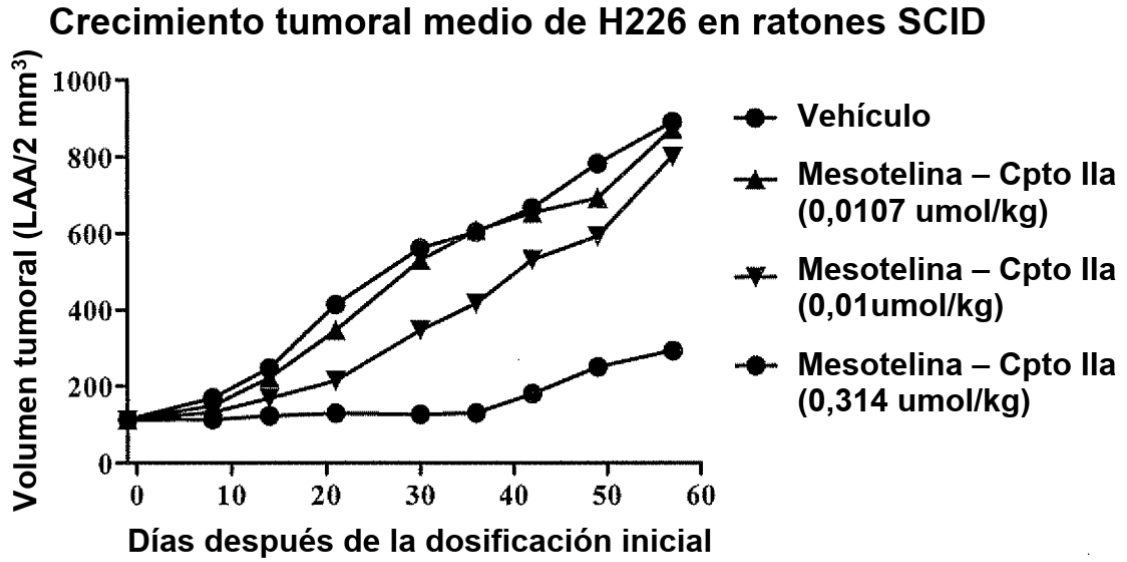


FIG. 12D

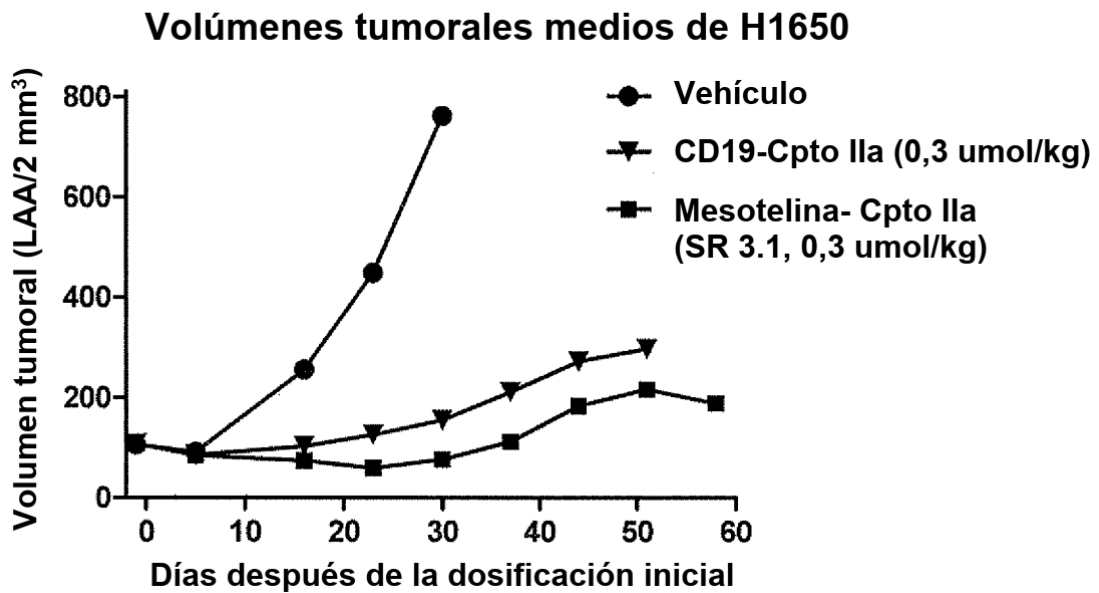


FIG. 12E

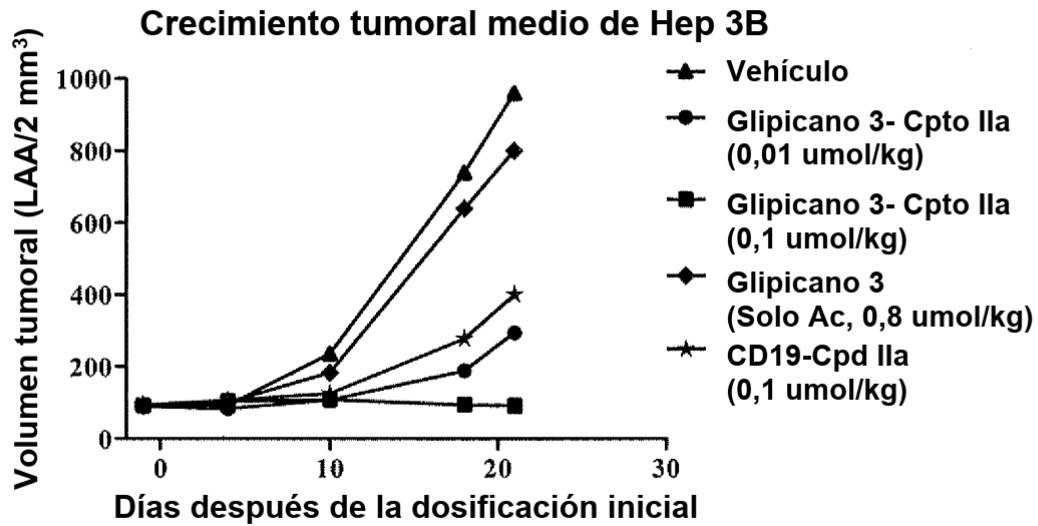


FIG. 12F

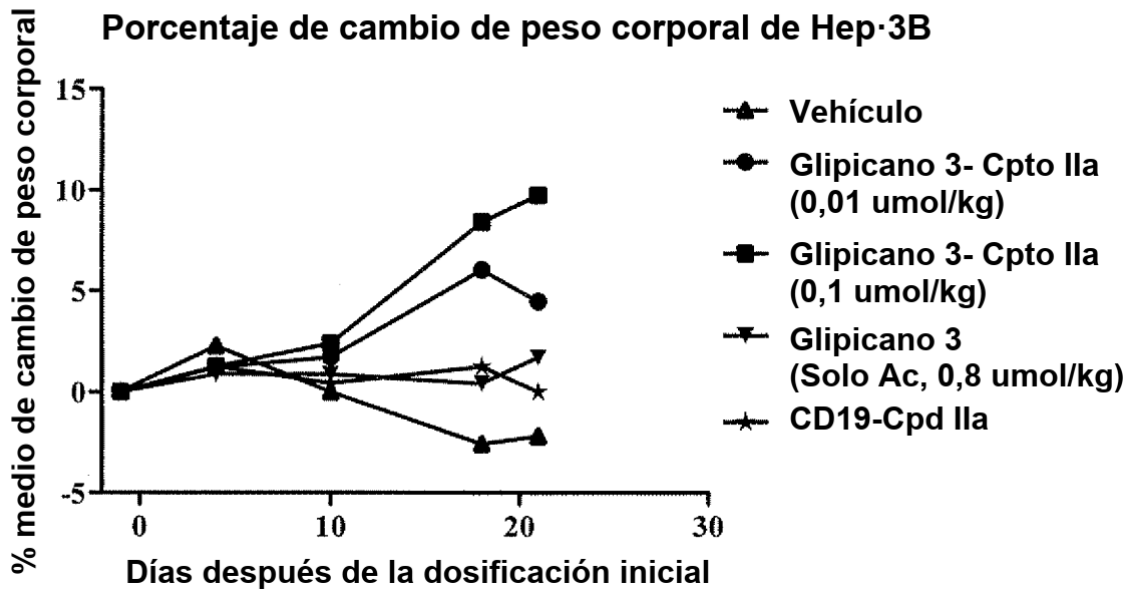


FIG. 12G

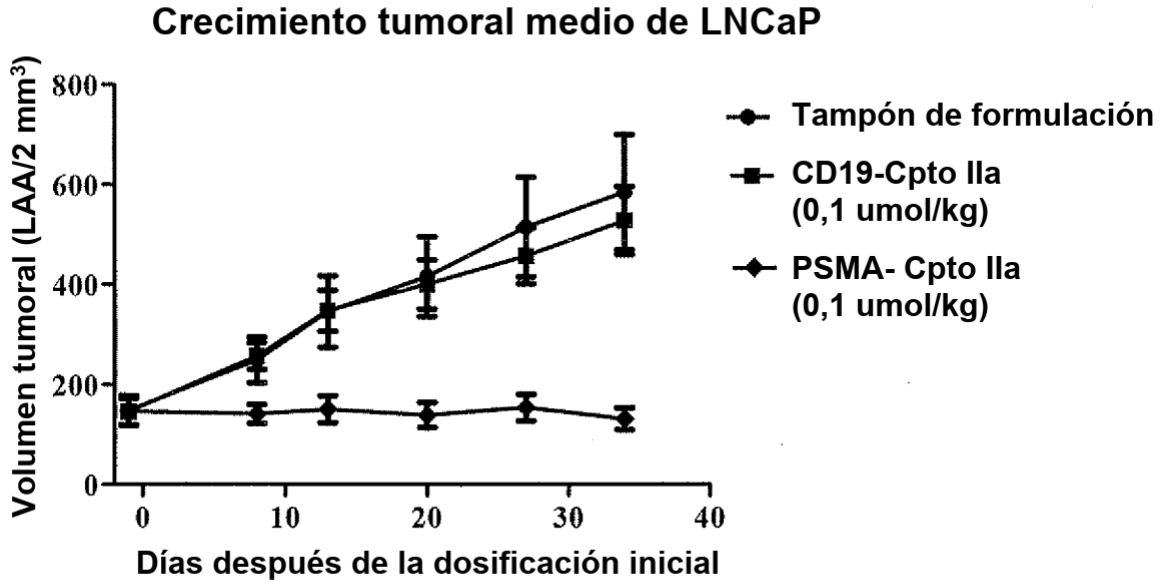


FIG. 12H

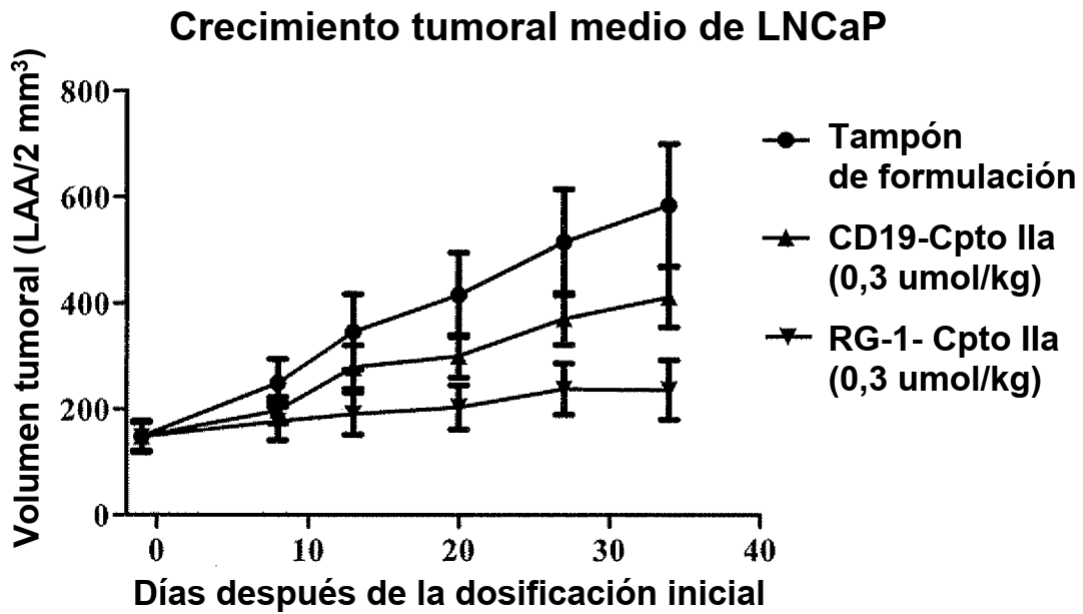


FIG. 12I

