

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 353**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

A61K 31/5513 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2015 PCT/US2015/048059**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16036801**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2015 E 15763739 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3189056**

54 Título: **Derivados de benzodiazepina citotóxicos**

30 Prioridad:

03.09.2014 US 201462045248 P

03.12.2014 US 201462087040 P

17.04.2015 US 201562149370 P

20.05.2015 US 201562164305 P

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

29.03.2021

73 Titular/es:

IMMUNOGEN, INC. (100.0%)

830 Winter Street

Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

CHARI, RAVI V.J.;

MILLER, MICHAEL LOUIS y

SHIZUKA, MANAMI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 815 353 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

Derivados de benzodiazepina citotóxicos

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a compuestos citotóxicos novedosos y conjugados citotóxicos que comprenden estos compuestos citotóxicos y agentes de unión celular. Más específicamente, la presente invención se refiere a compuestos de benzodiazepina novedosos, derivados de estos, intermedios de estos, conjugados de estos y sales farmacéuticamente aceptables de estos, los cuales son útiles como medicamentos, en particular como agentes antiproliferativos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Los derivados de benzodiazepina son compuestos útiles para tratar diversos trastornos e incluyen medicamentos tales como antiepilépticos (imidazo [2,1-b][1,3,5]benzotiadiazepinas, patente estadounidense N.º 4.444.688; patente estadounidense N.º 4.062.852), antibacterianos (pirimido[1,2-c][1,3,5]benzotiadiazepinas, GB 1476684), diuréticos e hipotensores (pirrolo(1,2-b)[1,2,5]benzotiadiazepina 5,5 dióxido, patente estadounidense N.º 3.506.646), hipolipidémicos (WO 03091232), antidepressivos (patente estadounidense N.º 3.453.266); osteoporosis (JP 2138272).

20 Se ha demostrado en modelos de tumores animales que los derivados de benzodiazepina, por ejemplo pirrolobenzodiazepinas (PBD), actúan como agentes antitumorales (1,2,5-benzotiadiazepina-1,1-dióxido sustituido con N-2-imidazolilalquilo, patente estadounidense N.º 6.156.746), benzo-pirido o dipirido tiadiazepina (WO 2004/069843), derivados de pirrolo [1,2-b] [1,2,5] benzotiadiazepinas y pirrolo[1,2-b][1,2,5] benzodiazepina (WO2007/015280), derivados de tomamicina (p. ej., pirrolo[1,4]benzodiazepinas), por ejemplo los descritos en WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930 y EP 2019104. También se conoce que las benzodiazepinas afectan el crecimiento celular y la diferenciación (Kamal A., *et al.*, Bioorg Med Chem. 15 de agosto de 2008;16(16):7804-10 (y las referencias citadas allí); Kumar R, Mini Rev Med Chem. Junio de 2003; 3(4):323-39 (y las referencias citadas allí); Bednarski J J, *et al.*, 2004; Sutter A. P, *et al.*, 2002; Blatt N B, *et al.*, 2002), Kamal A. *et al.*, Current Med. Chem., 2002; 2; 215-254, Wang J-J., J.Med. Chem., 2206; 49:1442-1449, Alley M.C. *et al.*, Cancer Res. 2004; 64:6700-6706, Pepper C. J., Cancer Res 2004; 74:6750-6755, Thurston D.E. y Bose D.S., Chem Rev 1994; 94:433-465; y Tozuka, Z., *et al.*, Journal of Antibiotics, (1983) 36; 1699-1708. La estructura general de las PBD se describe en el número de publicación estadounidense 20070072846. Las PBD difieren en el número, el tipo y la posición de los sustituyentes, en sus anillos A aromáticos y sus anillos C de pirrolo, y en el grado de saturación del anillo C. Su capacidad para formar un aducto en el ADN de reticulación y surco menor les permite interferir con el procesamiento del ADN y, por lo tanto, su potencial de uso como agentes antiproliferativos.

35 La primera pirrolobenzodiazepina en ingresar a la clínica, SJG-136 (NSC 694501) es un agente citotóxico potente que provoca reticulaciones entre cadenas de ADN (S.G Gregson *et al.*, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748; M.C. Alley *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6700-6706; J.A. Hartley *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6693-6699; C. Martin *et al.*, 2005, *Biochemistry.*, 44: 4135-4147; S. Arnould *et al.*, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 1602-1509). Los resultados de una evaluación clínica de fase I de SJG-136 reveló que este fármaco era tóxico en dosis extremadamente bajas (dosis máxima tolerada de 45 µg/m², y se observaron varios efectos adversos, incluso síndrome de fuga vascular, edema periférico, toxicidad en el hígado y fatiga. Se observó daño en el ADN en todas las dosis en los linfocitos circulantes (D. Hochhauser *et al.*, 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15: 2140-2147). Por ende, existe la necesidad de derivados de benzodiazepina mejorados que sean menos tóxicos y aun así sigan siendo terapéuticamente activos para tratar diversos estados de enfermedad proliferativa, por ejemplo cáncer.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

50 Los compuestos de benzodiazepina novedosos descritos en la presente y los conjugados de estos tienen sorprendentemente alta potencia contra diversas células tumorales.

Visto desde un aspecto, la invención proporciona un compuesto citotóxico como se define en la reivindicación 1.

55 Un objetivo de la invención es proporcionar conjugados de agentes de unión celular con los compuestos de benzodiazepina novedosos o derivados de estos de la presente invención. Estos conjugados son útiles como agentes terapéuticos, los cuales se administran específicamente a células diana y son citotóxicos.

Visto desde un segundo aspecto, la invención proporciona un conjugado como se define en la reivindicación 9.

60 En una realización, para los conjugados de la fórmula estructural (I'), el agente de unión celular es un anticuerpo del receptor anti-folato o un fragmento de anticuerpo de este. Más específicamente, el anticuerpo del receptor anti-folato es anticuerpo huMOV19.

En otra realización, para los conjugados de la fórmula estructural (I'), el agente de unión celular es un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de anticuerpo de este. En una realización, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no antagonista, incluido, por ejemplo, los anticuerpos descritos en WO2012058592. En otra realización, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no funcional, por ejemplo, ML66 humanizado. Más específicamente, el anticuerpo anti-EGFR es huML66.

5 Visto desde un tercer aspecto, la presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende los conjugados de la invención (y/o solvatos, hidratos y/o sales de estos) y un portador farmacéuticamente aceptable. La presente invención incluye adicionalmente una composición farmacéutica que comprende los conjugados de la invención (y/o solvatos, hidratos y/o sales de estos) y un portador farmacéuticamente aceptable que además comprende un segundo agente terapéutico. Las presentes composiciones son útiles para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (p. ej., un ser humano). Las presentes composiciones son útiles para tratar afecciones tales como cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección, inmunodeficiencia tal como SIDA, y enfermedades inflamatorias en un mamífero (p. ej., ser humano).

15 Visto desde un cuarto aspecto, la invención proporciona un compuesto del primer aspecto o un conjugado del segundo aspecto para su uso como medicamento.

20 Visto desde un quinto aspecto, la invención proporciona un compuesto del primer aspecto o un conjugado del segundo aspecto para su uso en un procedimiento como se define en la reivindicación 21.

En esta invención se describe también un procedimiento para sintetizar y utilizar compuestos de benzodiazepina novedosos, derivados de estos y conjugados de estos para el diagnóstico o tratamiento *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de células de mamíferos, organismos o afecciones patológicas asociadas.

25 Los compuestos de la presente invención, derivados de estos o conjugados de estos, y las composiciones que los comprenden, son útiles para tratar o disminuir la gravedad de trastornos, por ejemplo, caracterizados por crecimiento anormal de células (p. ej., cáncer). Otras aplicaciones para los compuestos y conjugados de la presente invención incluyen el tratamiento de afecciones tales como cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección, inmunodeficiencia tal como SIDA y enfermedades inflamatorias en un mamífero (p. ej., ser humano).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 La figura 1 muestra afinidad de unión del conjugado **huMOV19-14** en comparación con el anticuerpo huMOV19 no conjugado en células T47D.

La figura 2 muestra citotoxicidad *in vitro* y especificidad del conjugado **huMOV19-14**.

40 La figura 3 muestra que el conjugado **huMOV19-14** presenta efecto citotóxico testigo débil en las células negativas al antígeno vecinas.

Las figuras 4A, 4B y 4C muestran citotoxicidad *in vitro* del conjugado **huMy9-6-14** contra diversas líneas celulares.

45 Las figuras 5A y 5B muestran que el conjugado **huMy9-6-14** presenta efecto citotóxico testigo en las células negativas al antígeno vecinas.

La figura 6 muestra eficacia *in vivo* de los conjugados **huMOV19-80** y **huMOV19-90** en ratones SCID que presentan NCI-H2110.

50 Las figuras 7A-7D muestran perfiles de espectrometría de masas de conjugados representativos de la presente invención.

La figura 8 muestra perfil de espectrometría de masas del conjugado **huML66-90**.

55 La figura 9 muestra citotoxicidad *in vitro* y especificidad del conjugado **huML66-90**.

Las figuras 10, 11 y 12 muestran citotoxicidad *in vitro* y especificidad del conjugado **huMOV19-90**.

60 La figura 13 muestra que el conjugado huMOV19-90 presenta efecto citotóxico testigo fuerte en las células negativas al antígeno vecinas.

- La figura 14 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-90** en ratones SCID que presentan NCI-H2110.
- 5 Las figuras 15A y 15B muestran afinidad de unión del conjugado **huMOV19-90** en comparación con el anticuerpo huMOV19 no conjugado en células T47D.
- La figura 16 muestra perfiles de espectrometría de masas de un conjugado representativo de la presente invención.
- 10 La figura 17 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huML66-90** en ratones SCID que presentan NCI-H1703 NSCEC.
- La figura 18 muestra farmacocinética de **huMOV19-90** en ratones CD-1.
- 15 Las figuras 19A y 19B muestran la estructura del conjugado **huMOV19-90** (figura 19A) y un esquema para la incubación, purificación e aislamiento de catabolitos del conjugado **huMOV19-90** formado en células de cáncer de cuello uterino KB *in vitro* (figura 19B). Los tres catabolitos identificados por EC-MS se muestran junto con la masa calculada.
- La figura 20 muestra afinidad de unión del conjugado **huMOV19-107** en comparación con el anticuerpo huMOV19 no conjugado en células T47D.
- 20 La figura 21 muestra citotoxicidad *in vitro* y especificidad de los conjugados **huMOV19-90** y **huMOV19-107**.
- La figura 22 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-90** en ratones SCID que presenta xenoinjertos NCI-H2110 NSCEC.
- 25 La figura 23 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-90** en ratones SCID que presentan xenoinjertos endometriales Hec-1b.
- La figura 24 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-90** en ratones SCID que presentan xenoinjertos endometriales Ishikawa.
- 30 La figura 25 muestra eficacia *in vivo* del conjugado **huMOV19-107** en ratones SCID que presenta xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC.
- La figura 26 muestra afinidad de unión del conjugado **huCD123-6Gv4.7S3-90** en comparación con el anticuerpo no conjugado en células HNT-34.
- 35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 40 A continuación, se hará referencia de forma detallada a determinadas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Si bien la invención se describirá junto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que no se pretende limitar la invención a tales realizaciones. Por el contrario, se pretende que la invención abarque todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se puedan incluir dentro del alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones. Un experto en la técnica reconocerá varios procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, los cuales podrían utilizarse en la práctica de la presente invención.
- 45 Se debe entender que cualquiera de las realizaciones descritas en la presente, incluido aquellas descritas bajo diferentes aspectos de la invención (p. ej., compuestos, moléculas enlazadoras de compuestos, conjugados, composiciones, procedimientos de preparar y utilizar) y diferentes partes de la memoria descriptiva (incluido las realizaciones descritas solo en los ejemplos) se pueden combinar con una o más realizaciones diferentes de la invención, a menos que se niegue explícitamente o sea inadecuado.
- 50

DEFINICIONES

- 55 Según se emplea en la presente, el término “**agente de unión celular**” o “**CBA**” se refiere a un compuesto que se puede unir a una célula (p. ej., en un ligando de superficie celular) o unir a un ligando asociado con la célula o próximo a esta, preferentemente de un modo específico. En determinadas realizaciones, la unión a la célula o a un ligando en la célula o cerca de esta es específica. El CBA puede incluir péptidos y no péptidos.
- 60 “**Alquilo lineal o ramificado**”, según se emplea en la presente, se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada saturado de uno a veinte átomos de carbono. Algunos ejemplos de alquilo incluyen metilo, etilo,

1-propilo, 2-propilo, 1-butilo, 2-metil-1-propilo, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, 2-butilo, 2-metil-2-propilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo, 3,3-dimetil-2-butilo, 1-heptilo y 1-octilo. Preferentemente, el alquilo tiene de uno a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquilo tiene de uno a cuatro átomos de carbono.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

“**Alquenilo lineal o ramificado**” se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a veinte átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación, es decir, un carbono-carbono, doble enlace, en donde el radical alquenilo incluye radicales que tienen orientaciones “cis” y “trans”, o alternativamente, orientaciones “E” y “Z”. Algunos ejemplos incluyen etilenilo o vinilo ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) y alilo ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$). Preferentemente, el alquenilo tiene de dos a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquilo tiene de dos a cuatro átomos de carbono.

“**Alquinilo lineal o ramificado**” se refiere a un radical hidrocarburo monovalente lineal o ramificado de dos a veinte átomos de carbono con al menos un sitio de insaturación, es decir, un enlace triple carbono-carbono. Algunos ejemplos incluyen etinilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo y hexinilo. Preferentemente, el alquinilo tiene de dos a diez átomos de carbono. Más preferentemente, el alquinilo tiene de dos a cuatro átomos de carbono.

Los términos “**carbociclo**”, “**carbocíclico**” y “**anillo carbocíclico**” se refieren a un anillo saturado o parcialmente insaturado, no aromático, monovalente que tiene de 3 a 12 átomos de carbono como un anillo monocíclico o de 7 a 12 átomos de carbono como un anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen de 7 a 12 átomos se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], y los carbociclos bicíclicos que tienen 9 o 10 átomos del anillo se pueden disponer como un sistema biciclo [5,6] o [6,6] o como sistemas puenteados como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano y biciclo[3.2.2]nonano. Algunos ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclodecilo, cicloundecilo y ciclododecilo.

Los términos “**alquilo cíclico**” y “**cicloalquilo**” se pueden utilizar indistintamente. Se refieren a un radical de anillo carbocíclico saturado monovalente. Preferentemente, el alquilo cíclico es un radical de anillo monocíclico de 3 a 7 miembros. Más preferentemente, el alquilo cíclico es ciclohexilo.

El término “**alquenilo cíclico**” se refiere a un radical de anillo carbocíclico que tiene al menos un enlace doble en la estructura del anillo.

El término “**alquinilo cíclico**” se refiere a un radical de anillo carbocíclico que tiene al menos un enlace triple en la estructura del anillo.

“**Arilo**” significa un radical hidrocarbonado aromático monovalente de 6-18 átomos de carbono derivado por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillos aromáticos parental. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras ejemplares como “Ar”. El arilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático fusionado con un anillo saturado o parcialmente insaturado o un anillo heterocíclico o carbocíclico aromático. Los grupos arilo típicos incluyen radicales derivados de benceno (fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno y 1,2,3,4-tetrahidronaftilo. Preferentemente, arilo es un grupo fenilo.

Los términos “**heterociclo**”, “**heterociclilo**” y “**anillo heterocíclico**” se utilizan de forma indistinta en la presente y hacen referencia a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, que tiene uno o más enlaces dobles y/o triples dentro del anillo) de 3 a 18 átomos en el anillo, donde al menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, y los átomos del anillo restantes son C, en donde uno o más átomos del anillo están opcionalmente sustituidos de forma independiente con uno o más sustituyentes que se describen a continuación. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros del anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros del anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 6 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A., “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W. A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 al presente), en particular volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. “**Heterociclilo**” también incluye radicales donde los radicales heterociclo se encuentran fusionados con un anillo carbocíclico o heterocíclico saturado, parcialmente insaturado o aromático. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tiioxanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidínilo, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepínilo, diazepínilo, tiazepínilo, 2-pirrolínilo, 3-pirrolínilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo,

dihidrofuranilo, pirazolidiniloimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo y azabicyclo[2.2.2]hexanilo. Los restos espiro también están incluidos dentro del alcance de esta definición. Algunos ejemplos de un grupo heterocíclico en donde se sustituyen átomos del anillo con restos de oxo (=O) son pirimidinonilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo.

5 El término "**heteroarilo**" se refiere a un radical aromático monovalente de anillos de 5 o 6 miembros e incluye sistemas de anillos fusionados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5-18 átomos que contienen uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Algunos ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (incluido, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (incluido, por ejemplo, 4-
10 hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinnolinilo, indazolilo, indolizínilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridinilo.

15 Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden ser carbono (unido a carbono) o nitrógeno (unido a nitrógeno) unidos donde sea posible. A modo de ejemplo, los heteroarilos o heterociclos unidos a carbono pueden estar unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, posición 2 o 3 de una aziridina,
20 posición 2, 3 o 4 de un azetidina, posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolina o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina.

A modo de ejemplo, los heteroarilos o heterociclos unidos a nitrógeno pueden estar unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrolo, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, posición 2 de un isoindol o isoindolina, posición 4 de una morfolina y posición 9 de un carbazol u O-carbolina.

Los heteroátomos presentes en heteroarilo o heterociclo incluyen formas oxidadas como NO, SO y SO₂.

30 El término "**halo**" o "**halógeno**" se refiere a F, Cl, Br o I.

El alquilo, alqueno, alquino, alquilo cíclico, alqueno cíclico, alquino cíclico, carbociclo, arilo, heterociclo y heteroarilo descritos arriba pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituyentes.

35 Si un sustituyente se describe como "**sustituido**", un sustituyente no hidrógeno se encuentra en lugar de un sustituyente hidrógeno en un carbono, oxígeno, azufre o nitrógeno del sustituyente. Por lo tanto, por ejemplo, un sustituyente alquilo sustituido es un sustituyente alquilo en donde al menos un sustituyente no hidrógeno se encuentra en lugar de un sustituyente hidrógeno en el sustituyente alquilo. A modo de ilustración, el monofluoroalquilo es alquilo sustituido con un sustituyente fluoro y difluoroalquilo es alquilo sustituido con dos sustituyentes fluoro. Se debe reconocer que si hay más
40 de una sustitución en un sustituyente, cada sustituyente no hidrógeno puede ser idéntico o diferente (a menos que se indique algo diferente).

Si un sustituyente se describe como "**opcionalmente sustituido**", el sustituyente puede estar o bien (1) no sustituido o (2) sustituido. Si un carbono de un sustituyente se describe como opcionalmente sustituido con uno o más de una lista de sustituyentes, uno o más de los hidrógenos en el carbono (en caso de que haya) se pueden reemplazar por separado y/o
45 junto con un sustituyente opcional seleccionado de forma independiente. Si un nitrógeno de un sustituyente se describe como opcionalmente sustituido con uno o más de una lista de sustituyentes, uno o más de los hidrógenos en el nitrógeno (en caso de que haya) se pueden reemplazar cada uno con un sustituyente opcional seleccionado de forma independiente. Un sustituyente ejemplar se puede describir como -NR'R", en donde R' y R" junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, pueden formar un anillo heterocíclico. El anillo heterocíclico formado a partir de R' y R", junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, pueden estar parcial o totalmente saturados. En una realización, el anillo heterocíclico consiste en 3 a 7 átomos. En otra realización, el anillo heterocíclico se selecciona del grupo que consiste en pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, isoxazolilo, piridilo y tiazolilo.

55 La presente memoria descriptiva emplea los términos "**sustituyente**", "**radical**" y "**grupo**" indistintamente.

Si un grupo de sustituyentes se describen colectivamente como opcionalmente sustituidos por uno o más de una lista de sustituyentes, el grupo puede incluir: (1) sustituyentes no sustituibles, (2) sustituyentes sustituibles que no están sustituidos por los sustituyentes opcionales y/o (3) sustituyentes sustituibles que están sustituidos por uno o más de los
60 sustituyentes opcionales.

- Si un sustituyente se describe como opcionalmente sustituido con hasta una cantidad específica de sustituyentes no hidrógeno, dicho sustituyente puede estar (1) no sustituido; o (2) sustituido por hasta esa cantidad particular de sustituyentes no hidrógeno o por hasta la cantidad máxima de posiciones sustituibles en el sustituyente, lo que sea inferior.
- 5 Por ende, por ejemplo, si un sustituyente se describe como un heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 sustituyentes no hidrógeno, entonces cualquier heteroarilo con menos de 3 posiciones sustituibles estaría opcionalmente sustituido por hasta solamente tantos sustituyentes no hidrógeno como las posiciones sustituibles que tenga el heteroarilo. Dichos sustituyentes, en los ejemplos no taxativos, se pueden seleccionar de un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tenga de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo, heterocíclico, halógeno, guanidinio [-NH(C=NH)NH₂], -OR¹⁰⁰, NR¹⁰¹R¹⁰², -NO₂, -NR¹⁰¹COR¹⁰², -SR¹⁰⁰, un sulfóxido representado por -SOR¹⁰¹, una sulfona representada por -SO₂R¹⁰¹, un sulfonato -SO₃M, un sulfato -OSO₃M, una sulfonamida representada por -SO₂NR¹⁰¹R¹⁰², ciano, un azido, -COR¹⁰¹, -OCOR¹⁰¹, -OCONR¹⁰¹R¹⁰² y una unidad de polietilenglicol (-CH₂CH₂O)_nR¹⁰¹ en donde M es H o un catión (como Na⁺ o K⁺); R¹⁰¹, R¹⁰² y R¹⁰³ se seleccionan cada uno independientemente de H, alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol (-CH₂CH₂O)_n-R¹⁰⁴, en donde n es un entero de 1 a 24, un arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono, un anillo heterocíclico que tiene de 3 a 10 átomos de carbono y un heteroarilo que tiene de 5 a 10 átomos de carbono; y R¹⁰⁴ es H o un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, en donde el alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heterocíclico en los grupos representados por R¹⁰⁰, R¹⁰¹, R¹⁰², R¹⁰³ y R¹⁰⁴ están opcionalmente sustituidos con uno o más (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 o más) sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, -OH, -CN, -NO₂ y alquilo lineal o ramificado insustituido que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Preferentemente, los sustituyentes para el alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilo cíclico, alquenilo cíclico, alquinilo cíclico, carbocíclico, arilo, heterocíclico y heteroarilo opcionalmente sustituido descritos arriba incluyen halógeno, -CN, -NR¹⁰²R¹⁰³, -CF₃, -OR¹⁰¹, arilo, heteroarilo, heterocíclico, -SR¹⁰¹, -SOR¹⁰¹, -SO₂R¹⁰¹ y -SO₃M.
- 15
- 20
- 25 Los términos “**compuesto**” o “**compuesto citotóxico**”, “**dímero citotóxico**” y “**compuesto de dímero citotóxico**” se utilizan indistintamente. Incluyen los compuestos para los cuales se ha descrito una estructura o fórmula, o cualquier derivado de estos, en la presente invención. El término también incluye, estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros, solvatos, metabolitos, sales (p. ej., sales farmacéuticamente aceptables) y profármacos y sales de profármacos de un compuesto de todas las fórmulas descritas en la presente invención. El término también incluye cualquier solvato, hidrato y polimorfo de cualquiera de los anteriores. La mención específica de “estereoisómeros”, “isómeros geométricos”, “tautómeros”, “solvatos”, “metabolitos”, “sal”, “profármaco”, “sal de profármaco”, “conjugados”, “sal de conjugados”, “solvato”, “hidrato” o “polimorfo” en determinados aspectos de la invención descrita en la presente solicitud no se debe interpretar como una omisión intencionada de estas formas en otros aspectos de la invención en donde el término “compuesto” se utiliza sin mención de estas otras formas.
- 30
- 35 El término “**conjugado**”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto descrito en la presente o un derivado del mismo que está unido a un agente de unión celular.
- 40 El término “**que se puede unir a un agente de unión celular**”, según se utiliza en la presente, se refiere a los compuestos descritos en la presente, o derivados de estos, que comprenden al menos un grupo de unión o un precursor de este adecuado para unir estos compuestos o derivados de estos a un agente de unión celular.
- 45 El término “**precursor**” de un grupo determinado se refiere a cualquier grupo que puede dar lugar a dicho grupo mediante cualquier desprotección, una modificación química o una reacción de acoplamiento.
- 50 El término “**unido a un agente de unión celular**” se refiere a una molécula conjugada que comprende al menos uno de los compuestos descritos en la presente (p. ej., compuestos de fórmula (I) y compuestos de fármaco-enlazador descritos en la presente), o un derivado de estos, unido a un agente de unión celular a través de un grupo de unión adecuado o un precursor de este.
- 55 El término “**quiral**” se refiere a moléculas que tienen la propiedad de imposibilidad de superposición de imágenes especulares, mientras que el término “**aquiral**” se refiere a moléculas que son superponibles con sus imágenes especulares.
- 60 El término “**estereoisómero**” se refiere a compuestos que tienen constitución química y conectividad idénticas, pero diferentes orientaciones de sus átomos en el espacio que no se puede interconvertir por rotación alrededor de enlaces simples.
- “**Diastereómero**” se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, p. ej. puntos de fusión, puntos de

ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse mediante procedimientos analíticos de alta resolución, por ejemplo, cristalización, electroforesis y cromatografía.

5 “**Enantiómeros**” se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

Las convenciones y definiciones estereoquímicas que se utilizan en la presente siguen, en líneas generales, lo planteado por S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y por Eliel, E. y Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la invención pueden contener centros quirales o asimétricos y, por lo tanto, existen en diferentes formas estereoisoméricas. Se pretende que formen parte de la presente invención todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la invención, los que incluyen de modo no taxativo diastereómeros, enantiómeros y atropisómeros, así como mezclas de estos, tales como mezclas racémicas. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de desviar el plano de luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S se utilizan para denotar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de luz polarizada plana por el compuesto, donde (-) o l significa que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrorrotatorio. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos salvo que son imágenes especulares uno del otro. También se puede hacer referencia a un estereoisómero específico como un enantiómero y una mezcla de tales isómeros a menudo se denomina mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, que puede ocurrir donde no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos “mezcla racémica” y “racemato” se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, sin actividad óptica.

25 El término “**tautómero**” o “**forma tautomérica**” se refiere a isómeros estructurales de distintas energías que son interconvertibles a través de una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros por transferencia de protones (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones a través de la migración de un protón, tal como isomerizaciones cetoenólicas e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones mediante la reorganización de algunos de los electrones de unión.

30 El término “**profármaco**”, según se emplea en la presente solicitud, se refiere a un precursor o una forma derivada de un compuesto de la invención que es capaz de activarse de forma enzimática o hidrolítica o convertirse en la forma parental más activa. Véase, p. ej., Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy,” *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615^o Meeting Belfast (1986) y Stella *et al.*, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen profármacos que contienen ésteres, profármacos que contienen fosfatos, profármacos que contienen tiofosfatos, profármacos que contienen sulfatos, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por aminoácido D, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Algunos ejemplos de fármacos citotóxicos que se pueden derivar en una forma de profármaco incluyen compuestos de la invención y agentes quimioterapéuticos como los descritos arriba.

45 El término “**profármaco**” también incluye un derivado de un compuesto que se puede hidrolizar, oxidar o reaccionar de otro modo en condiciones biológicas (*in vitro* o *in vivo*) para proporcionar un compuesto de la presente invención. Los profármacos solo se pueden volver activos tras dicha reacción en condiciones biológicas o pueden tener actividad en sus formas sin reaccionar. Algunos ejemplos de profármacos contemplados incluyen análogos o derivados de compuestos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente que comprenden restos biohidrolizables como amidas biohidrolizables, ésteres biohidrolizables, carbamatos biohidrolizables, carbonatos biohidrolizables, ureidos biohidrolizables y análogos de fosfato biohidrolizables. Otros ejemplos de profármacos incluyen derivados de compuestos de cualquiera de las fórmulas descritas en la presente que comprenden restos -NO, -NO₂, -ONO o -ONO₂. Los profármacos se pueden preparar típicamente utilizando procedimientos conocidos, como los descritos por Burger’s *Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff ed., 5^o ed.); véase también Goodman y Gilman’s, *The Pharmacological basis of Therapeutics*, 8^o ed., McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, “Biotransformation of Drugs.”

55 Una forma preferida de profármaco incluye compuestos (con o sin grupos de unión) y conjugados de la invención que comprenden un aducto formado entre un enlace imina de los compuestos/conjugados y un reactivo de reacción imina. Otra forma preferida de profármaco de la invención incluye compuestos como aquellos de fórmula (I), en donde cuando la línea doble == entre N y C representa un enlace simple, X es H y el compuesto se convierte en un profármaco. Un profármaco de la invención puede contener una o ambas formas de profármacos descritas en la presente (p. ej., las que

contienen un aducto formado entre un enlace imina de los compuestos/conjugados y un reactivo de reacción imina y/o las que contienen un grupo saliente Y cuando X es -H).

5 El término “**reactivo de reacción imina**” se refiere a un reactivo que es capaz de reaccionar con un grupo imina. Algunos ejemplos de reactivos de reacción imina incluyen sulfitos (H_2SO_3 , H_2SO_2 o una sal de HSO_3^- , SO_3^{2-} o HSO_2^- formada con un catión), metabisulfito ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$ o una sal de $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ formada con un catión), mono, di, tri y tetraiofosfatos (PO_3SH_3 , $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$, POS_3H_3 , PS_4H_3 o una sal de PO_3S^{3-} , $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$, POS_3^{3-} o PS_4^{3-} formada con un catión), ésteres de tiofosfato $\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$, R^iSH , R^iSOH , $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$, $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$, diversas aminas (hidroxilamina (p. ej., NH_2OH), hidrazina (p. ej., NH_2NH_2), $\text{NH}_2\text{O R}^i$, $\text{R}^i\text{NH-R}^i$, NH_2-R^i), $\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, $\text{NH}_2-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ tiosulfato ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$ o una sal de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ formada con un catión), ditionita ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$ o una sal de $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ formada con un catión), fosforoditioato ($\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{SH})(\text{OH})$ o una sal de este formada con un catión), ácido hidroxámico ($\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NHOH}$ o una sal formada con un catión), hidrazida ($\text{R}^k\text{CONHNH}_2$), sulfoxilato de formaldehído ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$ o una sal de $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$ formada con un catión, como $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{Na}^+$), nucleótido glicado (como GDP-manosa), fludarabina o una mezcla de estos, en donde R^i y R^i son cada uno independiente un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 10 átomos de carbono y están sustituidos con al menos un sustituyente seleccionado de $-\text{N}(\text{R}^i)_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ y $-\text{PO}_3\text{H}$; R^i y R^i además pueden estar opcionalmente sustituidos con un sustituyente para un alquilo descrito en la presente; R^i es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono; y R^k es un alquilo, alqueno o alquino lineal, ramificado o cíclico que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heterociclilo o heteroarilo (preferentemente, R^k es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 4 átomos de carbono; más preferentemente, R^k es metilo, etilo o propilo). Preferentemente, el catión es un catión monovalente, como Na^+ o K^+ .
10 Preferentemente, el reactivo de reacción imina se selecciona de sulfitos, hidroxilamina, urea e hidrazina. Más preferentemente, el reactivo de reacción imina es NaHSO_3 o KHSO_3 .

Según se utiliza en la presente y a menos que se indique algo diferente, los términos “**amida biohidrolizable**”, “**éster biohidrolizable**”, “**carbamato biohidrolizable**”, “**carbonato biohidrolizable**”, “**ureido biohidrolizable**” y “**análogo de fosfato biohidrolizable**” significan una amida, éster, carbamato, carbonato, ureido o análogo de fosfato, respectivamente, que o bien: 1) no destruye la actividad biológica del compuesto y le confiere al compuesto propiedades ventajosas *in vivo*, como absorción, duración de la acción o inicio de la acción; o 2) es en sí mismo biológicamente inactivo, pero se convierte *in vivo* en un compuesto biológicamente activo. Algunos ejemplos de amidas biohidrolizables incluyen amidas de alquilo inferior, amidas de α -aminoácido, amidas de alcoxiacilo y amidas de alquilaminoalquilcarbonilo. Algunos ejemplos de ésteres biohidrolizables incluyen ésteres de alquilo inferior, ésteres de alcoxiaciloxi, ésteres de alquilo acilamino alquilo y ésteres de colina. Algunos ejemplos de carbamatos biohidrolizables incluyen alquilaminas inferiores, etilendiaminas sustituidas, aminoácidos, hidroxialquilaminas, aminas heterocíclicas y heteroaromáticas y aminas de poliéter. Los profármacos favorecidos particularmente y las sales de profármaco son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de la presente invención cuando dichos compuestos se administran a un mamífero.

La frase “**sal farmacéuticamente aceptable**”, tal como se emplea en la presente, hace referencia a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Algunas sales ejemplares incluyen las sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metansulfonato “mesilato”, etansulfonato, bencensulfonato, p-toluensulfonato, pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)), sales de metales alcalinos (p. ej., de sodio y de potasio), sales de metales alcalinotérreos (p. ej., magnesio) y sales de amonio. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion de acetato, un ion de succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Las instancias en que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden presentar múltiples contraiones. Por consiguiente, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Si el compuesto de la invención es una base, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse mediante cualquier procedimiento disponible en la técnica, por ejemplo, el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico y ácido fosfórico o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosídico, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido alfa hidroxil, tal como ácido cítrico o tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico.

Si el compuesto de la invención es un ácido, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, el tratamiento del ácido libre con una base orgánica o inorgánica, tal

5 como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoníaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cinc, aluminio y litio.

10 Según se emplea en la presente, el término “**solvato**” significa un compuesto que además incluye una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de disolvente como agua, isopropanol, acetona, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y diclorometano de etanolamina, 2-propanol, unidos por fuerzas intermoleculares no covalentes. Los solvatos o los hidratos de los compuestos se preparan fácilmente mediante el añadido de al menos un equivalente molar de un disolvente hidroxílico como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol o agua al compuesto para producir la solvatación o hidratación del resto imina.

15 Los términos “**crecimiento celular anormal**” y “**trastorno proliferativo**” se utilizan indistintamente en la presente solicitud. “**Crecimiento celular anormal**”, según se emplea en la presente, a menos que se indique lo contrario, se refiere al crecimiento celular que es independiente de los mecanismos reguladores normales (p. ej., pérdida de la inhibición por contacto). Esto incluye, por ejemplo, el crecimiento anormal de: (1) células tumorales (tumores) que proliferan mediante la expresión de una tirosina cinasa mutada o la sobreexpresión de una tirosina cinasa receptora; (2) células benignas y malignas de otras enfermedades proliferativas en las cuales se produce la activación de la tirosina cinasa aberrante; (3) cualquier tumor que prolifera mediante tirosina cinasas receptoras; (4) cualquier tumor que prolifera mediante la activación de serina/treonina cinasa aberrante; y (5) células benignas y malignas de otras enfermedades proliferativas en las cuales se produce la activación de la serina/treonina cinasa aberrante.

25 Los términos “**cáncer**” y “**canceroso**” describen o hacen referencia a la afección fisiológica en mamíferos, la que se encuentra normalmente caracterizada por el crecimiento celular no regulado. Un “**tumor**” comprende una o más células cancerosas y/o benignas o células precancerosas.

30 Un “**agente terapéutico**” abarca un agente biológico como un anticuerpo, un péptido, una proteína, una enzima o un agente quimioterapéutico.

Un “**agente quimioterapéutico**” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer.

35 Un “**metabolito**” es un producto producido mediante el metabolismo en el cuerpo de un compuesto específico, un derivado de este o un conjugado de este, o una sal de este. Los metabolitos de un compuesto, un derivado de este o un conjugado de este se pueden identificar utilizando técnicas de rutina conocidas en la técnica y sus actividades se pueden determinar utilizando pruebas como las que se describen en la presente. Tales productos pueden ser el resultado, por ejemplo, de oxidación, hidroxilación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación y escisión enzimática del compuesto administrado. En consecuencia, la invención incluye metabolitos de compuestos, un derivado de estos o un conjugado de estos, de la invención, incluido compuestos, un derivado de estos o un conjugado de estos, producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto, un derivado de este o un conjugado de este, de la presente invención con un mamífero durante un período suficiente para producir un producto metabólico de este.

45 La frase “**farmacéuticamente aceptable**” indica que la sustancia o la composición debe ser química y/o toxicológicamente compatible con los otros ingredientes comprendidos en una formulación y/o el mamífero que se trata con estos.

50 El término “**grupo protector**” o “**resto protector**” se refiere a un sustituyente que comúnmente se emplea para bloquear o proteger una funcionalidad particular mientras hace reaccionar otros grupos funcionales en el compuesto, un derivado de este o un conjugado de este. Por ejemplo, un “**grupo protector amina**” o un “**resto protector amino**” es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege la funcionalidad del amino en el compuesto. Estos grupos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, P. Wuts y T. Greene, 2007, Protective Groups in Organic Synthesis, capítulo 7, J. Wiley & Sons, NJ) y se ejemplifican por carbamatos como carbamato de metilo y etilo, Fmoc, carbamatos de etilo sustituidos, carbamatos escindidos por eliminación de 1,6-β (también denominada “**autodestructivo**”), derivados de alquilo, arilo, ureas, amidas y péptidos. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBZ) y 9-fluorenilmetileno carbonilo (Fmoc). Para encontrar una descripción general de grupos protectores y su uso, véase P. G.M. Wuts y T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, Nueva York, 2007.

60 El término “**grupo saliente**” se refiere a un grupo de resto cargado o no cargado que parte durante una sustitución o desplazamiento. Dichos grupos salientes son conocidos en la técnica e incluyen halógenos, ésteres, alcoxi, hidroxilo, tosيلات, triflatos, mesilatos, nitrilos, azida, carbamato, disulfuros, tioéteres, tioésteres y compuestos de diazonio.

El término “**agente de reticulación bifuncional**”, “**enlazador bifuncional**” o “**agentes de reticulación**” se refiere a agentes modificadores que poseen dos grupos reactivos; uno de los cuales es capaz de reaccionar con un agente de unión celular, mientras que el otro reacciona con el compuesto citotóxico para unir los dos restos. Dichos reticuladores bifuncionales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Isalm y Dent en *Bioconjugation*, capítulo 5, p218-363, Groves Dictionaries Inc. Nueva York, 1999). Por ejemplo, los agentes de reticulación bifuncionales que permiten la unión a través de un enlace de tioéter incluyen *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) para introducir grupos maleimido o con *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB) para introducir grupos yodoacetilo. Otros agentes de reticulación bifuncionales que introducen grupos maleimido o grupos haloacetilo a un agente de unión celular se conocen en la técnica (véanse las solicitudes de patente estadounidense 2008/0050310, 20050169933, disponible de Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, EUA) e incluyen bis-maleimidopoli(etilenglicol) (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, éster de *N*-(β-maleimidopropiloxi)succinimida (BMPS), ácido γ-maleimidobutírico éster de *N*-succinimidilo (GMBS), éster de *N*-hidroxisuccinimida de ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), NHS de ácido 5-maleimidovalérico, HBVS, *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de “cadena larga” de SMCC (LC-SMCC), éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), hidrazida o sal HCl de ácido 4-(4-*N*-maleimidofenil)-butírico (MPBH), 3-(bromoacetamido)propionato de *N*-succinimidilo (SBAP), yodoacetato de *N*-succinimidilo (SIA), éster de *N*-succinimidilo de ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), 4-(*p*-maleimidofenil)-butirato de *N*-succinimidilo (SMPB), succinimidil-6-(β-maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), succinimidil-(4-vinilsulfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimidobutano (BMB), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxitbutano (BMDB), bis-maleimidohexano (BMH), bis-maleimidoetano (BMOE), 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), sulfosuccinimidil(4-yodo-acetil)aminobenzoato (sulfo-SIAB), éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS), éster de *N*-(γ-maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida (sulfo-GMBS), éster de *N*-(ε-maleimidocaproiloxi)sulfosuccinimido (sulfo-EMCS), éster de *N*-(κ-maleimidoundecanoiloxi)sulfosuccinimida (sulfo-KMUS) y 4-(*p*-maleimidofenil)butirato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMPB).

Los agentes de reticulación heterobifuncionales son agentes de reticulación bifuncionales que tienen dos grupos reactivos diferentes. Los agentes de reticulación heterobifuncionales que contienen un grupo *N*-hidroxisuccinimida reactivo a amina (grupo NHS) y un grupo hidrazina reactivo a carbonilo también se pueden utilizar para unir los compuestos citotóxicos descritos en la presente con un agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo). Algunos ejemplos de dichos agentes de reticulación heterobifuncionales disponibles a nivel comercial incluyen hidrazona de acetona de 6-hidrazinonicotinamida de succinimidilo (SANH), clorhidrato de 4-hidrazidotereftalato de succinimidilo (SHTH) y clorhidrato de nicotinato de hidrazinio de succinimidilo (SHNH). Los conjugados que poseen un enlazador lábil al ácido también se pueden preparar utilizando un derivado de benzodiazepina que posee hidrazina de la presente invención. Algunos ejemplos de agentes de reticulación bifuncionales que se pueden utilizar incluyen benzoato de succinimidil-*p*-formilo (SFB) y succinimidil-*p*-formilfenoxiacetato (SFPA).

Los agentes de reticulación bifuncionales que permiten la unión del agente de unión celular con compuestos citotóxicos mediante enlaces disulfuro se conocen en la técnica e incluyen *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. En la técnica se conocen otros agentes de reticulación bifuncionales que pueden usarse para introducir grupos disulfuro y se describen en las patentes estadounidenses 6.913.748, 6.716.821 y en las publicaciones de patentes estadounidenses 20090274713 y 20100129314. Alternativamente, también se pueden utilizar agentes de reticulación como 2-iminotiolano, tiolactona de homocisteína o anhídrido de *S*-acetilsuccínico que introducen grupos tiol.

Un “**enlazador**”, un “**resto enlazador**” o un “**grupo de unión**”, según se define en la presente, se refiere a un resto que conecta dos grupos, como un agente de unión celular y un compuesto citotóxico. Típicamente, el enlazador es sustancialmente inerte en las condiciones para las cuales los dos grupos que conecta están unidos. Un agente de reticulación bifuncional puede comprender dos grupos reactivos, uno en cada extremo de un resto enlazador, de modo que se pueda hacer reaccionar primero un grupo reactivo con el compuesto citotóxico para proporcionar un compuesto que tiene el resto enlazador y un segundo grupo reactivo, que después puede reaccionar con un agente de unión celular. Alternativamente, un extremo del agente de reticulación bifuncional se puede hacer reaccionar primero con el agente de unión celular para proporcionar un agente de unión celular que posee un resto enlazador y un segundo grupo reactivo, que después puede reaccionar con un compuesto citotóxico. El resto de unión puede contener un enlace químico que permite la liberación del resto citotóxico en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles al ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles a peptidasa y enlaces lábiles a esterasa (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 y 7.414.073). Se prefieren los enlaces disulfuro, enlaces lábiles a peptidasa y tioéter. Se describen también en esta invención enlazadores no escindibles, como los que

se describen detalladamente en la publicación estadounidense número 20050169933 o enlazadores cargados o enlazadores hidrofílicos y se describen en US 2009/0274713, US 2010/01293140 y WO 2009/134976.

Se describen también en esta invención los grupos enlazadores con un grupo reactivo adjunto en un extremo, tal como un éster reactivo, seleccionado entre los siguientes: -

- 5
 $O(CR_{20}R_{21})m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-O(CR_{20}R_{21})m(CR_{26}=CR_{27})m'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-O(CR_{20}R_{21})m(alkynyl)n'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-O(CR_{20}R_{21})m(piperazino)t(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
10
 $-O(CR_{20}R_{21})m(pyrrolo)t'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-O(CR_{20}R_{21})mA^m_m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-S(CR_{20}R_{21})m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-S(CR_{20}R_{21})m(CR_{26}=CR_{27})m'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-S(CR_{20}R_{21})m(alkynyl)n'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
15
 $-S(CR_{20}R_{21})m(piperazino)t(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-S(CR_{20}R_{21})m(pyrrolo)f(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-S(CR_{20}R_{21})mA^m_m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-NR_{33}(C=O)p'(CR_{20}R_{21})m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-NR_{33}(C=O)p''(CR_{20}R_{21})m(CR_{26}=CR_{27})m'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
20
 $-NR_{33}(C=O)p''(CR_{20}R_{21})m(alkynyl)n'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-NR_{33}(C=O)p''(CR_{20}R_{21})m(piperazino)f(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-NR_{33}(C=O)p''(CR_{20}R_{21})m(pyrrolo)t'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
25
 $-NR_{33}(C=O)p''(CR_{20}R_{21})mA^m_m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-(CR_{20}R_{21})m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-(CR_{20}R_{21})m(CR_{26}=CR_{27})m'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-(CR_{20}R_{21})m(alkynyl)n'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-(CR_{20}R_{21})m(piperazino)t(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
30
 $-(CR_{20}R_{21})mA^m_m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-(CR_{20}R_{21})m(CR_{29}=N-NR_{30})n''(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-(CR_{20}R_{21})m(CR_{29}=N-NR_{30})n''(CR_{26}=CR_{27})m'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-(CR_{29}=N-NR_{30})n''(alquinilo)n'(CR_{20}R_{21})m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
 $-(CR_{20}R_{21})m(CR_{29}=N-NR_{30})n''(alquilil)n'(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,
35
 $-(CR_{20}R_{21})m(CR_{29}=N-NR_{30})n''A^m_m(CR_{22}R_{23})n(OCH_2CH_2)p(CR_{40}R_{41})p^mY^m(CR_{24}R_{25})q(CO)tX^m$,

en donde:

- 40
 m, n, p, q, m', n', t' son enteros entre 1 y 10, o son opcionalmente 0;
 t, m'', n'' y p'' son 0 o 1;
 X'' se selecciona de OR_{36} , SR_{37} , $NR_{38}R_{39}$, en donde R_{36} , R_{37} , R_{38} , R_{39} son H, o alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono y, o, una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$, R_{37} es, opcionalmente, un grupo protector tiol cuando $t = 1$, COX'' forma un éster reactivo seleccionado de ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxifalimida, ésteres de N-hidroxi sulfo-succinimida, ésteres de para-nitrofenilo,
45
ésteres de dinitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo y sus derivados, en donde dichos derivados facilitan la formación de enlace amida;
 Y'' está ausente o se selecciona de O, S, S-S o NR_{32} , en donde R_{32} tiene la misma definición que se proporcionó anteriormente para R; o
cuando Y'' no es S-S y $t = 0$, X'' se selecciona de un grupo maleimido, un grupo haloacetilo o SR_{37} , en donde R_{37} tiene la misma definición que la anterior;
50
 A'' es un residuo de aminoácido o un polipéptido que contiene entre 2 y 20 residuos de aminoácidos;
 R_{20} , R_{21} , R_{22} , R_{23} , R_{24} , R_{25} , R_{26} y R_{27} son los mismos o diferentes, y son -H o un alquilo lineal o ramificado que tiene entre 1 y 5 átomos de carbono;
 R_{29} y R_{30} son los mismos o diferentes y son -H o alquilo entre 1 y 5 átomos de carbono;
55
 R_{33} es -H o alquilo, alquenilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene entre 1 y 12 átomos de carbono, una unidad de polietilenglicol $R-(OCH_2CH_2)_n$, o R_{33} es $-COR_{34}$, $-CSR_{34}$, $-SOR_{34}$ o $-SO_2R_{34}$, en donde R_{34} es H o alquilo, alquenilo, alquinilo lineal, ramificado o cíclico que tiene entre 1 y 20 átomos de carbono o una unidad de polietilenglicol $-(OCH_2CH_2)_n$; y
uno de R_{40} y R_{41} es opcionalmente un grupo funcional cargado negativa o positivamente y el otro es H o alquilo,
60
alquenilo, alquilo que tiene entre 1 y 4 átomos de carbono.

El término “**aminoácido**” se refiere a aminoácidos de origen natural o un aminoácido de origen no natural. En una realización, el aminoácido está representada por $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa'}})\text{-C}(=\text{O})\text{OH}$, en donde R^{aa} y $\text{R}^{\text{aa}'}$ son cada uno independientemente H, un alquilo, alquenoilo o alquinilo lineal, ramificado o cíclico opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, arilo, heteroarilo o heterocíclico, o R^{aa} y el átomo de nitrógeno de extremo N pueden formar juntos un anillo heterocíclico (p. ej., en la prolina). El término “**residuo de aminoácido**” se refiere al residuo correspondiente cuando se retira un átomo de hidrógeno del extremo carboxi y/o amina del aminoácido, como $\text{-NH-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{R}^{\text{aa'}})\text{-C}(=\text{O})\text{O-}$.

El término “**catión**” se refiere a un ion con carga positiva. El catión puede ser monovalente (p. ej., Na^+ , K^+ , etc.), bivalente (p. ej., Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.) o multivalente (p. ej., Al^{3+} , etc.). Preferentemente, el catión es monovalente.

El término “**cantidad terapéuticamente eficaz**” significa la cantidad de compuesto activo o conjugado que produce la respuesta biológica deseada en un sujeto. Dicha respuesta incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando, la prevención, la inhibición o un retraso en la recurrencia de los síntomas de la enfermedad o de la propia enfermedad, un aumento en la longevidad del sujeto en comparación con la ausencia del tratamiento, o la prevención, la inhibición o el retraso en el avance de los síntomas de la enfermedad o de la propia enfermedad. Los expertos en la técnica son capaces de determinar las cantidades eficaces, especialmente en vista de la descripción detallada proporcionada en la presente. Se puede determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica del compuesto I mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares y en animales experimentales. La cantidad eficaz de compuesto o conjugado de la presente invención u otro agente terapéutico que se vaya a administrar a un sujeto dependerá de la etapa, la categoría y el estado del mieloma múltiple y las características del sujeto, como la salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia al fármaco. La cantidad eficaz de compuesto o conjugado de la presente invención u otro agente terapéutico que se vaya a administrar también dependerá de la vía de administración y la forma de dosificación. La cantidad de dosificación y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del compuesto activo que sean suficientes para mantener los efectos terapéuticos deseados.

COMPUESTOS CITOTÓXICOS

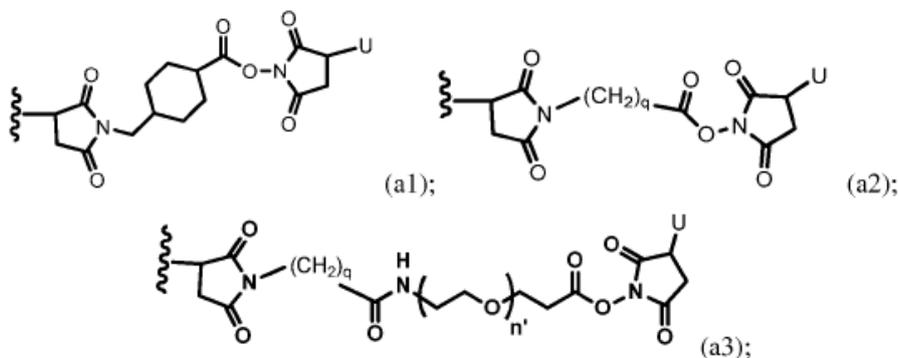
En un primer aspecto, la presente invención se dirige a los compuestos citotóxicos de fórmula estructural (I) o una sal P farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la reivindicación 1.

J se selecciona de “Z- F N-hidroxisuccinimida J Z éster, N--hidroxi sulfosuccinimida, éster de nitrofenilo (p. ej., 2 o 4-nitrofenilo), éster de dinitrofenilo (p. ej., 2,4-dinitrofenilo), éster de sulfo-tetrafluorfenilo (p. ej., 4-sulfo-2,3,5,6-tetrafluorfenilo) y éster de pentafluorfenilo. Más específicamente, en determinadas realizaciones, J es un éster de N-hidroxisuccinimida.

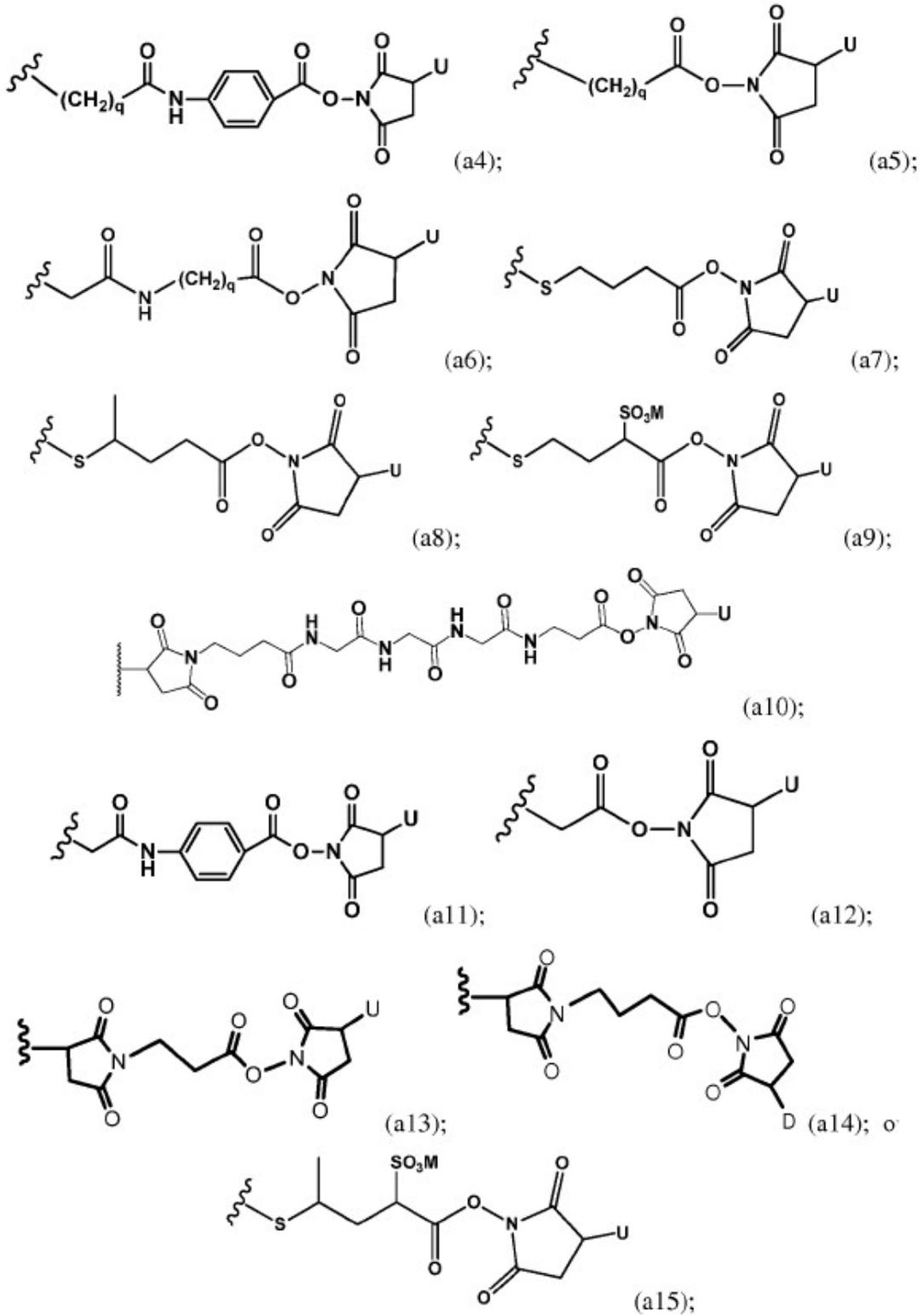
En determinadas realizaciones, ambos R_a y R_b son H; Cy para las fórmulas (B2) es ciclohexano; y R_5 es H o Me; y las variables restantes son como se describió arriba en el primer aspecto. Más específicamente, m' en las fórmulas (B2) puede ser 0 o 1.

En una realización, Z^s es -H. En otra realización, Z^s es -SMe o -SPy (Py es una piridina)

En aun otra realización, Z^s se selecciona de cualquiera de las siguientes fórmulas:



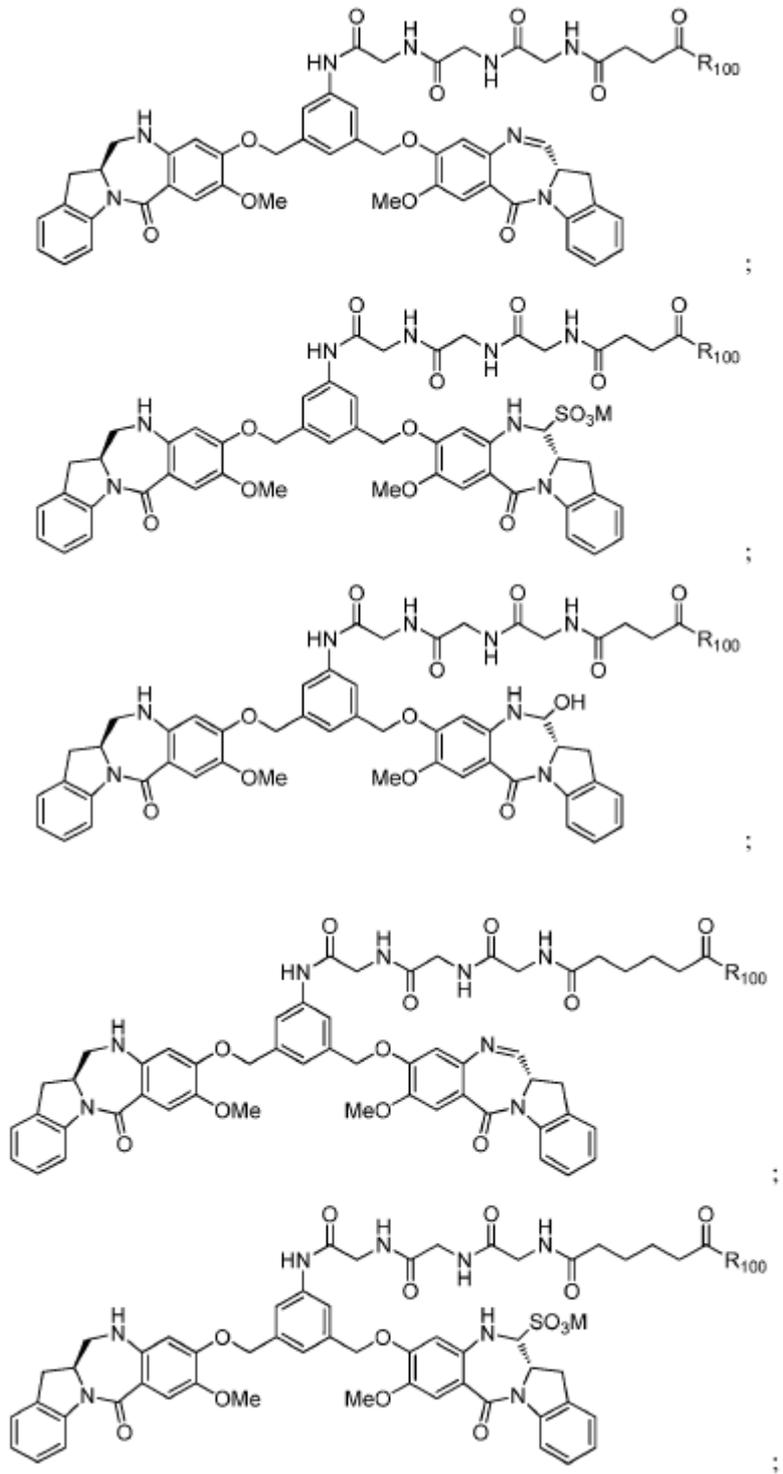
45

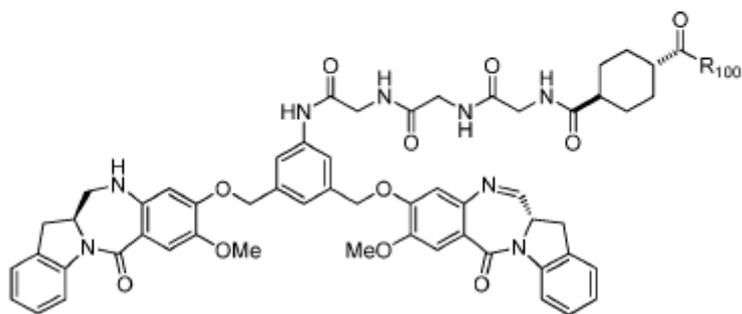
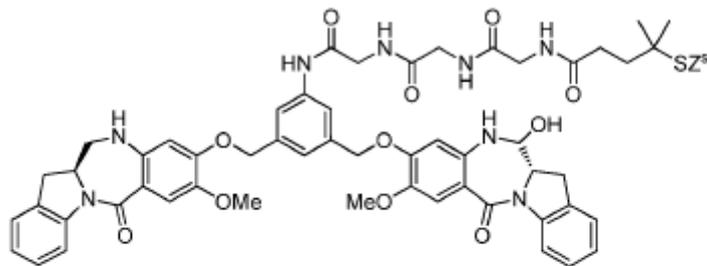
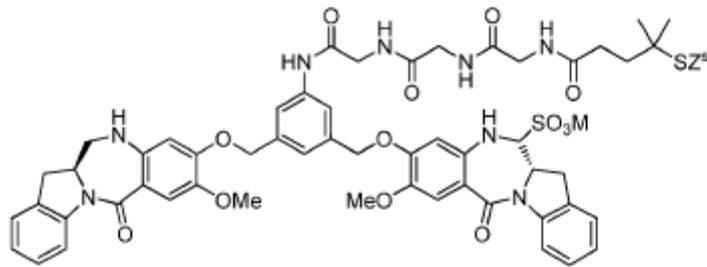
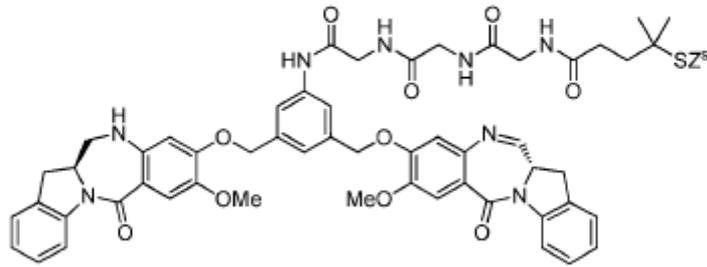
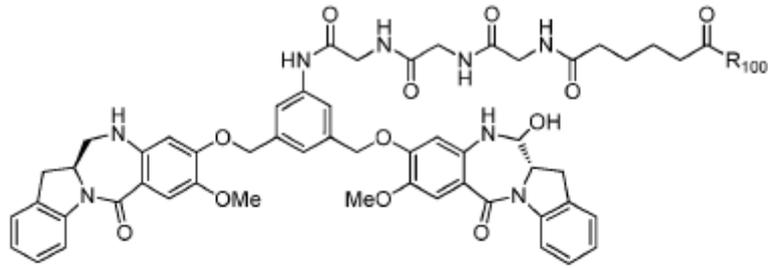


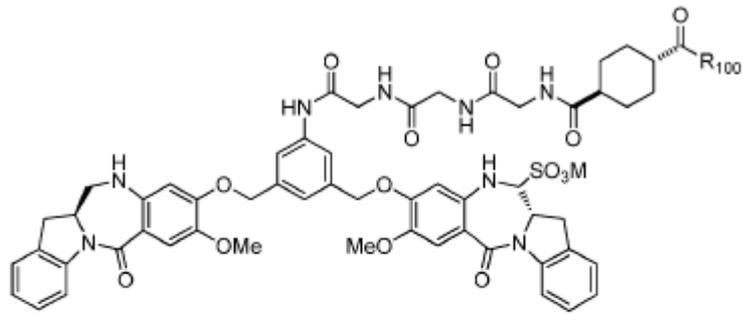
en donde U es -H o -SO₃M; y las variables restantes son como se describió arriba

En determinadas realizaciones, ambos R_a y R_b son -H y R₅ es H o Me; y las variables restantes son como se describió anteriormente.

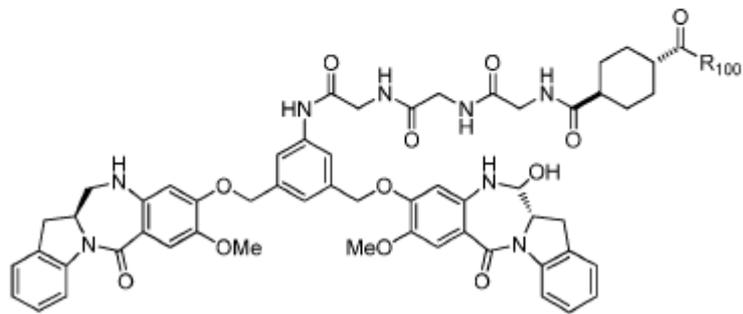
- En determinadas realizaciones, $-(CR_aR_b)_m-$ es $-(CH_2)_m-C(Me_2)-$ y m es un entero entre 1 y 5; las variables restantes son como se describió anteriormente.
- 5 En una realización específica, para la fórmula estructural (I), P es un péptido que contiene entre 2 y 10 residuos de aminoácidos; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- En determinadas realizaciones, P es un péptido que contiene entre 2 y 5 residuos de aminoácidos; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- 10 En determinadas realizaciones, P se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosil-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β -Ala-Leu-Ala-Leu y Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met y Met-Ala; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- 15 En determinadas realizaciones, P es Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala y D-Ala-D-Ala; y las variables restantes son como se describió anteriormente. En una realización específica, para la fórmula estructural (I), la línea doble \equiv entre N y C representa un enlace doble; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- 20 En una realización específica, para la fórmula estructural (I), R₅ es -H o alquilo (C₁-C₃); y las variables restantes son como se describieron anteriormente.
- 25 En una realización específica, para la fórmula estructural (I), la línea doble \equiv entre N y C representa un enlace simple o enlace doble, con la condición de que cuando es un enlace doble X está ausente e Y es -H, y cuando es un enlace simple, X es -H, Y es -OH o -SO₃M;
- 30 R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' y R₄' son todos -H;
R₆ es -OMe;
X' e Y' son -H;
A y A' son -O-;
M es H, Na⁺ o K⁺; y las variables restantes son como se describe anteriormente.
- 35 En una realización específica, el compuesto citotóxico de la presente invención se selecciona de las siguientes fórmulas:



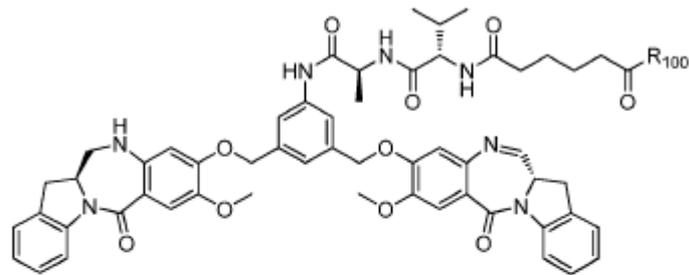




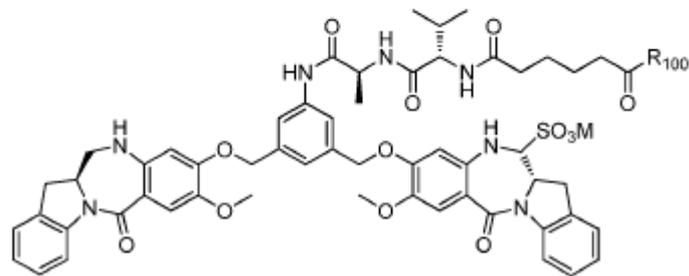
;



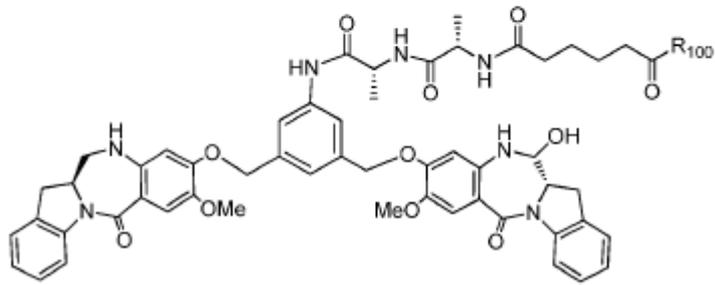
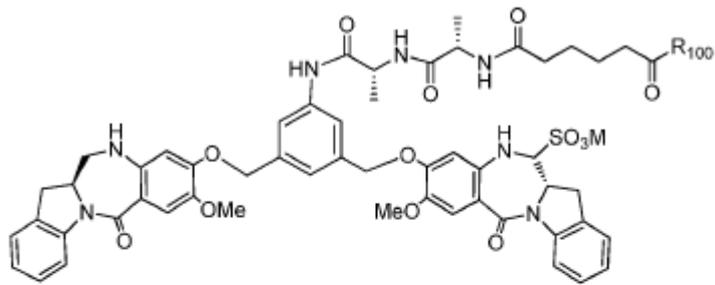
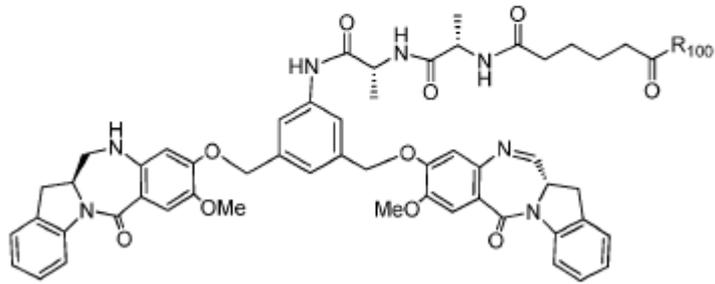
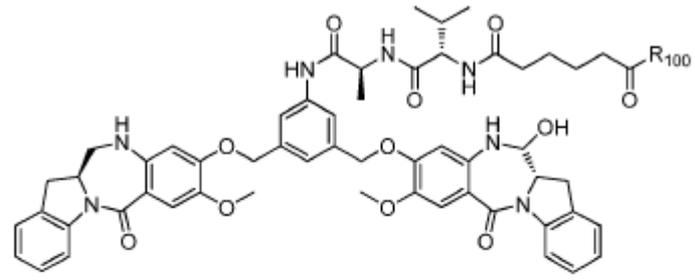
;

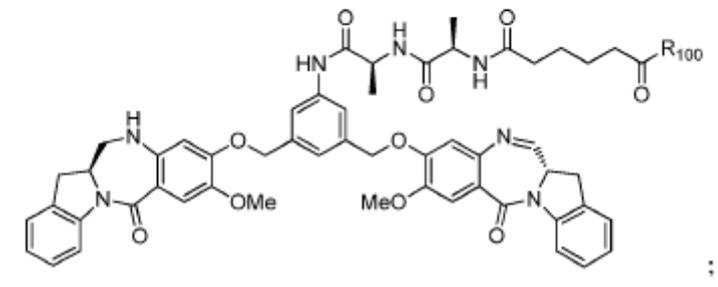
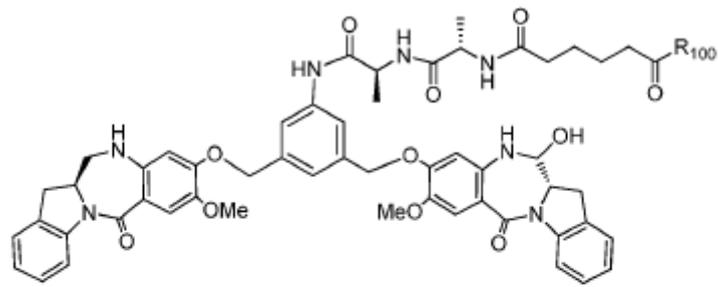
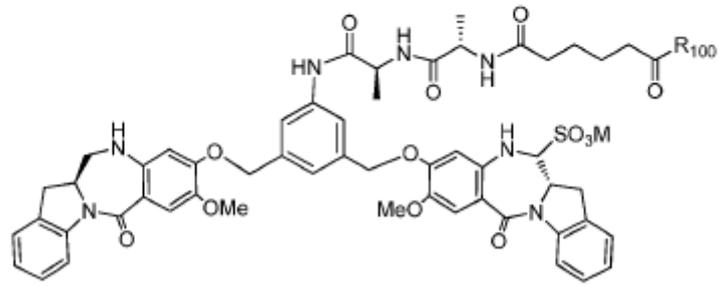
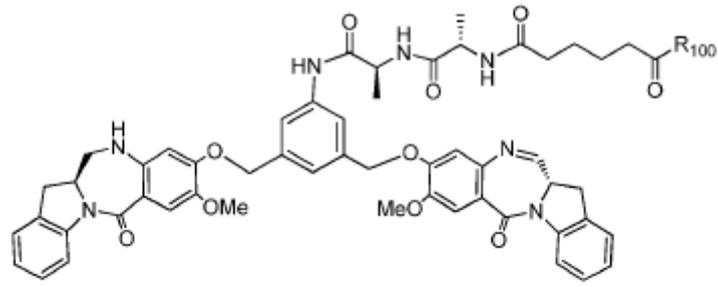


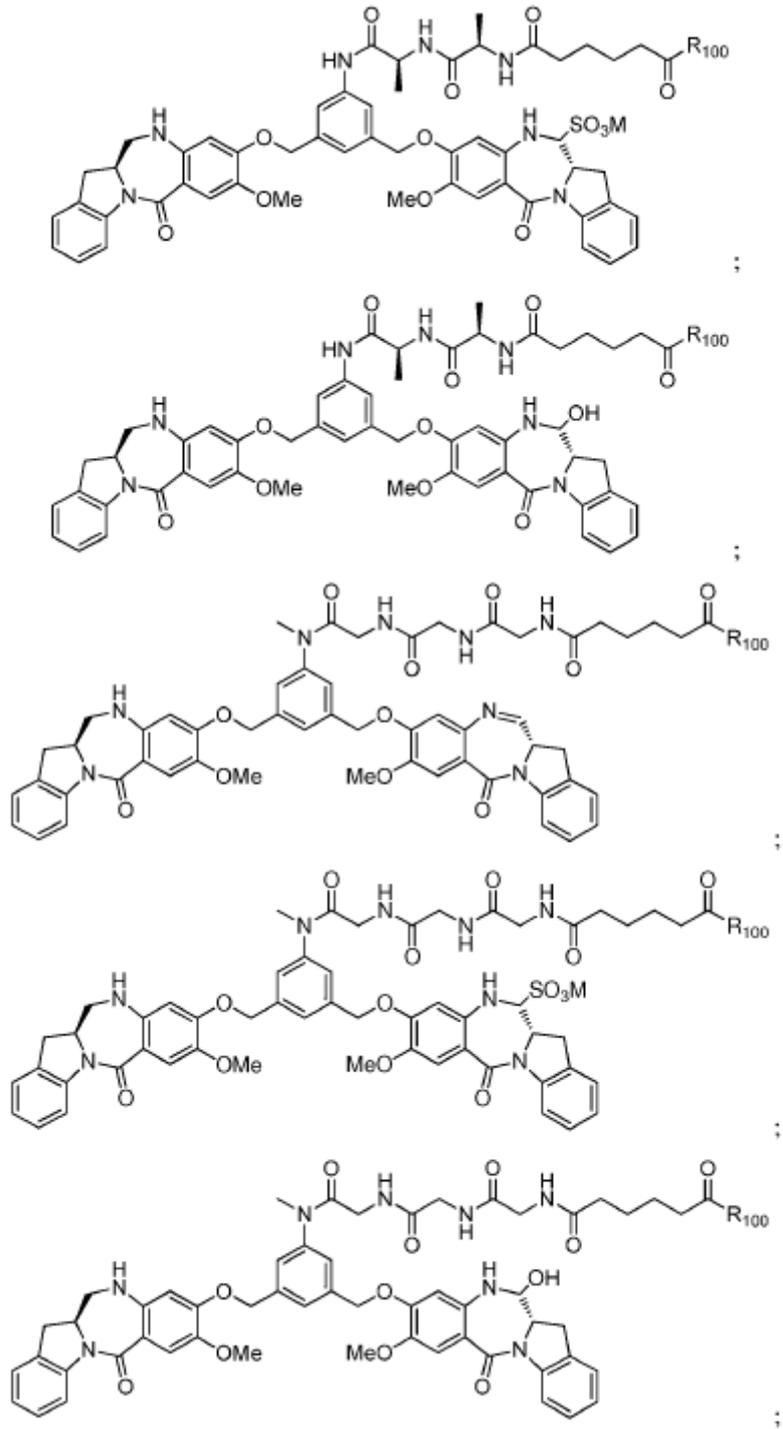
;

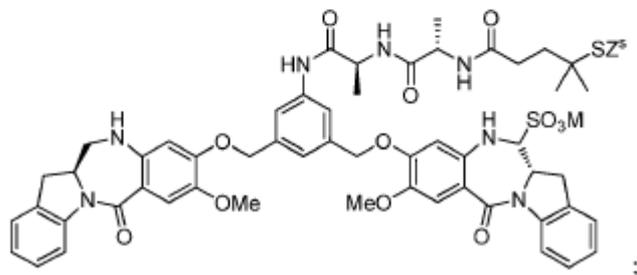
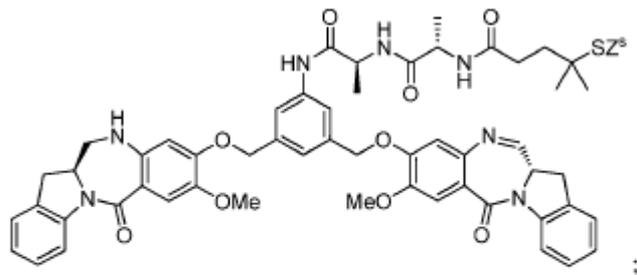
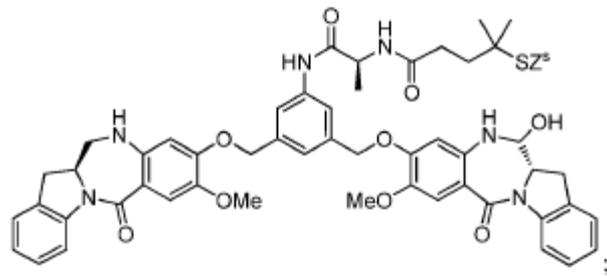
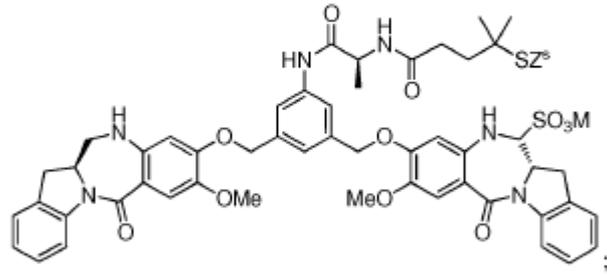
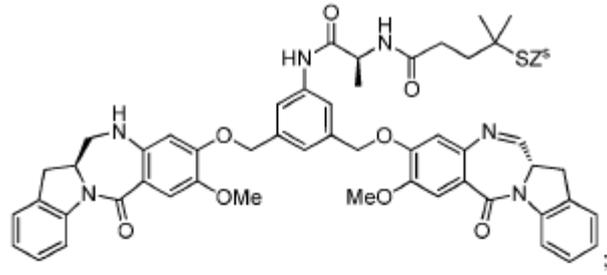


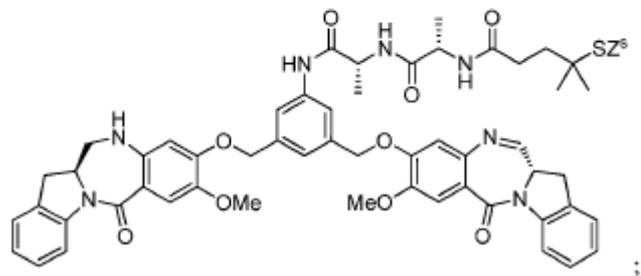
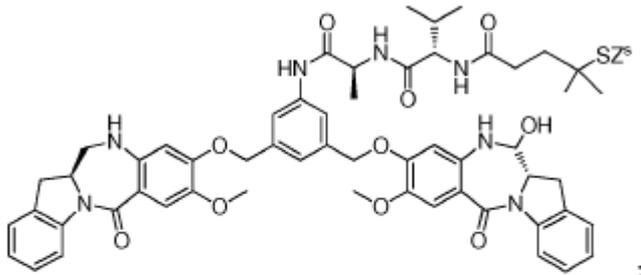
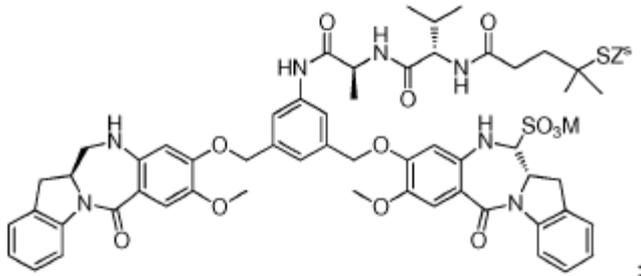
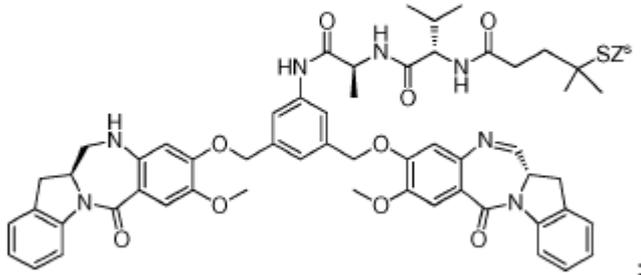
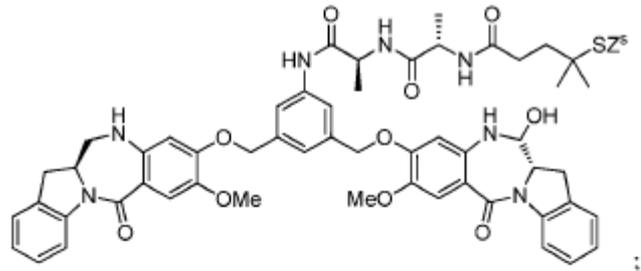
;

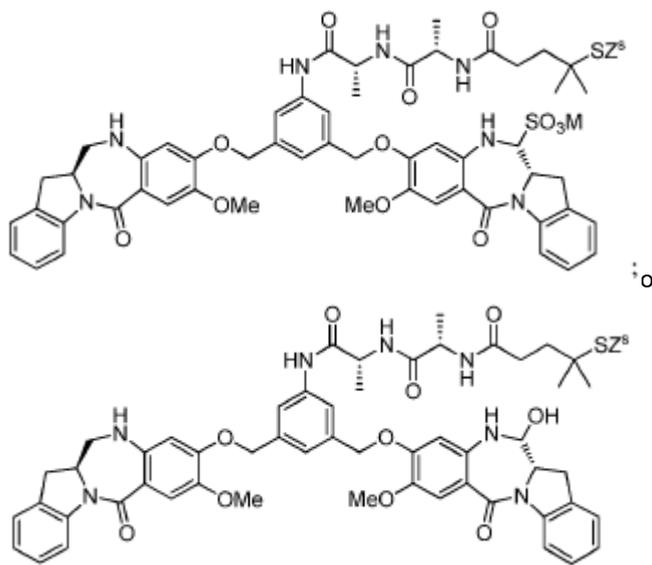




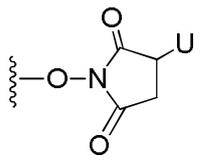








5 o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:



R_{100} es $-OH$, $-OMe$ o
 M es un catión farmacéuticamente aceptable (p. ej., H^+ , Na^+ o K^+);
 Z^s es $-H$, $-SR^d$, $-C(=O)R^{d1}$ o se selecciona de las fórmulas (a1)-(a15) descritas anteriormente.

10 En una realización más específica, Z^s se selecciona de las fórmulas (a7), (a8), (a9) y (a15). En una realización más específica, Z^s está representado por la fórmula (a9). Alternativamente, Z^s está representado por la fórmula (a7).

En otra realización específica, Z^s es $-H$.

15 En otra moda específica, Y es $-SO_3M$. Alternativamente, Y es $-OH$.

En la presente invención también se incluyen metabolitos de cualquier compuesto citotóxico o conjugados de agente de unión celular-agente citotóxico descritos en la presente.

20 SÍNTESIS DE COMPUESTOS CITOTÓXICOS

Los compuestos citotóxicos de la presente invención se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en la patente estadounidense N.º 8.765.740 y la publicación de solicitud estadounidense N.º 2012/0238731.

25 En los ejemplos 1-10 se muestran procesos representativos para preparar los compuestos dímeros citotóxicos de la presente invención.

AGENTES DE UNIÓN CELULAR

30 La eficacia de los conjugados de la invención como agentes terapéuticos depende de la selección cuidadosa de un agente de unión celular adecuado. Los agentes de unión celular pueden ser de cualquier tipo conocido actualmente, o que se conoce, incluso péptidos y no péptidos. Generalmente, estos pueden ser anticuerpos (por ejemplo anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, especialmente anticuerpos monoclonales), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, vitaminas (por ejemplo folato etc., que se puede unir a un receptor de la superficie celular de estos, p. ej., un receptor de folato), moléculas transporte de nutrientes (por ejemplo transferrina), o cualquier otra sustancia o molécula de unión celular.

- 5 La selección del agente de unión celular adecuado es una cuestión de elección que depende parcialmente de la población celular específica que se tomará como diana, pero en muchos casos (aunque no en todos), los anticuerpos monoclonales humanos son una buena opción si hay alguno apropiado disponible. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal MY9 es un anticuerpo IgG₁ murino que se une específicamente al antígeno CD33 (J.D. Griffin *et al.*, *Leukemia Res.*, 8:521 (1984)) y se puede utilizar si las células diana expresan CD33 como en la enfermedad leucemia mielógena aguda (AML).
- 10 En determinadas realizaciones, el agente de unión celular no es una proteína. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente de unión celular puede ser una vitamina que se une a un receptor de vitaminas, como un receptor de superficie celular. En este sentido, la vitamina A se une a la proteína de unión a retinol (RBP) para formar un complejo, este complejo a su vez se une al receptor STRA6 con afinidad alta y aumenta la absorción de vitamina A. En otro ejemplo, el ácido fólico/folato/vitamina B₉ se une al receptor de folato de superficie celular (FR), por ejemplo, FR α , con afinidad alta. El ácido fólico o los anticuerpos que se unen a FR α se pueden utilizar para dirigirse al receptor de folato expresado en tumores de ovarios y de otro tipo. Además, la vitamina D y su análogo se unen al receptor de vitamina D.
- 15 En otras realizaciones, el agente de unión celular es una proteína o un polipéptido, o un compuesto que comprende una proteína o un polipéptido, incluido un anticuerpo, una proteína no anticuerpo o un polipéptido. Preferentemente, la proteína o polipéptidos comprenden uno o más residuos Lys con grupo -NH₂ de cadena lateral. Los grupos -NH₂ de cadena lateral de Lys se pueden unir por enlace covalente a los reticulantes bifuncionales que, a su vez, se unen a los compuestos dímeros de la invención, conjugando así los agentes de unión celular a los compuestos dímeros de la invención. Cada agente de unión celular basado en proteína puede contener múltiples grupos -NH₂ de cadena lateral de Lys disponibles para unirse a los compuestos de la invención a través de reticulantes bifuncionales.
- 20 En una realización, GM-CSF, un ligando/factor de crecimiento que se une a las células mieloides, como un agente de unión celular a células enfermas de leucemia mielógena aguda. La IL-2 que se une a células T activadas se puede usar para la prevención del rechazo de injertos en trasplantes, para la terapia y la prevención de la enfermedad de injerto contra huésped y para el tratamiento de leucemia aguda de células T. Se pueden usar MSH, que se unen a melanocitos, para el tratamiento del melanoma, así como anticuerpos dirigidos hacia melanomas. Se puede utilizar el factor de crecimiento epidérmico para dirigirse a cánceres escamosos, como el de pulmón y el de cabeza y cuello. Se puede utilizar la somatostatina para dirigirse a los neuroblastomas y otros tipos de tumores. Se puede utilizar el estrógeno (o análogos del estrógeno) para dirigirse al cáncer de mama. Se puede utilizar el andrógeno (o análogos del andrógeno) para dirigirse a los testículos.
- 25 En determinadas realizaciones, el agente de unión celular puede ser una linfocina, una hormona, un factor de crecimiento, un factor estimulante de colonias o una molécula de transporte de nutrientes.
- 30 Se describen también en esta invención, agentes de unión celular que son miméticos de anticuerpo, como una proteína de repetición de anquirina, una centirina o una adnectina/monocuerpo.
- 35 En otras realizaciones, el agente de unión celular es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, un fragmento de anticuerpo monoclonal (o una "parte de unión al antígeno") que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico (o una "parte de unión al antígeno") que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo de dominio (p. ej., sdAb) o un fragmento de anticuerpo de dominio que se une específicamente a la célula diana.
- 40 En determinadas realizaciones, el agente de unión celular es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena simple humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado (o una "parte de unión al antígeno"). En una realización específica, el anticuerpo humanizado es huMy9-6 u otro anticuerpo relacionado, que se describe en las patentes estadounidenses N.º 7.342.110 y 7.557.189. En otra realización específica, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo del receptor antifolato descrito en las solicitudes provisionales estadounidenses N.º 61/307.797, 61/346.595 y 61/413.172 y la solicitud estadounidense N.º 13/033.723 (publicada como US 2012/0009181 A1).
- 45 En determinadas realizaciones, el agente de unión celular es un anticuerpo revestido, un anticuerpo de cadena simple revestido o un fragmento de anticuerpo revestido (o una "parte de unión al antígeno") o un anticuerpo biespecífico.
- 50 En determinadas realizaciones, el agente de unión celular es un minicuerpo, un avibody, un diacuerpo, un tricuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un pro cuerpo, un anticuerpo de dominio o un unicuerpo.
- 55 En otras palabras, un agente de unión celular ejemplar puede incluir un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, un
- 60

fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple, un fragmento de anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de dominio, un fragmento de anticuerpo de dominio que se une específicamente a la célula diana, un interferón (p. ej., α , β , γ), una linfoquina (p. ej., IL-2, IL-3, IL-4 e IL-6), una hormona (p. ej., insulina, hormona liberadora de tirotrópina (TRH), hormona estimulante de melanocitos (MSH) y una hormona esteroide (p. ej., andrógeno y estrógeno)), una vitamina (p. ej., folato), un factor de crecimiento (p. ej., EGF, TGF-alfa, FGF, VEGF), un factor estimulante de colonias, una molécula de transporte de nutrientes (p. ej., transferrina; véase O'Keefe *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 260:932-937), una centirina (un andamiaje de proteínas basado en una secuencia de consenso de repeticiones de fibronectina tipo III (FN3); véase la publicación de patente estadounidense 2010/0255056, 2010/0216708 y 2011/0274623), una proteína de repetición de anquirina (p. ej., una proteína de repetición de anquirina diseñada, conocida como DARPIn; véanse las publicaciones de patentes estadounidenses N.º 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146 y 2011/0224100 y, además, véase C. Zahnd *et al.*, *Cancer Res.* (2010) 70:1595-1605; Zahnd *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2006) 281(46):35167-35175; y Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A., *Nature Biotechnology* (2005) 23:1257-1268), una proteína de repeticiones tipo anquirina o un péptido sintético (véase, p. ej., la publicación de patente estadounidense N.º 2007/0238667; la patente estadounidense N.º 7.101.675; WO 2007/147213; y WO 2007/062466), una adnectina (una proteína de andamiaje de dominio de fibronectina; véanse las publicaciones de patentes estadounidenses N.º 2007/0082365; 2008/0139791), un avibody (incluidos los diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos; véanse las publicaciones estadounidenses N.º 2008/0152586 y 2012/0171115), moléculas de redireccionamiento receptoras dobles (DART) (P.A. Moore *et al.*, *Blood*, 2011; 117(17):4542-4551; Veri MC, *et al.*, *Arthritis Rheum*, 30 de marzo de 2010; 62(7):1933-43; Johnson S, *et al. J Mol Biol*, 9 de abril de 2010;399(3):436-49), proteínas supercargadas de penetración celular (*Methods in Enzymol.* 502, 293-319 (2012), y otras sustancias o moléculas de unión celular.

En determinadas realizaciones, el agente de unión celular es un factor de crecimiento o un fragmento del mismo que se une a un receptor del factor de crecimiento. También se describe en esta invención una citocina o un fragmento de la misma que se une a un receptor de citocina. En determinadas realizaciones, el receptor de factor de crecimiento es un receptor de superficie celular.

En determinadas realizaciones, cuando el agente de unión celular es un anticuerpo o una parte de unión al antígeno de este (incluidos derivados de anticuerpo) o determinados miméticos de anticuerpo, el CBA se puede unir a un ligando en la célula diana, como un ligando de superficie celular, incluido los receptores de superficie celular.

Algunos antígenos o ligandos ejemplares específicos pueden incluir renina; una hormona de crecimiento (p. ej., la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina); un factor de liberación de hormona de crecimiento; una hormona paratiroidea; una hormona estimulante de la tiroides; una lipoproteína; alfa-1-antitripsina; insulina cadena A; insulina cadena B; proinsulina; una hormona estimulante del folículo; calcitonina; una hormona luteinizante; glucagón; un factor de coagulación (p. ej., factor vmc, factor IX, factor de tejido y factor de von Willebrands); y un factor anticoagulante (p. ej., proteína C); un factor natriurético atrial; un tensioactivo pulmonar; un activador plasminógeno (p. ej., una urocinasa, orina humana o activador plasminógeno de tipo tisular); bombesina; una trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; una encefalina; RANTES (es decir, regulada al momento de la activación normalmente expresada y secretada por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófago humana-1-alfa; una albúmina sérica (albúmina sérica humana); sustancia inhibidora Muelleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; un péptido asociado con la gonadotropina de ratones; una proteína microbiana (beta-lactamasa); DNasa; IgE; un antígeno asociado con el linfocito T citotóxico (p. ej., CTLA-4); inhibina; activina; un factor de crecimiento endotelial vascular; un receptor para las hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; un factor reumatoide; un factor neurotrófico (p. ej., factor neurotrófico derivado del hueso, neurotrofina-3, -4, -5 o -6), un factor de crecimiento de nervios (p. ej., NGF- β); un factor de crecimiento derivado de plaquetas; un factor de crecimiento de fibroblastos (p. ej., aFGF y bFGF); un receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2; un factor de crecimiento epidérmico; un factor de crecimiento de transformación (p. ej., TGF-alfa, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 y TGF- β 5); factor de crecimiento de tipo insulina-I y -II; des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral); una proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina; melanotransferrina; EpCAM; GD3; FLT3; PSMA; PSCA; MUC1; MUC16; STEAP; CEA; TENB2; un receptor de EphA; un receptor de EphB; un receptor de folato; FOLR1; mesotelina; cripto; una alfa,beta₆; integrinas; VEGF; VEGFR; EGFR; receptor de transferrina; IRTA1; IRTA2; IRTA3; IRTA4; IRTA5; proteínas CD (p. ej., CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD123, CD134, CD137, CD138 y CD152), uno o más antígenos asociados con tumores o receptores de superficie celular (véase la publicación estadounidense N.º 2008/0171040 o la publicación estadounidense N.º 2008/0305044); eritropoyetina; un factor osteoinductivo; una inmunotixina; una proteína morfológica ósea; un interferón (p. ej., interferón-alfa, -beta y -gamma); un factor estimulante de colonias (p. ej., M-CSF, GM-CSF y G-CSF); interleucinas (p. ej., IL-1 a IL-10); superóxido dismutasa; un receptor de células T; una proteína de membrana superficial; un factor de aceleración del deterioro; antígenos virales (p. ej., una parte

de la envoltura del VIH); una proteína de transporte, un receptor de alojamiento; una adhesina; una proteína reguladora; una integrina (p. ej., CD11a, CD11b, CD11c, CD18, un ICAM, VLA-4 y VCAM) un antígeno asociado con tumores (p. ej., el receptor de HER2, HER3 y HER4); endoglina; c-Met; c-kit; 1GF1R; PSGR; NGEF; PSMA; PSCA; TMEFF2; LGR5; B7H4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente.

5 Según se emplea en la presente, el término “**anticuerpo**” incluye moléculas de inmunoglobulina (Ig). En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa que comprende cuatro cadenas polipeptídicas, a saber dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada (CH). La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera, que está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). Intercaladas con dichas regiones se encuentran las regiones marco más conservadas (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo es IgG, IgA, IgE, IgD o IgM. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4; o IgA1 o IgA2.

20 En determinadas realizaciones, el agente de unión celular es una “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo monoclonal que comparte las secuencias fundamentales para la unión al antígeno con un anticuerpo (como huMy9-6 o sus anticuerpos relacionados descritos en las patentes estadounidenses N.º 7.342.110 y 7.557.189).

Según se emplea en la presente, el término “**parte de unión al antígeno**” de un anticuerpo (o, a veces, se denomina indistintamente “fragmentos de anticuerpo”) incluye uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que determinados fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden realizar la función de unión al antígeno de un anticuerpo. Algunos ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término “parte de unión al antígeno” de un anticuerpo incluyen (entre otros): (i) un fragmento **Fab**, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1 (p. ej., un anticuerpo digerido por papaína produce tres fragmentos: dos fragmentos Fab de unión al antígeno y un fragmento Fc que no se une al antígeno); (ii) un fragmento **F(ab')₂**, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra (p. ej., un anticuerpo digerido por pepsina produce dos fragmentos: un fragmento F(ab')₂ de unión al antígeno bivalente y un fragmento pFc' que no se une al antígeno) y su unidad monovalente **F(ab')** relacionada; (iii) un fragmento **Fd** que consiste en los dominios VH y CH1 (es decir, la parte de la cadena pesada que está incluida en el Fab); (iv) un fragmento **Fv** que consiste en los dominios VL y VH de un grupo único de un anticuerpo y el **Fv unido por enlace disulfuro** relacionado; (v) un fragmento **dAb** (anticuerpo de dominio) o **sdAb** (anticuerpo de dominio simple) (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (**CDR**) aislada. En determinadas realizaciones, la parte de unión al antígeno es un **sdAb** (anticuerpo de dominio simple).

40 En determinadas realizaciones, la parte de unión al antígeno también incluye determinados derivados modificados genéticamente o recombinantes (o “**anticuerpos derivados**”) que también incluyen uno o más fragmentos de un anticuerpo que mantiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno además de elementos o secuencias que es posible que no se encuentren en los anticuerpos de origen natural.

45 Por ejemplo, si bien los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes distintos, se pueden unir usando procedimientos recombinantes estándar mediante un enlazador sintético que permite convertirlos en una cadena proteica simple donde las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (**scFv**); véase, p. ej., Bird *et al.* Science 242:423-426, 1988; y Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 85:5879-5883, 1988).

50 En todas las realizaciones descritas en la presente, el extremo N de un scFv puede ser un dominio VH (es decir, N-VH-VL-C) o un dominio VL (es decir, N-VL-VH-C).

55 Se pueden diseñar mediante modificación genética fragmentos variables de cadena simple divalentes (o bivalentes) (**di-scFv**, **bi-scFv**) a través de la unión de dos scFv. Esto produce una cadena peptídica única con dos regiones VH y dos regiones VL, lo que produce un scFv en tándem (**tascFv**). Se pueden producir de forma similar más repeticiones en tándem, como tri-scFv, mediante la unión de tres o más scFv de forma de cabeza a cola.

60 En determinadas realizaciones, los scFv se pueden unir a través de péptidos enlazadores que son demasiado cortos (aproximadamente cinco aminoácidos) para que las dos regiones variables se plieguen juntas, lo que fuerza a los scFv a

dimerizarse y formar **diacuerpos** (véase, p. ej., Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:6444-6448, 1993; Poljak *et al.*, Structure 2:1121-1123, 1994). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o monoespecíficos. Se ha demostrado que los diacuerpos tienen constantes de disociación hasta 40 veces menores que los scFv correspondientes, es decir, que tienen una afinidad mucho mayor a la diana.

5 Los enlazadores más cortos (uno o dos aminoácidos) provocan la formación de trímeros o los denominados **triacuerpos** o **tricuerpos**. También se han producido **tetracuerpos** de forma similar. Presentan una afinidad incluso mayor por sus dianas que los diacuerpos. Los diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos se denominan, a veces, colectivamente agentes de unión celular "**AVIBODY™**" (o "**AVIBODY**" para abreviar). Es decir, los AVIBODY que tienen dos, tres o cuatro regiones de unión a la diana (TBR) son conocidos como dia, tria y tetracuerpos. Véanse, por ejemplo, las publicaciones estadounidenses N.º 2008/0152586 y 2012/0171115 para obtener detalles.

10 Todos estos formatos se pueden componer a partir de fragmentos variables con especificidad para dos o más antígenos diferentes y en dicho caso son tipos de anticuerpos bi o multiespecíficos. Por ejemplo, determinados di-scFv en tándem biespecíficos se conocen como captadores de linfocitos T biespecíficos (**BiTE**).

15 En determinadas realizaciones, cada scFv en el scFv en tándem o diacuerpo/triacuerpo/tetracuerpo puede tener la misma especificidad de unión o diferente, y cada uno puede tener, independientemente, un VH de extremo N o VL de extremo N.

20 Los Fv de cadena simple (scFv) también se pueden fusionar a un resto Fc, como el resto Fc de IgG humana para obtener propiedades similares a IgG, pero, no obstante, siguen estando codificados por un único gen. Como la producción transitoria de dichas proteínas **scFv-Fc** en los mamíferos puede lograr fácilmente cantidades de miligramos, este formato de anticuerpo derivado es particularmente adecuado para muchas aplicaciones de investigación.

25 Los **Fcab** son fragmentos de anticuerpo modificados genéticamente a partir de la región constante de Fc de un anticuerpo. Los Fcab se pueden expresar como proteínas solubles o se pueden modificar genéticamente para volver a ser un anticuerpo de longitud completa, como IgG, para crear **mAb2**. Un **mAb2** es un anticuerpo de longitud completa con un Fcab en lugar de la región Fc normal. Con estos sitios de unión adicionales, los anticuerpos monoclonales biespecíficos mAb2 se pueden unir a dos dianas diferentes al mismo tiempo.

30 En determinadas realizaciones, los derivados de anticuerpo modificados genéticamente tienen un tamaño reducido de las proteínas recombinantes derivadas de Ig de unión al antígeno (mAb de tamaño completo "miniaturizados"), producidos mediante la remoción de los dominios que se consideran no esenciales para la función. Uno de los mejores ejemplos son los SMIP.

35 Un **componente inmunofarmacéutico de módulo pequeño** o **SMIP** es una proteína artificial fabricada principalmente a partir de partes de anticuerpos (inmunoglobulinas) y está diseñada para utilizar como un fármaco farmacéutico. Los SMIP tienen una semivida biológica similar a la de los anticuerpos, pero son más pequeños que los anticuerpos y, por lo tanto, pueden tener mejores propiedades de penetración tisular. Los SMIP son proteínas de cadena simple que comprenden una región de unión, una región bisagra como un conector y un dominio efector. La región de unión comprende un fragmento variable de cadena simple (scFv) modificado y el resto de la proteína se puede construir a partir del Fc (como CH2 y CH3 como el dominio efector) y la región bisagra de un anticuerpo, como IgG1. Las células modificadas genéticamente producen SMIP como dímeros similares a anticuerpos que son aproximadamente 30 % más pequeños que los anticuerpos reales.

40 Otro ejemplo de dicho anticuerpo miniaturizado modificado genéticamente es un "**unicuerpo**", en el cual la región bisagra se ha retirado de las moléculas de IgG4. Las moléculas de IgG4 son inestables y pueden intercambiar heterodímeros de cadena ligera-pesada entre sí. La eliminación de la región bisagra evita completamente el emparejamiento cadena pesada-cadena pesada y deja heterodímeros de cadena pesada/ligera monovalentes altamente específicos, manteniendo a su vez la región Fc para garantizar la estabilidad y la semivida *in vivo*.

45 Un **anticuerpo de dominio simple (sdAb)**, incluido, entre otros, los denominados **nanocuerpos** por Ablynx) es un fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo variable monomérico. Al igual que un anticuerpo completo, es capaz de unirse de forma selectiva a un antígeno específico, pero es mucho más pequeño debido a su peso molecular de solo 12-15 kDa. En determinadas realizaciones, el anticuerpo de dominio simple se modifica genéticamente a partir de anticuerpos de cadena pesada (hclgG). El primer sdAb se modificó genéticamente basándose en un hclgG que se encuentra en los camélidos, denominado fragmentos V_HH. En determinadas realizaciones, el anticuerpo de dominio simple se modifica genéticamente a partir de IgNAR ("receptor de antígenos nuevo de inmunoglobulina", véase abajo) utilizando un fragmento V_{NAR}. Los peces cartilaginosos (como los tiburones) tienen dichos anticuerpos IgNAR de cadena

pesada. En determinadas realizaciones, el sdAb se modifica genéticamente mediante la división de los dominios variables diméricos de la inmunoglobulina G común (IgG), como la de los seres humanos o los ratones, en los monómeros. En determinadas realizaciones, un nanocuerpo se deriva de un dominio variable de cadena pesada. En determinadas realizaciones, un nanocuerpo se deriva de un dominio variable de cadena ligera. En determinadas realizaciones, el sdAb se obtiene mediante el análisis de bibliotecas de secuencias de cadena pesada de dominio simple (p. ej., HC de dominio simple humana) para los aglutinantes para un antígeno diana.

Se derivan fragmentos de anticuerpo de dominio de receptor de antígenos nuevo variable simple (**V_{NARS}** o dominios **V_{NAR}**) de anticuerpos de receptor de antígenos nuevo de inmunoglobulina (**Ig_{NAR}**) de peces cartilaginosos (p. ej., el tiburón). Al ser uno de los andamiajes de proteínas basados en inmunoglobulina conocidos más pequeños, dichas proteínas de dominio simple demuestran un tamaño y propiedades de reconocimiento de epítipo críptico favorables. Los anticuerpos Ig_{NAR} maduros consisten en homodímeros de un dominio de receptor de antígenos nuevo (V_{NAR}) y cinco dominios de receptor de antígenos nuevos constantes (C_{NAR}). Esta molécula es altamente estable y posee características de unión eficaces. Su estabilidad inherente se puede atribuir, probablemente, a (i) el andamiaje de Ig subyacente, que presenta una cantidad considerable de residuos expuestos a superficies hidrofílicas y cargados en comparación con los dominios VH y VL de anticuerpos convencionales que se encuentran en los anticuerpos murinos; y (ii) las características estructurales estabilizantes en los bucles de la región determinante de complementariedad (CDR) incluidos los puentes de disulfuro entre bucles y los patrones de los puentes de hidrógeno intrabuques.

Un **minicuerpo** es un fragmento de anticuerpo modificado genéticamente que comprende un scFv unido a un dominio CH, como el CH3γ1 (dominio CH3 de IgG1) o CH4ε (dominio CH4 de IgE). Por ejemplo, se ha vinculado un scFv específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA) con el CH3γ1 para crear un minicuerpo, que antes se había demostrado que presentaba un direccionamiento tumoral excelente unido con depuración rápida *in vivo* (Hu *et al.*, *Cancer Res.* 56:3055–3061, 1996). El scFv puede tener un VH o un VL de extremo N. La unión puede ser un péptido corto (p. ej., un enlazador de dos aminoácidos, como ValGlu) que produce un minicuerpo sin bisagra, no covalente. Alternativamente, la unión puede ser una bisagra IgG1 y un péptido enlazador GlySer que produce un minicuerpo de bisagra, covalente.

Los anticuerpos naturales son monoespecíficos, pero bivalentes, en el hecho de que expresan dos dominios de unión al antígeno idénticos. Contrariamente, en determinadas realizaciones, ciertos derivados de anticuerpos modificados genéticamente son moléculas bi o multiespecíficas que poseen dos o más dominios de unión al antígeno diferentes, cada uno con especificidad de diana diferente. Los anticuerpos biespecíficos se pueden generar mediante la fusión de dos células productoras de anticuerpos, cada una con especificidad distinta. Estos “cuadromas” produjeron múltiples especies moleculares porque las dos cadenas ligeras distintas y las dos cadenas pesadas distintas estaban libres para recombinarse en los cuadromas en configuraciones múltiples. Desde entonces, se han generado Fab biespecíficos, scFv y mAb de tamaño completo utilizando diversas tecnologías (véase arriba).

La proteína de inmunoglobulina de dominio variable doble (**DVD-Ig**) es un tipo de IgG específica doble que se direcciona simultáneamente a dos antígenos/epítomos (DiGiammarino *et al.*, *Methods Mol Biol.* 899:145-56, 2012). La molécula contiene una región Fc y regiones constantes en una configuración similar a una IgG convencional. Sin embargo, la proteína DVD-Ig es única en el hecho de que cada grupo de la molécula contiene dos dominios variables (VD). Los VD dentro de un grupo están unidos en tándem y pueden poseer diferentes especificidades de unión.

Las moléculas derivadas de anticuerpos trispecíficos también se pueden generar, por ejemplo, mediante la expresión de anticuerpos biespecíficos con dos Fab distintos y un Fc. Un ejemplo es un anti-Ep-CAM de IgG2a de ratón, cuadroma anti-CD3 de IgG2b de rata, denominado BiUll, que se cree que permite la colocalización de las células tumorales que expresan Ep-CAM, linfocitos T que expresan CD3 y macrófagos que expresan FCγRI, que potencian así las funciones coestimulante y antitumoral de las células inmunitarias.

Los **procuerpos** son anticuerpos monoclonales enmascarados, completamente recombinantes que permanecen inertes en el tejido sano, pero que se activan específicamente en el microambiente de enfermedad (p. ej., mediante la escisión de proteasa por una proteasa enriquecida o específica en un microambiente de enfermedad). Véase Desnoyers *et al.*, *Sci Transl Med*, 5:207ra144, 2013. Se pueden utilizar técnicas de enmascaramiento similares para cualquiera de los anticuerpos o partes de unión al antígeno de estos descritos en la presente.

Un **intracuerpo** es un anticuerpo que se ha modificado para la localización intracelular, para trabajar dentro de la célula para unirse a un antígeno intracelular. El intracuerpo puede permanecer en el citoplasma o puede tener una señal de localización nuclear o puede tener una secuencia KDEL para el direccionamiento al ER. El intracuerpo puede ser un anticuerpo de cadena simple (scFv), dominios VL de inmunoglobulina modificada con hiperestabilidad, un anticuerpo seleccionado resistente al ambiente intracelular más reductor o expresado como una proteína de fusión con la proteína de unión a la maltosa u otras proteínas intracelulares estables. Dichas optimizaciones han mejorado la estabilidad y la

estructura de los intracuerpos y pueden tener aplicabilidad general a cualquiera de los anticuerpos o partes de unión al antígeno de estos descritos en la presente.

5 Las partes de unión al antígeno o los anticuerpos derivados de la invención pueden tener (1) regiones CDR3 de cadena ligera y/o cadena pesada; (2) regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera y/o cadena pesada; o (3) regiones de
 10 cadena ligera y/o cadena pesada sustancialmente iguales o idénticas, en comparación con un anticuerpo a partir del cual se derivan/se modifican genéticamente. Las secuencias dentro de estas regiones pueden contener sustituciones de aminoácidos conservadoras, incluido sustituciones dentro de las regiones CDR. En determinadas realizaciones, no hay más de 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones conservadoras. En una alternativa, las partes de unión al antígeno o los anticuerpos
 15 derivados tienen una región de cadena ligera y/o una región de cadena pesada que son al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % idénticas a un anticuerpo a partir del cual se derivan/modifican genéticamente. Estas partes de unión al antígeno o anticuerpos derivados pueden tener sustancialmente la misma especificidad de unión y/o afinidad por el antígeno diana en comparación con el anticuerpo. En determinadas realizaciones, los valores de K_d y/o K_{off} de las partes de unión al antígeno o anticuerpos derivados se encuentran dentro de 10 veces (mayor o menor), 5 veces (mayor o menor), 3 veces (mayor o menor) o 2 veces (mayor o menor) que los de un anticuerpo descrito en la presente.

20 En determinadas realizaciones, las partes de unión al antígeno o los anticuerpos derivados se pueden derivar/modificar genéticamente de anticuerpos completamente humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos y se pueden producir de acuerdo con cualquier procedimiento reconocido en la técnica.

25 Las técnicas de anticuerpos monoclonales permiten la producción de agentes de unión celular extremadamente específicos en forma de anticuerpos monoclonales específicos. En la técnica, se conocen particularmente los procedimientos para crear anticuerpos monoclonales producidos mediante la inmunización de ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés como la célula diana intacta, antígenos aislados de la célula diana, virus completos, virus completos atenuados y proteínas virales como las proteínas de recubrimiento viral. También se
 30 pueden utilizar células humanas sensibilizadas. Otro procedimiento para crear anticuerpos monoclonales es el uso de bibliotecas de fagos de scFv (región variable de cadena simple), específicamente scFv humano (véanse, p. ej., Griffiths *et al.*, las patentes estadounidenses N.º 5.885.793 y 5.969.108; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; Liming *et al.*, WO 99/06587). Además, también se pueden utilizar los anticuerpos revestidos descritos en la patente estadounidense N.º 5.639.641, así como los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados.

35 El agente de unión celular también puede ser péptidos derivados de la expresión en fagos (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* (2011) 108(17), 6909-6914) o las técnicas de biblioteca de péptidos (véase, por ejemplo, Dane *et al.*, *Mol. Cancer. Ther.* (2009) 8(5):1312-1318).

40 En determinadas realizaciones, el CBA de la invención también incluye un mimético de anticuerpo, como un DARPin, un aficuerpo, una afilina, una afitina, una anticalina, un avímero, un fynomer, un péptido de dominio Kunitz, un monocuerpo o una nanofitina.

45 Según se emplean en la presente, los términos “**DARPin**” y “**proteína de repetición de anquirina (diseñada)**” se utilizan indistintamente para hacer referencia a determinadas proteínas miméticas de anticuerpo modificadas genéticamente que típicamente presentan unión al a diana preferencial (a veces, específica). La diana puede ser una proteína, carbohidrato u otras entidades químicas y la afinidad de unión puede ser bastante alta. Las DARPin se pueden derivar de proteínas que contienen repeticiones de anquirina naturales y, preferentemente, consisten en al menos tres, generalmente, cuatro o cinco motivos de repetición de anquirina (por lo general aproximadamente 33 residuos en cada motivo de repetición de anquirina) de estas proteínas. En determinadas realizaciones, una DARPin contiene aproximadamente cuatro o cinco repeticiones, y puede tener una masa molecular de aproximadamente 14 o 18 kDa, respectivamente. Se pueden generar bibliotecas de DARPin con residuos de interacción de diana potencial aleatorizada con diversidades de más de 10^{12} variantes a nivel del ADN para utilizar en la seleccionar de las DARPin que se unen a las dianas deseadas (p. ej., que actúan como agonistas o antagonistas del receptor, agonistas inversos, inhibidores de enzimas o aglutinantes de proteínas diana simples) con especificidad y afinidad picomolar, utilizando diversas tecnologías como la expresión de ribosoma o la expresión en fagos de la partícula de reconocimiento de señales (SRP). Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses N.º 2004/0132028, 2009/0082274, 2011/0118146 y 2011/0224100, WO 02/20565 y WO 06/083275 para la preparación de DARPin y véase también C. Zahnd *et al.* (2010) *Cancer Res.*, 70:1595-1605; Zahnd *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, 281(46):35167-35175; y Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) *Nature Biotechnology*, 23:1257-1268. Véase también la publicación de patente estadounidense N.º 2007/0238667; la patente estadounidense N.º 7.101.675; WO 2007/147213; y WO 2007/062466, para el péptido sintético o las proteínas de repeticiones similares a la anquirina relacionados.

60 Las moléculas de **aficuerpo** son proteínas pequeñas modificadas genéticamente para unirse a una gran cantidad de

5 proteínas o péptidos diana con afinidad alta, imitando así a los anticuerpos monoclonales. Un anticuerpo consiste en tres hélices alfa con 58 aminoácidos y tiene una masa molar de aproximadamente 6 kDa. Se ha demostrado que soportan temperaturas altas (90 °C) o condiciones ácidas y alcalinas (pH 2,5 o pH 11) y se han obtenido aglutinantes con una afinidad que llega al intervalo subnanomolar de selecciones de bibliotecas sin tratamiento y se han obtenido aglutinantes con afinidad picomolar después de la maduración por afinidad. En determinadas realizaciones, los anticuerpos se conjugan con electrófilos débiles para unirse a las dianas de forma covalente.

10 Los **monocuerpos** (también denominados **adnectinas**) son proteínas miméticas de anticuerpo modificadas genéticamente capaces de unirse a antígenos. En determinadas realizaciones, los monocuerpos consisten en 94 aminoácidos y tienen una masa molecular de aproximadamente 10 kDa. Se basan en la estructura de la fibronectina humana, más específicamente en su décimo dominio tipo III extracelular, que tiene una estructura similar a los dominios variables de anticuerpo, con siete láminas beta que forman un barril y tres bucles expuestos a cada lado correspondientes a las tres regiones determinantes de complementariedad. Los monocuerpos con especificidad para diferentes proteínas se pueden diseñar mediante la modificación de los bucles BC (entre la segunda y la tercera lámina beta) y FG (entre la sexta y la séptima lámina).

15 Un **tricuerpo** es un mimético de anticuerpo de autoensamblaje diseñado basándose en la región de hélice superenrollada de extremo C de la proteína de la matriz de cartílago (CMP) de ratón y humana, que se autoensambla en un complejo trimérico paralelo. Es un ligando de direccionamiento trimérico altamente estable creado mediante la fusión de un resto de unión a la diana específico con el dominio de trimerización derivado de CMP. Las proteínas de fusión resultantes se pueden autoensamblar de forma eficaz en un homotrímero paralelo bien definido con estabilidad alta. Los análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de los ligandos de direccionamiento triméricos demostraron una fuerza de unión a la diana significativamente mejorada en comparación con los monómeros correspondientes. Los estudios de unión celular confirmaron que dichos tricuerpos tienen fuerza de unión superior hacia sus respectivos receptores.

20 Una **centirina** es otro mimético de anticuerpo que se puede obtener utilizando una biblioteca construida sobre el marco de una secuencia de dominio FN3 de consenso (Diem *et al.*, *Protein Eng Des. Sel.*, 2014). Esta biblioteca emplea posiciones diversificadas dentro de la cadena C, bucle CD, cadena F y bucle FG del dominio FN3 y se pueden seleccionar variantes de la centirina de afinidad alta contra las dianas específicas.

25 En una realización, el agente de unión celular es un anticuerpo del receptor anti-folato. Más específicamente, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a un receptor 1 de folato humano (también conocido como receptor de folato alfa (FR- α)). Los términos "receptor 1 de folato humano", "FOLR1" o "receptor de folato alfa (FR- α)", tal como se usa en la presente, se refieren a cualquier FOLR1 humano natural, a menos que se indique lo contrario. Por lo tanto, todos estos términos se pueden referir ya sea a una secuencia de ácido nucleico o proteína tal como se indica en la presente. El término "FOLR1" comprende FOLR1 "de longitud completa" no procesado, así como también cualquier forma de FOLR1 que resulte del procesamiento dentro de la célula. El anticuerpo FOLR1 comprende: (a) una CDR1 de cadena pesada que comprende GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 de cadena pesada que comprende RIHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃ (SEQ ID NO: 2); y una CDR3 de cadena pesada que comprende YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); y (b) una CDR1 de cadena ligera que comprende KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 4); una CDR2 de cadena ligera que comprende RASNLEA (SEQ ID NO: 5); y una CDR3 de cadena ligera que comprende QQSREYPYT (SEQ ID NO: 6); en donde Xaa₁ se selecciona de K, Q, H y R; Xaa₂ se selecciona de Q, H, N y R; y Xaa₃ se selecciona de G, E, T, S, A y V. Preferentemente, la secuencia CDR2 de cadena pesada comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7).

30 En otra realización, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de

35 QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWWKSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGGKATLTVDKSSNTA
 40 HMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
 45 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 50 PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

55 En otra realización, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este codificado por el ADN de plásmido depositado con ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene números de depósito de ATCC PTA-10772 y PTA-10773 o 10774.

60 En otra realización, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno

de este que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de

5 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISP
VEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9);o
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISP
VEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQEKSGTASVVCENNMFYPREAKVQWKVDNAEQS
GNSQESVTEQDSKDYSESTETESKADYEKHKVYACEVTHQGESESPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 10).

10 En otra realización, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al anticuerpo de este que se une específicamente al receptor 1 de folato humano que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. Preferentemente, el anticuerpo comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y la cadena ligera que tiene secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (hu FOLR1).

15 En otra realización, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este codificado por el ADN de plásmido depositado con ATCC el 7 de abril de 2010 y que tiene números de depósito de ATCC PTA-10772 y PTA-10773 o 10774.

20 En otra realización, el anticuerpo del receptor anti-folato es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al receptor 1 de folato humano y que comprende un dominio variable de cadena pesada al menos el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % idéntico a
QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGTFMNVWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQKATLTVDKSSNTA
HMELLSLTSEDAVYYCTRYDGSRAM DYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11), y un dominio variable de cadena ligera
25 al menos el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % idéntico a
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISP
VEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEI KR (SEQ ID NO: 12); o
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFTLTISP
VEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGKLEI KR (SEQ ID NO: 13).

30 En otra realización, el anticuerpo del receptor anti-folato es huMov19 o M9346A (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 8.709.432, la patente estadounidense N.º 8.557.966 y WO2011106528).

35 En otra realización, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de anticuerpo de este. En una realización, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no antagonista, incluido, por ejemplo, los anticuerpos descritos en WO2012058592. En otra realización, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no funcional, por ejemplo, ML66 humanizado o EGFR-8. Más específicamente, el anticuerpo anti-EGFR es huML66.

40 En aun otra realización, el anticuerpo anti-EGFR que comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. Tal como se utiliza en la presente, las secuencias con doble subrayado representan las regiones variables (es decir, región variable de cadena pesada o HCVR, y región variable de cadena ligera o LCVR) de las secuencias de cadena pesada o ligera, mientras que las secuencias en negrita representan las regiones CDR (es decir, de extremo N a extremo C, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de las secuencias de cadena pesada o cadena ligera).

45

Anticuerpo	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada/ligera de longitud completa
huML66HC	<u>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGLS</u> LASNSVSWIRQPPGKGLEWMGVIWNHGGTDYNPSI KSRLSISRDTSKSQVFLKMNSLTAADTAMYFCVRKGGIYFDYWGQGVLVTVSSASTKGPVFP APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:14)
huML66LC	<u>DTVLTQSPSLAVSPGERATISCRASESVSTLMHWHYQQKPGQPKLLIY</u> LASHRESGVPARFSGS GS GDFTLIDPMEAEDTATYYC QQSRNDPWT FGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15)

En aun otra realización, el anticuerpo anti-EGFR comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 14, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 15, y preferentemente se une específicamente a EGFR.

5 En aun otra realización, el anticuerpo anti-EGFR comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 14, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 15, y preferentemente que se une específicamente a EGFR.

10 En otra realización, el anticuerpo anti-EGFR son los anticuerpos descritos en 8.790.649 y WO 2012/058588. En una realización, el anticuerpo anti-EGFR es anticuerpo huEGFR-7R.

En una realización, el anticuerpo anti-EGFR comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de

15 OVOLVOSGAEVAKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMOWVKORPGOGEEGIGTIYPGDGDTTYTOKFOGKATLTADKSSST
 AYMOLSSLRSEDSAVYYCARYDAPGYAMDYWGOGTLVTVSSASTKGPSVFPEAPSSKSTSGGTA AEGGEVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 20 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:16) y una región de
 cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 DIOMTOSPSSLSASVGDRVTITCRASODINNYLAWYOHKPGKGPKEEIHYSSTLHPGIPSRFSGSGSGRSDYFSISSLEPE
 DIATYYCLOYDNLLYTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQEKSGTASVVCEENNFYPREAKVQWKVDNAEQSGNSQE
 25 SVTEQDSKDYSESSTETESKADYEKHKVYACEVTHQGESESPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:17), o una región de
 cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 DIOMTOSPSESASVGDRVTITCKASODINNYLAWYOHKPGKGPKEEIHYSSTLHPGIPSRFSGSGSGRSDYFSISSLEPE
 DIATYYGLOYDNLLYTFGOGTKKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18).

30 En otra realización, el anticuerpo anti-EGFR comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:16 y una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:17.

35 En otra realización, el anticuerpo anti-EGFR comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:16 y una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:18.

En aun otra realización, el anticuerpo anti-EGFR comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 16, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 17 o 18, y preferentemente se une específicamente a EGFR.

40 En aun otra realización, el anticuerpo anti-EGFR comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 16, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 17 o 18, y preferentemente que se une específicamente a EGFR.

45 En otra realización, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-CD19, por ejemplos los descritos en la patente estadounidense N.º 8.435.528 y WO2004/103272. En una realización, el anticuerpo anti-CD19 comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 50 QVQLVQPGAEEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTSNWMHWVKQAPGQGLEWIGEIDPSDYSYTNYNQNFQGGKAKLTVDKSTST
 AYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYAMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 55 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:19) y una región de
 cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 EIVLTQSPAIMASASPERVTMTCSASSGVNMYHWYQQKPGTSPRRWIYDTSKSLASGVPARFSGSGSGTDYSLTISSEMEP
 EDAATYYCHQRGSYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:20).

60 En otra realización, el anticuerpo anti-CD19 es anticuerpo huB4.

En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD19 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 19, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 20, y preferentemente se une específicamente a CD19.

5 En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD19 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 19, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 20, y preferentemente que se une específicamente a CD19.

10 En aun otra realización, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-Muc1, por ejemplo, los descritos en la patente estadounidense N.º 7.834.155, WO 2005/009369 y WO 2007/024222, incorporadas a la presente mediante esta referencia. En una realización, el anticuerpo anti-Muc1 comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 15 QAOLVOSGAEVVKGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKOTPGOGLEWIGYIYPGNATNYNOKFOGKATLTADTSSST
 AYMOISLTSSEDSAVYFCARGDSVPFAYWGOGTLVTVSAASTKGPSVFPEAPSSKSTSGGTAAEGCEVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 20 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO:21) y una región de cadena
 ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 EIVLTOSPATMSASPERVITCSAHSSVSFMHWFOOKPGTSPKLWIYSTSSLASGVPARFGGSGSGTSYSLTISSMEAE
 DAATYYCOORSSFPLTFGAGTKEELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREAKVQWVKVDNALQSGNSQ
 ESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22).

25 En otra realización, el anticuerpo anti-Muc1 es anticuerpo huDS6.

En aun otra realización, el anticuerpo anti-Muc1 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 21, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 22, y preferentemente se une específicamente a Muc1.

30 En aun otra realización, el anticuerpo anti-Muc1 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 21, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 22, y preferentemente que se une específicamente a Muc1.

35 En otra realización, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-CD33 o fragmento de este, por ejemplo los anticuerpos o fragmentos de estos descritos en las patentes estadounidenses N.º 7.557.189, 7.342.110, 8.119.787, 8.337.855 y WO2004/043344. En otra realización, el anticuerpo anti-CD33 es anticuerpo huMy9-6.

En una realización, el anticuerpo anti-CD33 comprende una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la
 40 secuencia de aminoácidos de
 OVLOOPGAEVVKGASVKMSCKASGYTFTSYIHWIKOTPGOGLEWVGVYIPGNDDISYNOKFOGKATLTADKSSTTA
 YMOLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGOGTTVTVSS ASTKGPSVFPEAPSSKSTSGGTAAEGCEVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 45 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKLSLSPG (SEQ ID NO:23) y una región de cadena
 ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 EIVLTOSPGSLAVSPGERVTMSCKSSOSVFFSSSOKNYLAWYOOIPGOSPRLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT
 ISSVOPEDLAIYYCHOYLSRFTGOGTKKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQEKSGTASVVCENNFPYAPREAKVQWVKVDNAEQ
 50 SGNSQESVTEQDSKDSTYSESSTETESKADYEKHKVYACEVTHQGEVSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO:24).

En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD33 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 23, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 24, y preferentemente se une específicamente a CD33.

55 En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD33 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 23, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 24, y preferentemente que se une específicamente a CD33.

60 En otra realización, el agente de unión celular es un anticuerpo anti-CD37 o fragmento de anticuerpo de este, por ejemplo

los descritos en la patente estadounidense N.º 8.765.917 y WO 2011/112978. En una realización, el anticuerpo anti-CD37 es anticuerpo huCD37-3.

5 En una realización, el anticuerpo anti-CD37 comprende una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 DIOMTOSPSSLSVSVGERVTITCRASENIRSNLAWYOOKPGKSPKELVNVATNLADGVPSRFSGSGSGTDYSLKINSLOP
 EDFTYYCOHYWGTTWTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25) y una región de
 10 cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 OVOVOESGPGVLVAPSOTLSITCTVSGFSLTTSVGSVWVROPPGKGLEWLVGIWGDGSTNYHPSLKSRLSIKDDHKSOFV
 LKLNLSLAADTATYYCAKGGYSLAHWOGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGGLVKDYFPEPVTVSWNS
 GAETSGVHTFPAVEQSSGEYSESSVTVPSSEGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEEEGGPS
 VFEFPPKPKDTEMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVETVEHQDWENK
 EYKCKVSNKAEPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTEPPSRDEETKNQVSETCEVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
 15 EDSGSSFFEYSKETVDKSRWQQGNVFSCSVMHAEHNHYTQKSESESPG (SEQ ID NO:26), o una región de cadena
 pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 OVOVOESGPGEVAPSOTESITCTVSGFSETTSVGSVWVROPPGKGEWEGVIWGDGSTNYHSSEKSRRESIKDDHKSOFV
 FEKENSETAADTATYYCAKGGYSLAHWOGTEVTVSS_ASTKGPSVFPEAPSSKSTSGGTAALGGLVKDYFPEPVTVS
 WNSGAETSGVHTFPAVEQSSGEYSESSVTVPSSEGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEEE
 20 GGPSVFEPKPKDTEMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVETVEHQDW
 ENGKEYKCKVSNKAEPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTEPPSRDEETKNQVSETCEVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVEDSDGSSFFEYSKETVDKSRWQQGNVFSCSVMHAEHNHYTQKSESESPG (SEQ ID NO:27)

25 En otra realización, el anticuerpo anti-CD37 comprende una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:25 y una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:26.

30 En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD37 comprende una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:25 y una región de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:27.

En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD37 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 26 o 27, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 25, y preferentemente se une específicamente a CD37.

35 En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD37 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 26 o 27, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 25, y preferentemente que se une específicamente a CD37.

40 En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD37 comprende una región de cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 EIVLTOSPATMSASPCERVMTCSATSSVTYMHWYOOKPGOSPKRWIYDTSNLPYGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEA
 EDAATYYCOOWSDNPPTFGOGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:28) y una región de
 45 cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de
 OVOLOESGPGLLKPSOSLSLTCTVSGYSITSGFAWHWIROHPGNKLEWWMGYILYSGSTVYSPSLKSRISITRDTSKNHFFL
 OLNSVTAADTATYYCARGYYGYGAWFAYWGOGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
 SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTEMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
 50 GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:29).

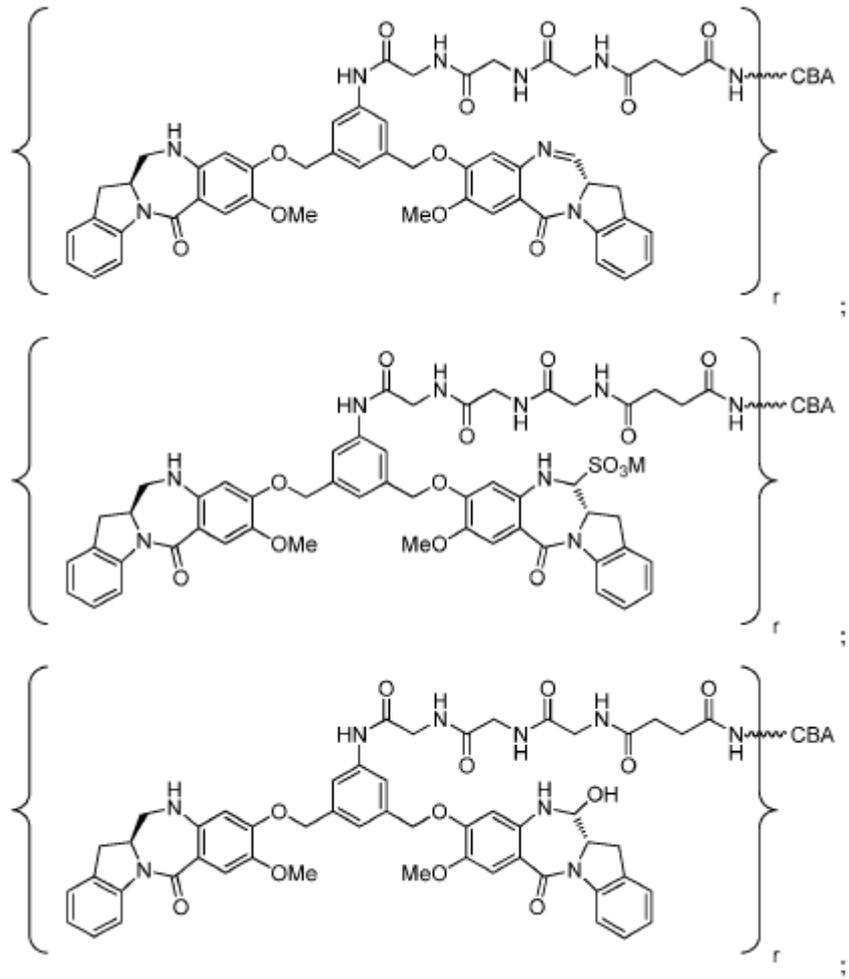
55 En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD37 comprende la CDR1-CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 29, y/o la CDR1-CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 28, y preferentemente se une específicamente a CD37.

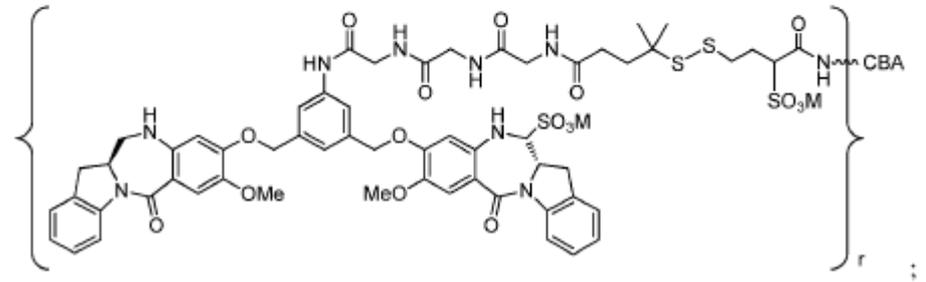
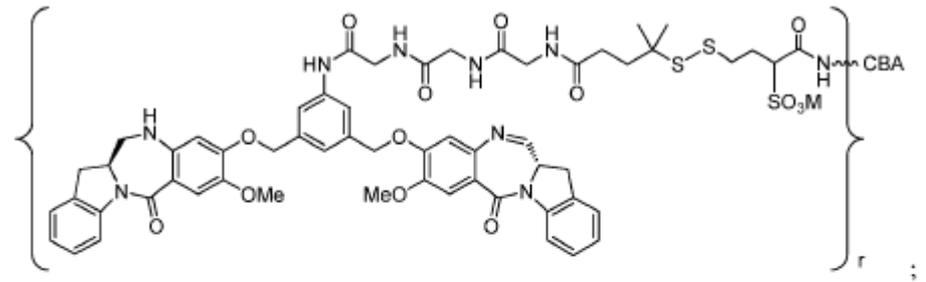
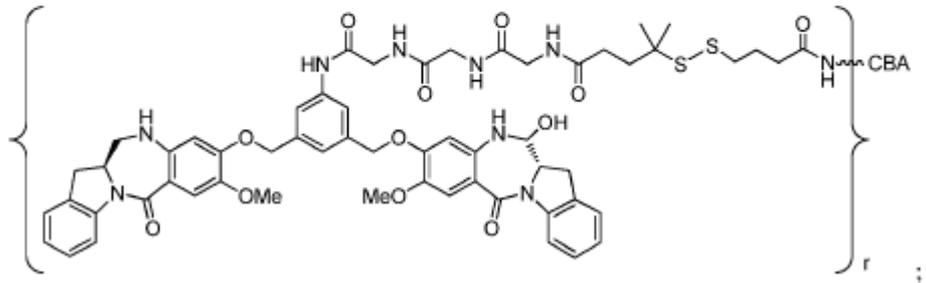
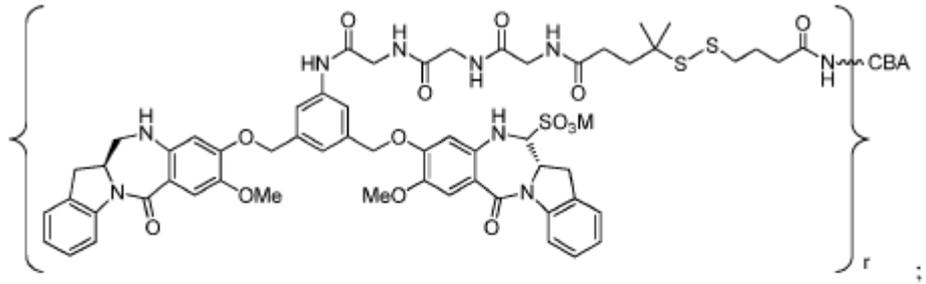
60 En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD37 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada (HCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 29, y/o una secuencia de región variable de cadena ligera (LCVR) al menos el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 28, y preferentemente que se une específicamente a CD37.

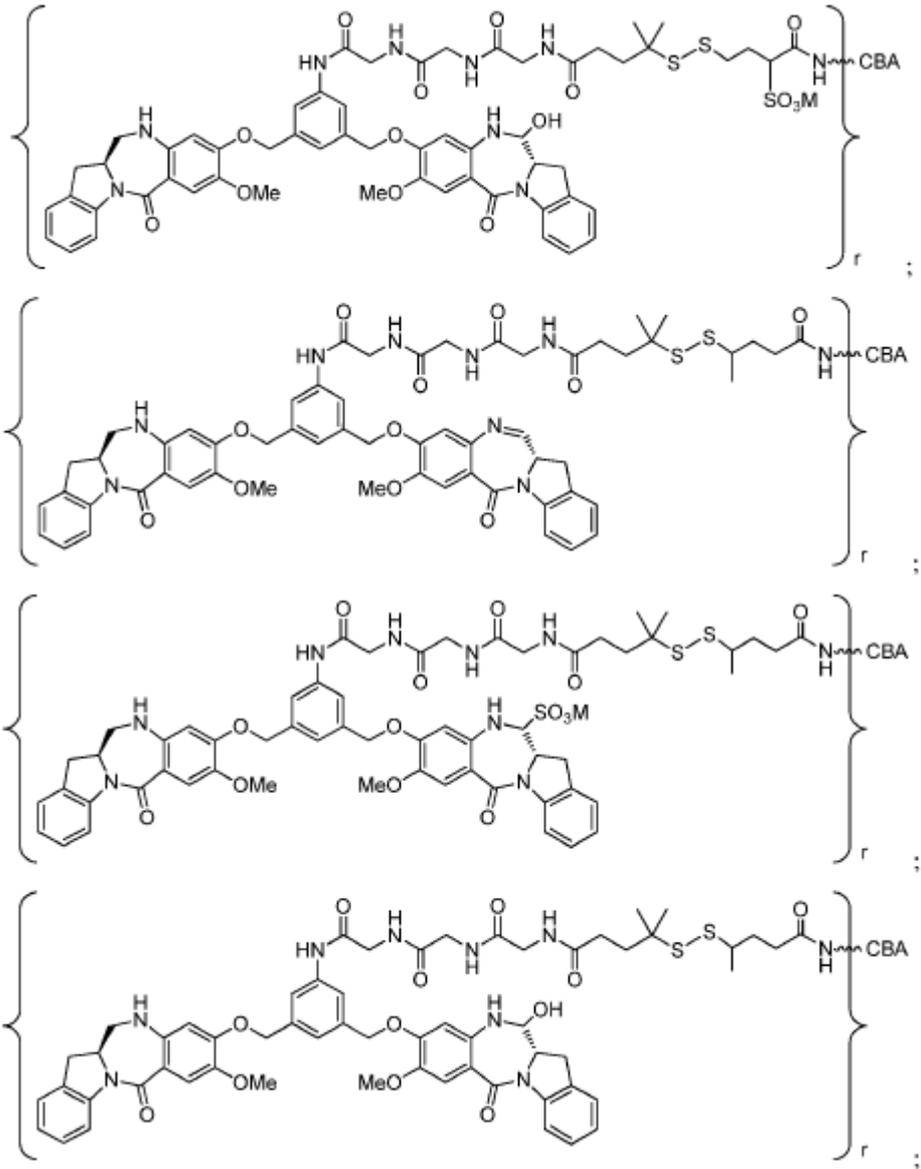
En aun otra realización, el anticuerpo anti-CD37 es anticuerpo huCD37-50.

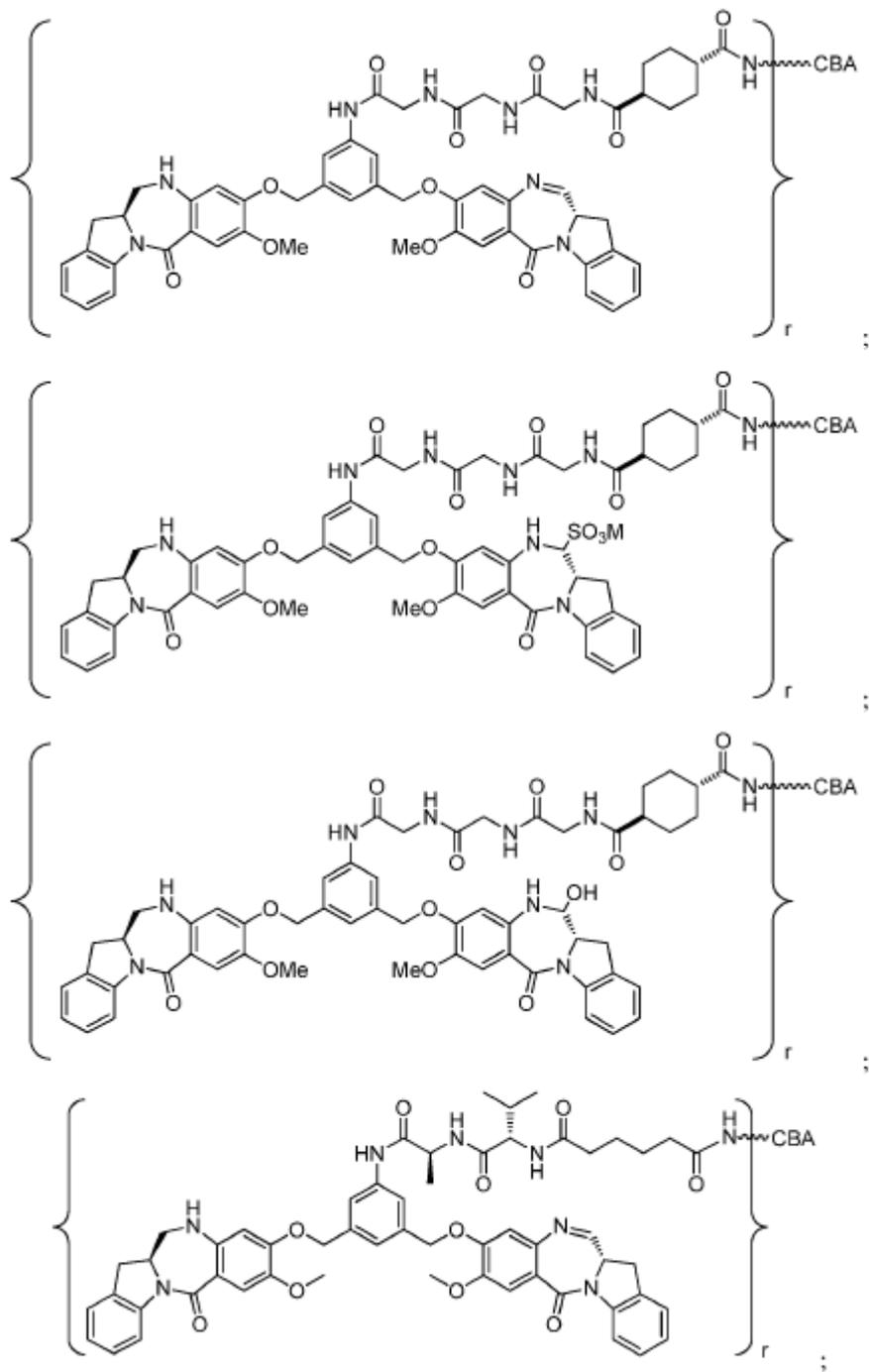
CONJUGADOS DE AGENTE DE UNIÓN CELULAR-FÁRMACO

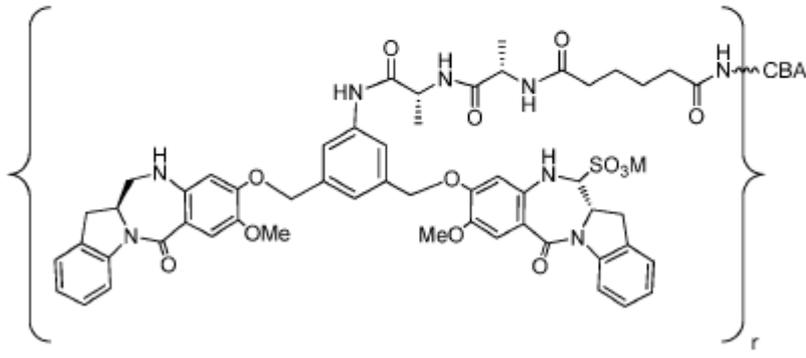
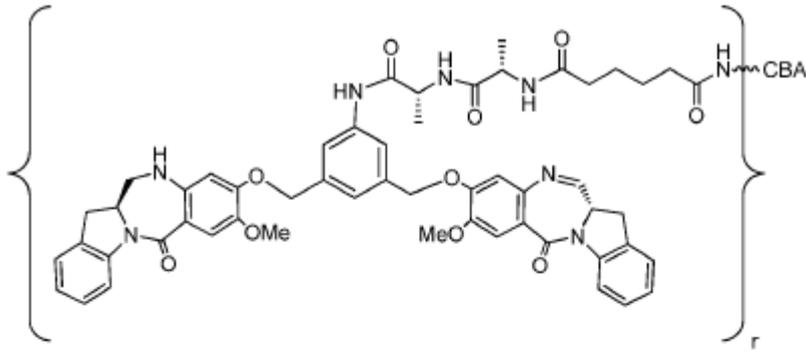
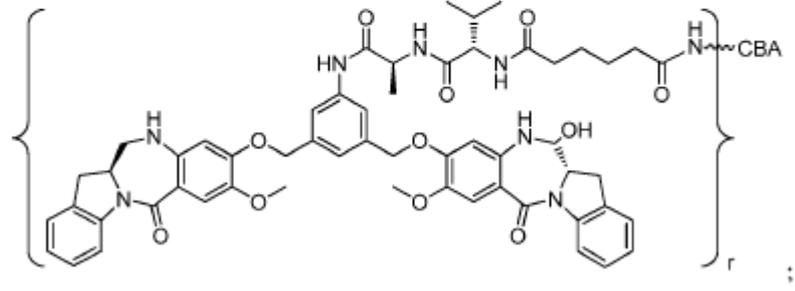
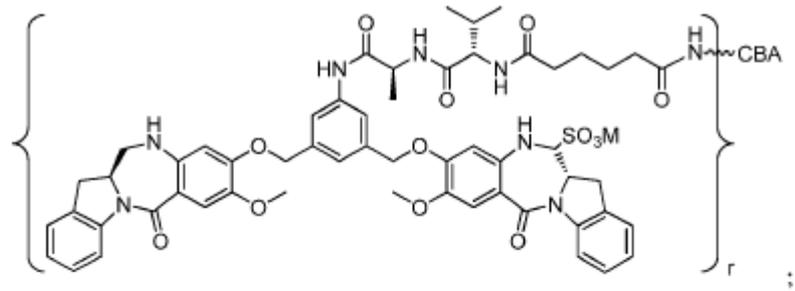
- 5 La presente invención proporciona también conjugados de agente de unión celular-fármaco que comprende un agente de unión celular unido a uno o más compuestos citotóxicos de la presente invención a través de una variedad de enlazadores como se define en la reivindicación 9.
- 10 En determinadas realizaciones, ambos R_a y R_b son H; Cy para la fórmula (B2') es ciclohexano; y R_5 es H o Me; y las variables restantes son como se describió anteriormente en el Segundo aspecto. Más específicamente, m' en la fórmula (B2') puede ser 0 o 1.
- 15 En determinadas realizaciones, ambos R_a y R_b son -H y R_5 es H o Me; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- En determinadas realizaciones, $-(CR_aR_b)_m-$ es $-(CH_2)_m-C(Me_2)-$ y m" es un entero entre 1 y 5; las variables restantes son como se describió anteriormente.
- 20 En una realización específica, para la fórmula estructural (I'), P es un péptido que contiene entre 2 y 10 residuos de aminoácidos; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- En determinadas realizaciones, P es un péptido que contiene entre 2 y 5 residuos de aminoácidos; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- 25 En determinadas realizaciones, P se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosil-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β -Ala-Leu-Ala-Leu y Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- 30 En determinadas realizaciones, P es Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala y D-Ala-D-Ala; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- 35 En una realización específica, para la fórmula estructural (I'), la línea doble \equiv entre N y C representa un enlace doble; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- En una realización específica, para la fórmula estructural (I'), R_5 es -H o alquilo (C_1-C_3); y las variables restantes son como se describieron anteriormente.
- 40 En una realización específica, para la fórmula estructural (I'), la línea doble \equiv entre N y C representa un enlace simple o enlace doble, con la condición de que cuando es un enlace doble X está ausente e Y es -H, y cuando es un enlace simple, X es -H, Y es -OH o $-SO_3M$;
- 45 $R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3'$ y R_4' son todos -H;
 R_6 es -OMe;
 X' e Y' son -H;
A y A' son -O-;
M es H, Na^+ o K^+ ; y las variables restantes son como se describió anteriormente.
- 50 En una realización específica, el conjugado de la presente invención está representado por cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales:

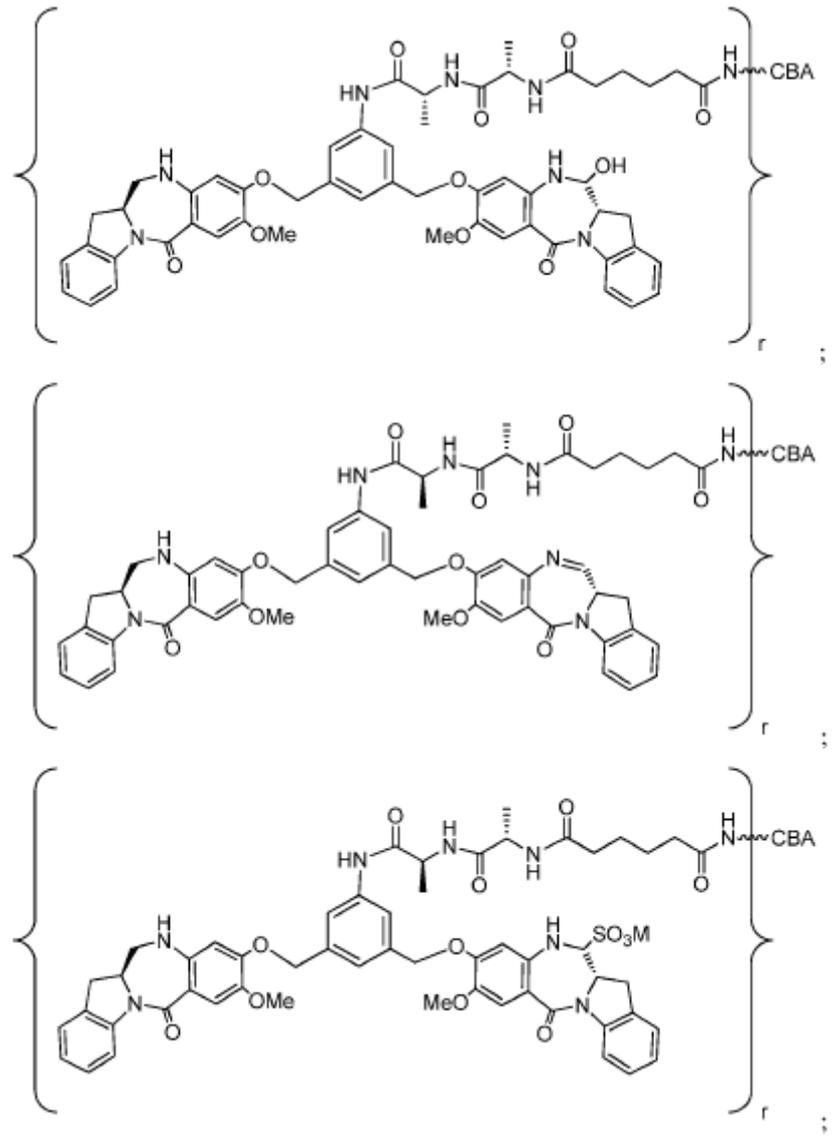


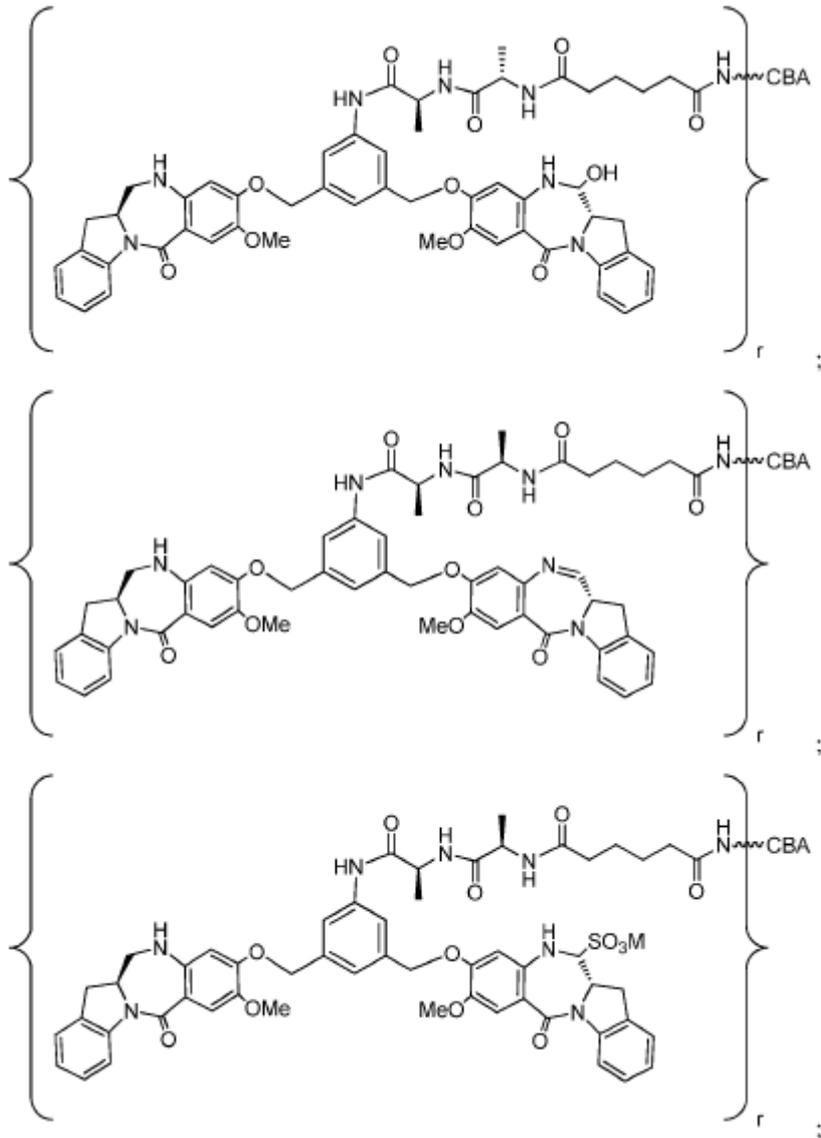


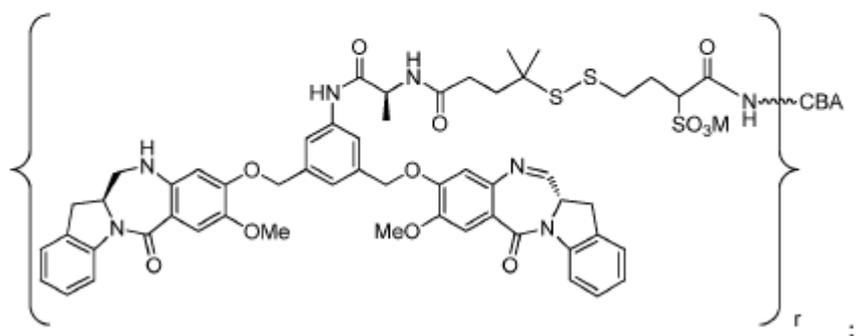
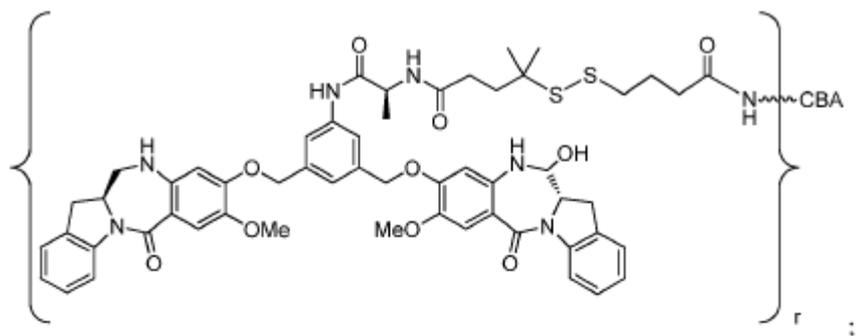
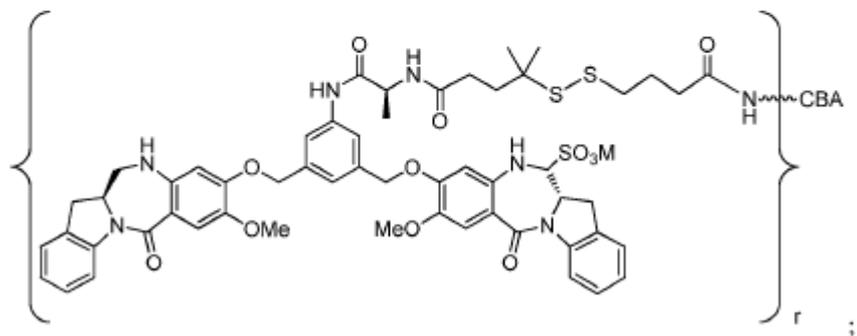
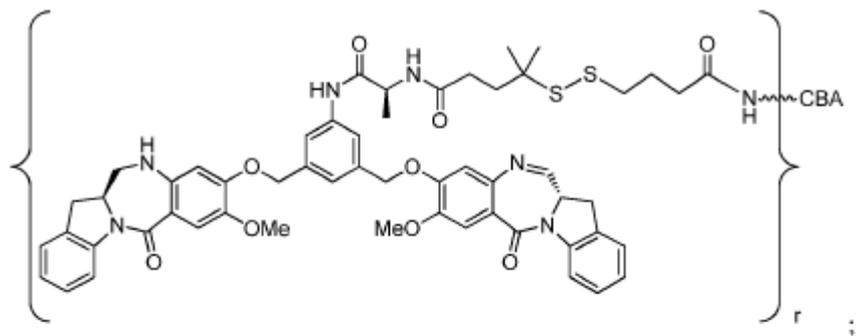


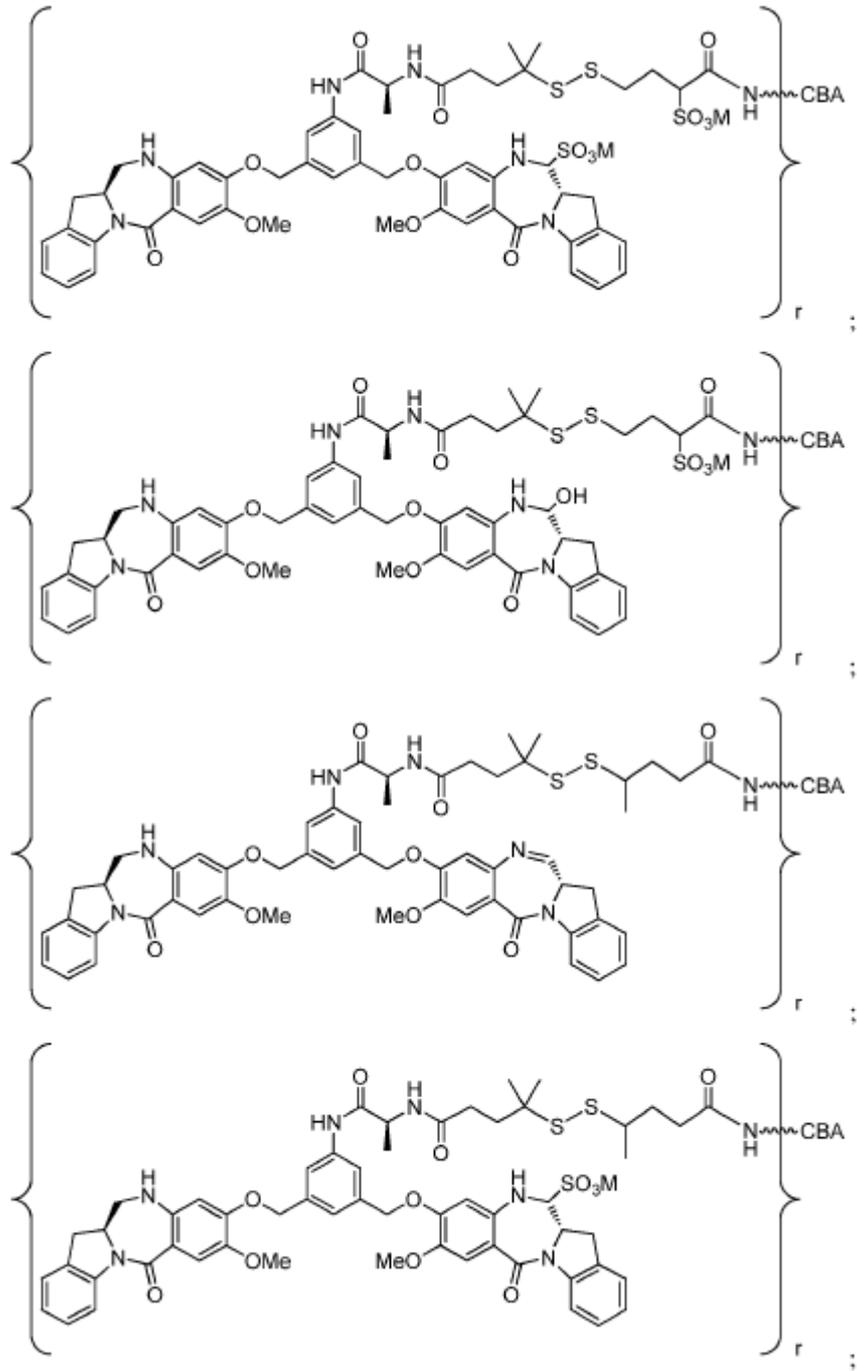


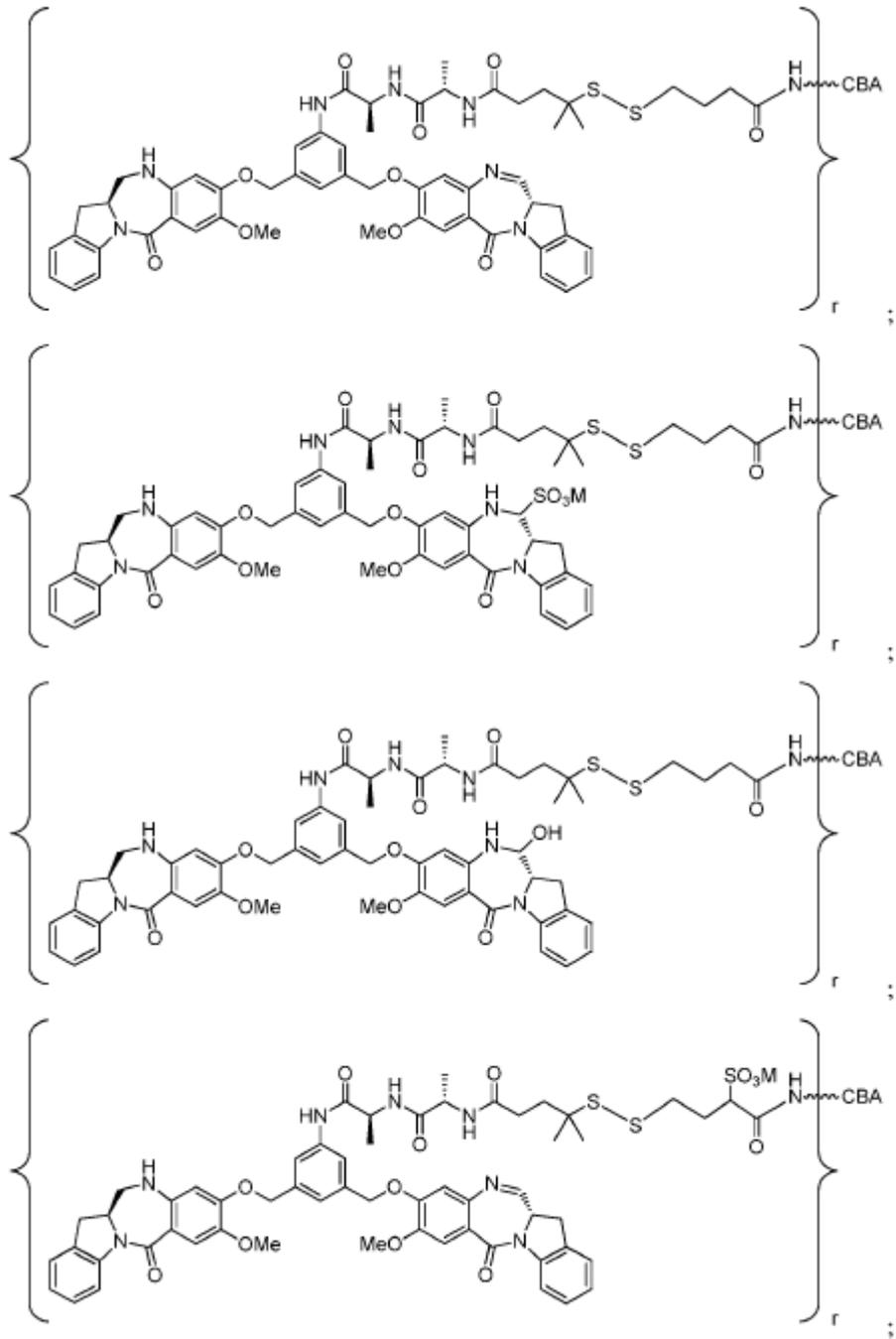


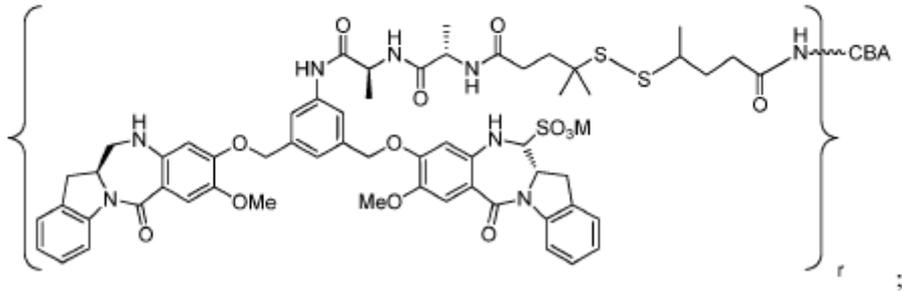
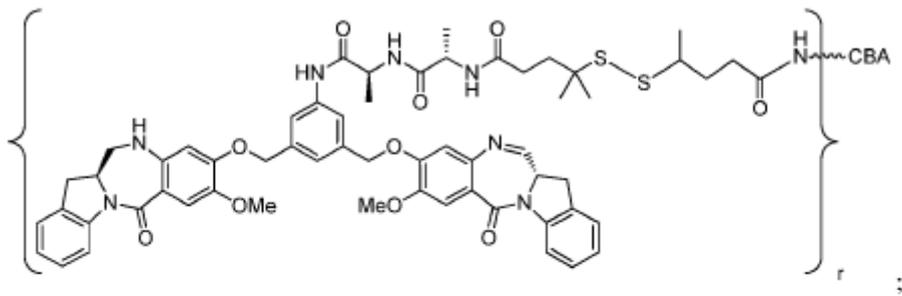
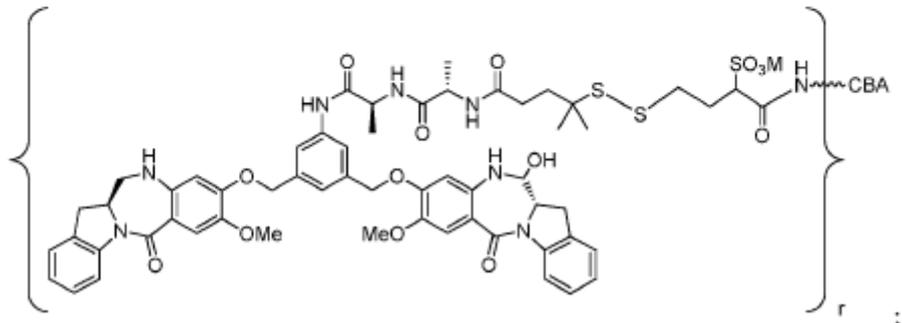
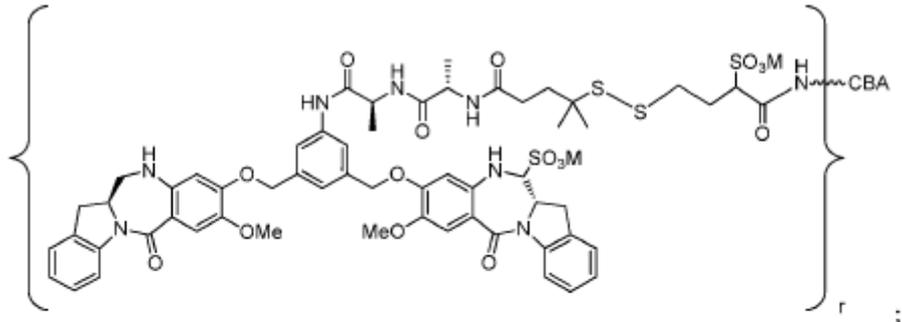


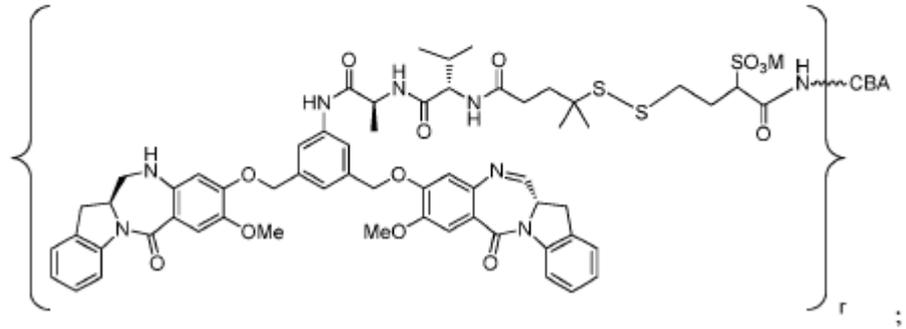
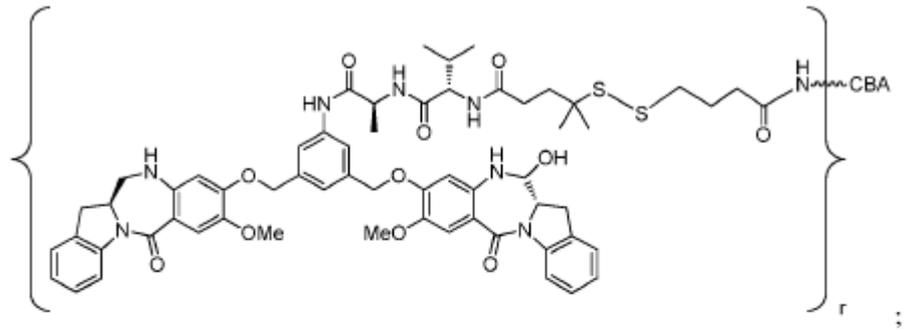
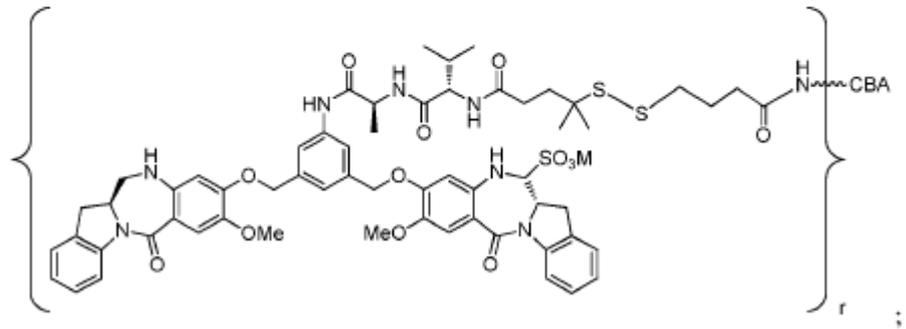
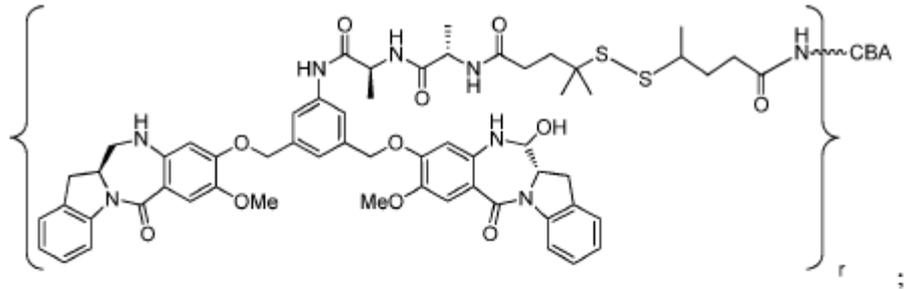


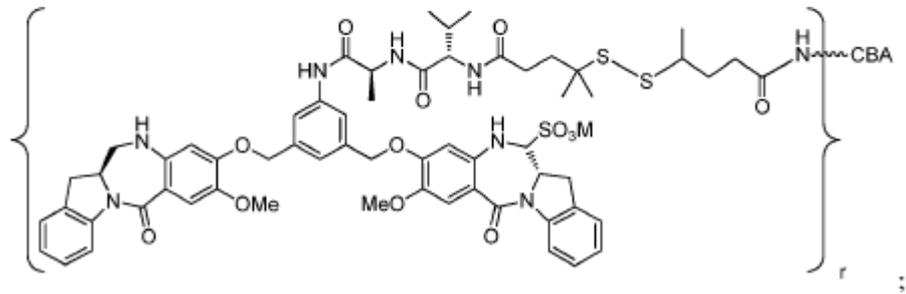
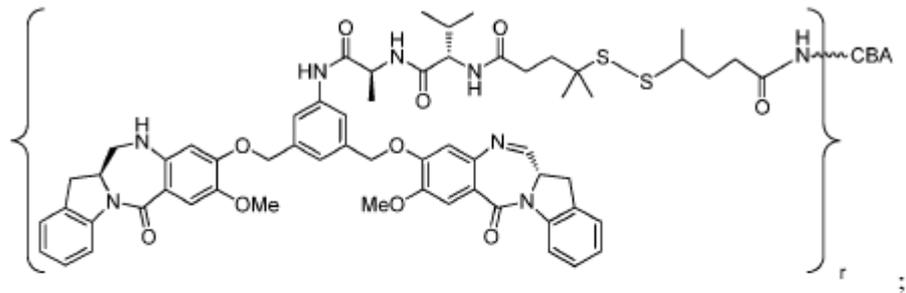
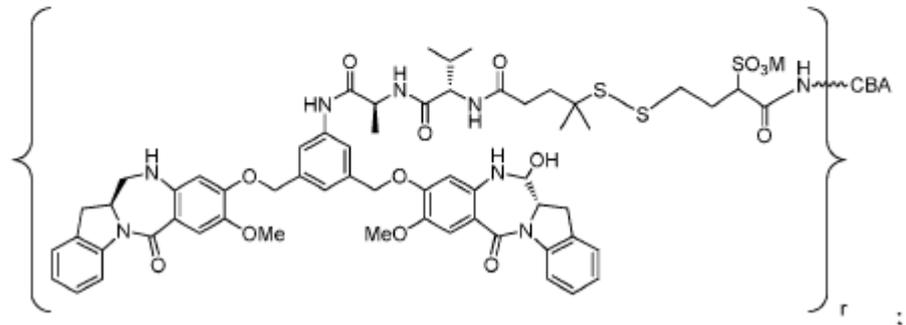
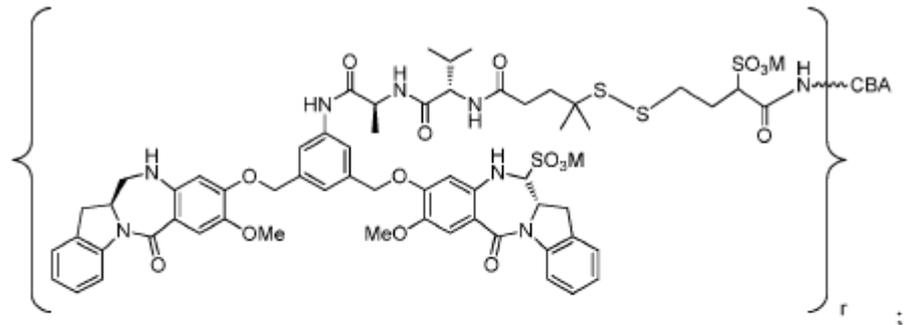


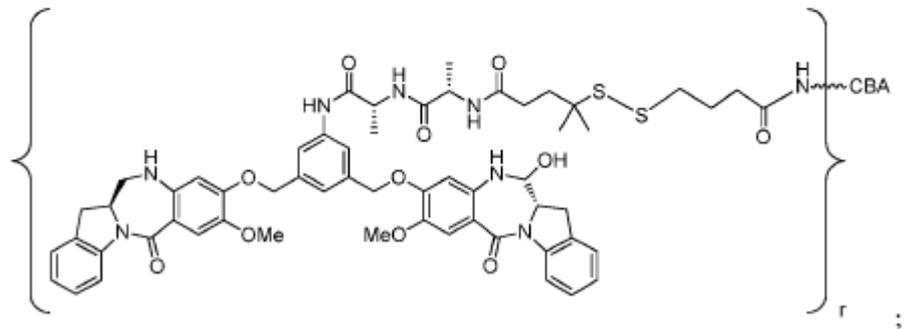
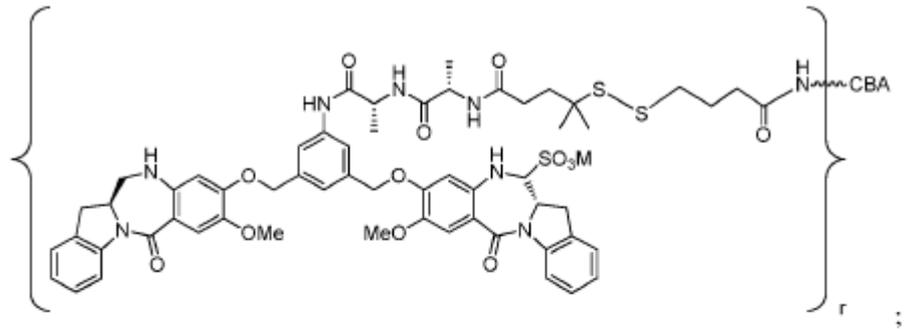
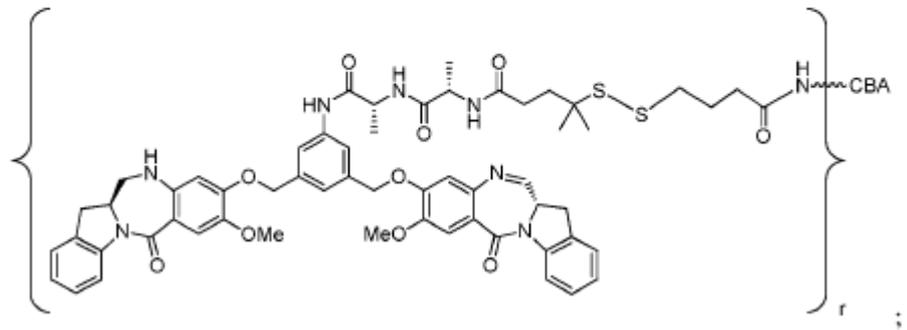
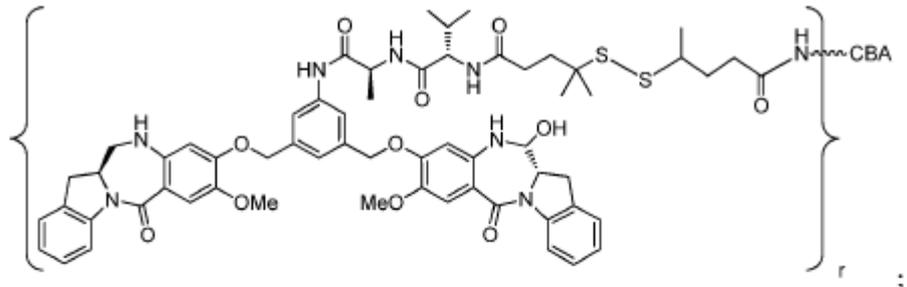


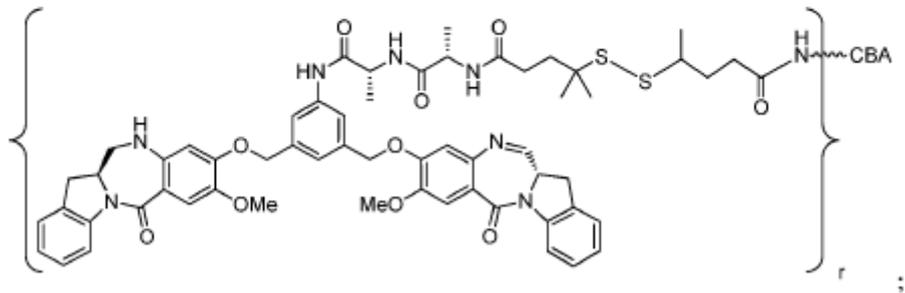
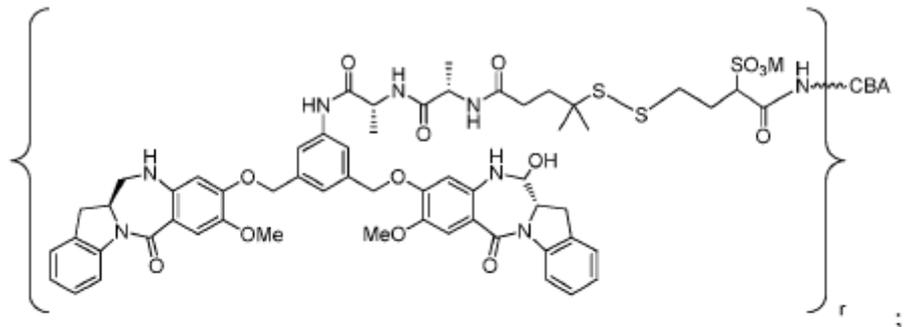
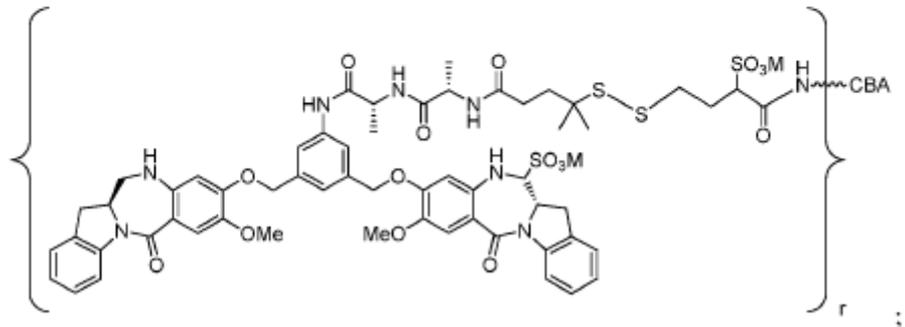
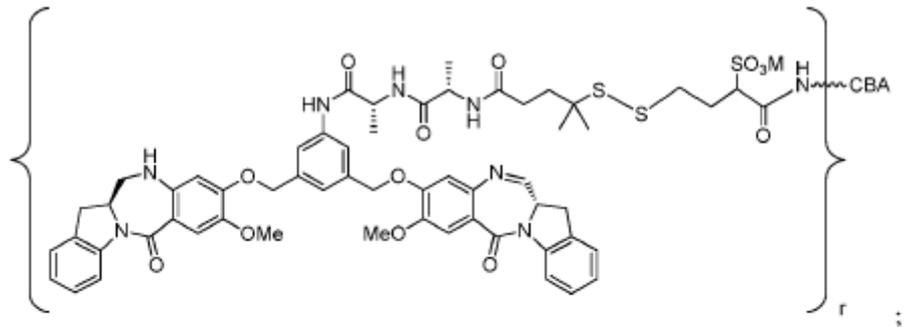




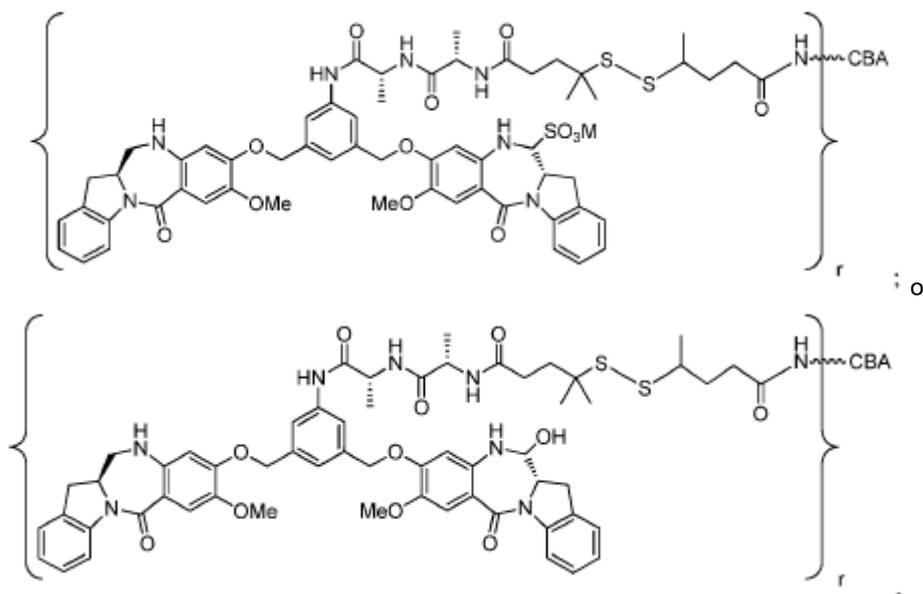








o



o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:

5

r es un entero entre 1 y 10; y

M es un catión farmacéuticamente aceptable (p. ej., H⁺, Na⁺ o K⁺).

Más específicamente, Y es -SO₃M. Alternativamente, Y es -OH.

10

En determinadas realizaciones, los conjugados descritos en la presente pueden comprender 1-10 compuestos citotóxicos, 2-9 compuestos citotóxicos, 3-8 compuestos citotóxicos, 4-7 compuestos citotóxicos o 5-6 compuestos citotóxicos, donde cada compuesto citotóxico comprende el grupo enlazador que enlaza el compuesto citotóxico al CBA, y cada compuesto citotóxico en el conjugado es el mismo.

15

En cualquiera de las realizaciones de conjugados el agente de unión celular se puede unir a células diana seleccionadas de células tumorales, células infectadas con virus, células infectadas con microorganismos, células infectadas con parásitos, células autoinmunes, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B o melanocitos; células que expresan la CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, EpCAM, CanAg, CALLA, o antígenos Her-2; antígenos Her-3; o células que expresan receptor del factor de crecimiento de insulinas, receptor del factor de crecimiento epidérmico y receptor de folato.

20

En cualquiera de las realizaciones de conjugados el agente de unión celular puede ser un anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo de dominio, un fragmento de anticuerpo de dominio que se une específicamente a la célula diana, una linfocina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor estimulante de colonias o una molécula de transporte de nutrientes.

30

El anticuerpo puede ser un anticuerpo revestido, un anticuerpo de cadena simple revestido o un fragmento de anticuerpo revestido.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple o un fragmento de anticuerpo monoclonal de este.

35

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena simple humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado.

En cualquiera de las realizaciones de conjugados anteriores el agente de unión celular puede ser un anticuerpo del

40

receptor anti-folato o un fragmento de anticuerpo de este. Más específicamente, el anticuerpo del receptor anti-folato es anticuerpo huMOV19.

5 Alternativamente, en cualquiera de las realizaciones de conjugados anteriores el agente de unión celular puede ser un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de anticuerpo de este. En una realización, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no antagonista, incluido, por ejemplo, los anticuerpos descritos en WO2012058592. En otra realización, el anticuerpo anti-EGFR es un anticuerpo no funcional, por ejemplo, ML66 humanizado. Más específicamente, el anticuerpo anti-EGFR es huML66.

10 La invención además proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los conjugados descritos en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención proporciona adicionalmente un conjugado que comprende cualquiera de los compuestos en cuestión unidos a un agente de unión celular.

15 La invención además proporciona un compuesto del primer aspecto o un conjugado del segundo aspecto para su uso en un procedimiento para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo, un trastorno autoinmune, trastorno óseo destructivo, enfermedad infecciosa, enfermedad viral, enfermedad fibrótica, trastorno neurodegenerativo, pancreatitis o enfermedad renal en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los compuestos (con o sin grupo enlazador) o los conjugados de la invención y, opcionalmente, un segundo agente quimioterapéutico.

20 En determinadas realizaciones, el segundo agente quimioterapéutico se administra al mamífero secuencial o consecutivamente.

25 En determinadas realizaciones, el procedimiento es para tratar una afección seleccionada de cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto versus huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección e inmunodeficiencia.

30 En determinadas realizaciones, el procedimiento o conjugado es para tratar cáncer.

En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer hematológico o un tumor sólido. Más específicamente, el cáncer es cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, melanoma, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer de próstata, cáncer endometrial, linfoma (p. ej., linfoma no Hodgkin), síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer peritoneal o leucemia (p. ej., leucemia mieloide aguda (AML), leucemia monocítica aguda, leucemia promielocítica, leucemia eosinofílica, leucemia linfoblástica aguda (p. ej., B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mieloide crónica (CML)).

40 PRODUCCIÓN DE CONJUGADOS DE AGENTE DE UNIÓN CELULAR-FÁRMACO

Para enlazar los compuestos citotóxicos o un derivado de estos de la presente invención al agente de unión celular, el compuesto citotóxico puede comprender un resto enlazador con un grupo reactivo unido a este, por ejemplo el compuesto **14** (ejemplo 1), **23** (ejemplo 2), **35** (ejemplo 3), **49** (ejemplo 4), **80** (ejemplo 5) o **90** (ejemplo 6). Estos compuestos pueden estar unidos directamente al agente de unión celular. En los ejemplos 11, 13, 15-17 y 20 se describen procesos representativos para enlazar los compuestos citotóxicos que tienen un grupo reactivo unido a estos con el agente de unión celular para producir los conjugados de agente de unión celular-agente citotóxico.

50 Un reactivo de reticulación bifuncional primero se puede hacer reaccionar con el compuesto citotóxico para proporcionar el compuesto que presenta un resto enlazador con un grupo reactivo unido a este (es decir, compuesto de fármaco-enlazador), que luego puede reaccionar con un agente de unión celular. Alternativamente, un extremo del reactivo de reticulación bifuncional primero puede reaccionar con el agente de unión celular para proporcionar el agente de unión celular que presenta un resto enlazador con un grupo reactivo unido a este, que luego puede reaccionar con un compuesto citotóxico. El resto de unión puede contener un enlace químico que permite la liberación del resto citotóxico en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles al ácido, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles a peptidasa y enlaces lábiles a esterasa (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 y 7.414.073). Se prefieren los enlaces disulfuro, enlaces lábiles a peptidasa y tioéter. Otros enlazadores descritos en esta invención incluyen enlazadores no escindibles, como los que se describen detalladamente en la publicación estadounidense número 2005/0169933 o enlazadores cargados o enlazadores hidrofílicos y se describen en

US 2009/0274713, US 2010/01293140 y WO 2009/134976.

5 Una solución de un agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo) en amortiguador acuoso se puede incubar con un exceso molar de un agente de reticulación bifuncional, por ejemplo *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB) para introducir grupos ditiopiridilo. El agente de unión celular modificado (p. ej., anticuerpo modificado) luego se hace reaccionar con el compuesto citotóxico que contiene tiol descrito en la presente, por ejemplo el compuesto **98** o **99** (ejemplos 9 y 10), para producir un conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico unido a disulfuro de la presente invención.

10 En otra realización, el compuesto citotóxico que contiene tiol descrito en la presente, por ejemplo el compuesto **98** o **99**, puede reaccionar con un agente de reticulación bifuncional tal como *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-sulfo butanoato (sulfo-SPDB) para formar un compuesto de agente citotóxico-enlazador, que luego puede reaccionar con un agente de unión celular para producir un conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico unido a disulfuro de la presente invención. El compuesto de agente citotóxico-enlazador se puede preparar in situ sin purificación antes de la reacción con el agente de unión celular. Los ejemplos 12 y 18 describen un proceso representativo. Alternativamente, el compuesto de agente citotóxico-enlazador se puede purificar antes de la reacción con el agente de unión celular.

20 El conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico se puede purificar utilizando cualquier procedimiento de purificación conocido en la técnica, por ejemplo los descritos en la patente estadounidense N.º 7.811.572 y la publicación estadounidense N.º 2006/0182750. Por ejemplo, el conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico se puede purificar utilizando filtración de flujo tangencial, cromatografía de adsorción, filtración de adsorción, precipitación selectiva, filtración de no adsorción o combinación de estos. Preferentemente, se utiliza filtración de flujo tangencial (TFF, también llamada filtración de flujo cruzado, ultrafiltración y diafiltración), y/o resinas de cromatografía de adsorción para la purificación de los conjugados.

25 Alternativamente, el agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo) se puede incubar con un exceso molar de un agente de modificación de anticuerpo tal como 2-iminotiolano, L-homocisteína tiolactona (o derivados) o *N*-succinimidil-S-acetilacetato (SATA) para introducir grupos sulfidril. El anticuerpo modificado luego se hace reaccionar con el agente citotóxico que contiene disulfuro adecuado para producir un conjugado de anticuerpo-agente citotóxico unido a disulfuro. El conjugado anticuerpo-agente citotóxico luego se puede purificar a través de los procedimientos descritos anteriormente. El agente de unión celular también se puede modificar para introducir restos tiol, por ejemplo los anticuerpos modificados con cisteína descritos en las patentes estadounidenses N.º 7.772485 y 7,855.275.

35 Una solución de un agente de unión celular (p. ej., un anticuerpo) en amortiguador acuoso se puede incubar con un exceso molar de un agente de modificación de anticuerpo tal como *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxilato para introducir grupos maleimido, o con *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-aminobenzoato (SIAB) para introducir grupos yodoacetilo. El agente de unión celular modificado (p. ej., anticuerpo modificado) luego se hace reaccionar con el agente citotóxico que contiene tiol para producir un conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico unido a tioéter. El conjugado luego se puede purificar a través de los procedimientos descritos anteriormente.

40 El número de moléculas citotóxicas unidas por molécula de anticuerpo se puede determinar de forma espectrofotométrica mediante la medición de la proporción de la absorbancia en 280 nm y 330 nm. Un promedio de 1-10 compuestos citotóxicos/moléculas de anticuerpo se puede unir a través de los procedimientos descritos en la presente. El número promedio preferido de compuestos citotóxicos unidos por molécula de anticuerpo es 2-5 y el más preferido es 2,5-4,0.

En 8.765.740 y la publicación de solicitud estadounidense N.º 2012/0238731 se describen procesos representativos para preparar los conjugados de agente de unión celular-fármaco de la presente invención.

50 CITOTOXICIDAD DE COMPUESTOS Y CONJUGADOS

Se pueden evaluar los compuestos citotóxicos y los conjugados de agente de unión celular-fármaco de la invención en cuanto a su capacidad de suprimir la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer *in vitro*. Por ejemplo, se pueden utilizar líneas celulares tales como línea celular KB del carcinoma cervical humano, línea celular THP-1 de leucemia monocítica aguda humana, línea celular HL60 de leucemia promielocítica humana, línea celular HNT-34 de leucemia mielóide aguda humana, para la evaluación de citotoxicidad de estos compuestos y conjugados. Las células que se evaluarán se pueden exponer a los compuestos o los conjugados durante 1-5 días y las fracciones supervivientes de células se pueden medir en ensayos directos a través de los procedimientos conocidos. Se pueden calcular los valores de IC₅₀ a partir de los resultados de los ensayos. Además o alternativamente, se puede utilizar un ensayo de sensibilidad de línea celular *in vitro*, como el que describe el Instituto Nacional del Cáncer de EUA (véase Voskoglou-Nomikos *et al.*,

2003, Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239) como una de las guías para determinar los tipos de cáncer que pueden ser sensibles al tratamiento con los compuestos o conjugados de la invención.

5 En las figuras 2 y 4 se muestran ejemplos de potencia *in vitro* y especificidad diana de los conjugados de anticuerpo-agente citotóxico de la presente invención. Todos los conjugados son extremadamente citotóxicos en las células cancerosas positivas del antígeno con un IC₅₀ en el intervalo picomolar bajo. Las líneas celulares negativas del antígeno permanecen viables cuando se exponen a los mismos conjugados.

10 En un ejemplo, se midió la eficacia *in vivo* de un conjugado de agente de unión celular/agente citotóxico. Se trataron ratones SCID que poseían células tumorales NCI-H2110 con conjugados huMov19-80 y huMov19-90 y se observó una regresión tumoral significativa en múltiples dosis mientras que los ratones no tratados aumentaron los tumores rápidamente (figura 6). Se observó la actividad para el conjugado huMov19-90 en dosis tan bajas como 5 µg/kg.

15 COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE USO

La presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende conjugados de la invención (y/o solvatos, hidratos y/o sales de estos) y un portador farmacéuticamente aceptable. La presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende los conjugados de la invención (y/o solvatos, hidratos y/o sales de estos) y un portador farmacéuticamente aceptable que además comprende un segundo agente terapéutico. Las presentes composiciones son útiles para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (p. ej., un ser humano). Las presentes composiciones también son útiles para tratar la depresión, la ansiedad, el estrés, las fobias, el pánico, la disforia, trastornos psiquiátricos, el dolor y enfermedades inflamatorias en un mamífero (p. ej., un ser humano).

25 La presente invención incluye un compuesto del primer aspecto o un conjugado del segundo aspecto para su uso en un procedimiento para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo en un mamífero (p. ej., un ser humano) que comprende administrarle a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o los conjugados (y/o solvatos y sales de estos) solos o combinados con un segundo agente terapéutico.

30 La presente invención también proporciona un conjugado del segundo aspecto para su uso en procedimientos de tratamiento que comprenden administrarle a un sujeto que necesite el tratamiento una cantidad eficaz del conjugado. Se describe también en esta invención un procedimiento para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas que comprenden poner en contacto células diana o tejido que contiene células diana con una cantidad eficaz de un agente citotóxico que comprende cualquiera de los compuestos citotóxicos-agentes de unión celular (p. ej., dímero de indolinobenzodiazepina o oxazolidinobenzodiazepina unido a un agente de unión celular) de la presente invención, una sal o solvato de estos. Las células diana son células a las cuales el agente de unión celular se puede unir.

Si se desea, se pueden administrar otros agentes activos, como otros agentes antitumorales, junto con el conjugado.

40 Los portadores, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son conocidos y se pueden determinar por los entendidos en la técnica según lo requiera la situación clínica.

45 Algunos ejemplos de portadores, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco, pH de aproximadamente 7,4, que contiene o que no contiene entre aproximadamente 1 mg/mL y 25 mg/mL de albúmina de suero humano, (2) 0,9 % de solución salina (0,9 % p/v NaCl) y (3) 5 % de (p/v) dextrosa; y también puede contener un antioxidante como triptamina y un agente estabilizante como Tween 20.

50 El procedimiento para inducir la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas se puede llevar a la práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Algunos ejemplos de usos *in vitro* incluyen tratamientos de médula ósea autóloga antes de su trasplante en el mismo paciente para destruir células enfermas o malignas; tratamientos de médula ósea antes de su trasplante para destruir los linfocitos T competentes y prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD); tratamientos de cultivos celulares para destruir todas las células excepto para las variantes deseadas que no expresan el antígeno diana; o para destruir las variantes que expresan un antígeno no deseado.

Las condiciones de uso *in vitro* no clínicas se pueden determinar fácilmente por un entendido en la técnica.

60 Algunos ejemplos de uso clínico *ex vivo* son la remoción de células tumorales o células linfoides de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o la remoción

de linfocitos T y otras células linfoides de un tejido o de la médula ósea autóloga o alogénica antes del trasplante para prevenir la GVHD. El tratamiento se puede realizar del siguiente modo. Se recoge la médula ósea del paciente u otro individuo y se incuba en medio que contiene suero al cual se le añade el agente citotóxico de la invención, las concentraciones oscilan entre aproximadamente 10 μM y aproximadamente 1 pM , durante entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37 $^{\circ}\text{C}$. Las condiciones exactas de concentración y tiempo de incubación, es decir, la dosis, se determinan fácilmente por un entendido en la técnica. Después de la incubación, se lavan las células de la médula ósea con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por vía intravenosa de acuerdo con los procedimientos conocidos. En los casos en los que el paciente recibe otro tratamiento como un ciclo de quimioterapia ablativa o irradiación corporal total entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de médula tratadas se almacenan congeladas en nitrógeno líquido utilizando equipos médicos estándar.

Para el uso clínico *in vivo*, se suministrará el agente citotóxico de la invención como una solución o un polvo liofilizado que se evalúa en cuanto a la esterilidad y los niveles de endotoxina. A continuación se presentan algunos ejemplos de protocolos de administración de los conjugados adecuados. Los conjugados se administran semanalmente durante 4 semanas como un bolo intravenoso cada semana. Las dosis en bolo se administran en 50 a 1000 mL de solución salina normal a la cual se le puede añadir entre 5 y 10 mL de albúmina de suero humano. Las dosificaciones serán de entre 10 μg y 2000 mg por administración, por vía intravenosa (intervalo de entre 100 ng y 20 mg/kg por día). Después de cuatro semanas de tratamiento, el paciente puede seguir recibiendo el tratamiento de forma semanal. Los protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, los excipientes, los diluyentes, las dosificaciones, los momentos, etc., se pueden determinar por los entendidos en la técnica según lo requiera la situación clínica.

Algunos ejemplos de afecciones médicas que se pueden tratar de acuerdo con los procedimientos *in vivo* o *ex vivo* de la inducción de la muerte celular en poblaciones celulares seleccionadas incluyen neoplasias malignas de cualquier tipo incluido, por ejemplo, el cáncer, enfermedades autoinmunitarias, como lupus sistémico, artritis reumatoide y esclerosis múltiple; rechazo de trasplantes, como rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante hepático, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante cardíaco y rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de injerto contra huésped; infecciones virales, como infección por CMV, infección por VIH, SIDA, etc.; e infecciones por parásitos, como giardiasis, amebiasis, esquistosomiasis y otras, según lo determinado por un entendido en la técnica.

Las terapias contra el cáncer y sus dosificaciones, vías de administración y uso recomendado se conocen en la técnica y se han descrito en textos como Physician's Desk Reference (PDR). La PDR describe dosificaciones de los agentes que se han utilizado en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerá del cáncer particular que se esté tratando, el grado de la enfermedad y otros factores conocidos para el médico entendido en la técnica y se pueden determinar por el médico. El entendido en la técnica puede revisar la PDR, utilizando uno o más de los siguientes parámetros, para determinar el régimen de dosificación y las dosificaciones de los agentes quimioterapéuticos y los conjugados que se pueden utilizar de acuerdo con los principios de la presente invención. Estos parámetros incluyen:

- 40 Índice integral
- Por el fabricante
- Productos (por nombre de la empresa o marca comercial del fármaco)
- Índice de categoría
- Índice genérico/químico (nombres comunes de fármacos que no son marcas)
- 45 Imágenes a color de los medicamentos
- Información del producto coherente con el etiquetado de la FDA
- Información química
- Función/acción
- Indicaciones y contraindicaciones
- 50 Investigación de ensayo, efectos secundarios, advertencias

ANÁLOGOS Y DERIVADOS

El entendido en la técnica de los agentes citotóxicos comprenderá fácilmente que cada uno de los agentes citotóxicos descritos en la presente se puede modificar de modo tal que el compuesto resultante aún mantenga la especificidad y/o la actividad del compuesto de partida. El entendido en la técnica también comprenderá que muchos de estos compuestos se pueden utilizar en lugar de los agentes citotóxicos descritos en la presente. Por lo tanto, los agentes citotóxicos de la presente invención incluyen análogos y derivados de los compuestos descritos en la presente.

60 EJEMPLOS

A continuación será ilustrada la invención mediante la referencia a ejemplos no taxativos. Los ejemplos 7, 8, 14 y 19 no son de la invención. A menos que se establezca lo contrario, todos los porcentajes, proporciones, partes, *etc.* son en peso. Todos los reactivos se obtuvieron de Aldrich Chemical Co., Nueva Jersey, u otras fuentes comerciales. Se adquirieron espectros resonancia magnética nuclear (¹H NMR) en un instrumento Bruker 400 MHz. Se adquirieron espectros de masa en un instrumento Bruker Daltonics Esquire 3000 y se adquirieron LCMS en un LC Agilent 1260 Infinity con un MS cuadrupolo simple de Agilent 6120 utilizando ionización por electroaspersión.

Los siguientes disolventes, reactivos, grupos protectores, restos y otras designaciones se pueden denominar por sus abreviaturas entre paréntesis:

Me = metilo; Et = etilo; Pr = propilo; *i*-Pr = isopropilo; Bu = butilo; *t*-Bu = terc-butilo; Ph = fenilo y Ac = acetilo

AcOH o HOAc = ácido acético

ACN or CH₃CN = acetonitrilo

Ala = alanina

ac.: acuoso

BH₃·DMS = complejo de dimetilsulfuro borano

Bn = bencilo

Boc o BOC = terc-butoxicarbonilo

CBr₄ = carbontetrabromuro

Cbz o Z = benciloxicarbonilo

DCM o CH₂Cl₂ = diclorometano

DCE = 1,2-dicloroetano

DMAP = 4-dimetilaminopiridina

agua DI = agua desionizada

DIBAL = hidruro de diisobutilaluminio

DIEA o DIPEA = N,N-diisopropiletilamina

DMA = N,N-dimetilacetamida

DMF = N,N-dimetilformamida

DMSO = dimetilsulfóxido

DTT = ditioneitol

EDC = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EEDQ = N-Etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina

ESI o ES = ionización por electroaspersión

EtOAc = etilacetato

Gly = glicina

g = gramos

h = hora

HATU = N,N,N'-tetrametil-O-(7-azabenzotriazol-1-il)uronio hexafosfato

HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento

HOBT o HOBT = 1-hidroxibenzotriazol

LAH = hidruro de litio y aluminio

LC = cromatografía líquida

LCMS = espectrometría de masas por cromatografía líquida

min = minutos

mg = miligramos

mL = mililitros

mmol = milimoles

µg = microgramos

µL = microlitros

µmol = micromoles

Me = metilo

MeOH = metanol

MeI = metilyoduro

MS = espectrometría de masas

MsCl = cloruro de metanosulfonilo (cloruro de mesilo)

Ms₂O = anhídrido metanosulfónico

NaBH(OAc)₃ = triacetoxiborohidruro de sodio

NHS = N-hidroxisuccinamida

NMR = espectroscopia de resonancia magnética nuclear

PPh₃ = trifenilfosfina

PTLC = cromatografía de capa fina preparativa

rac = mezcla racémicaR_f = factor de retardo

5 RPHPLC o RP-HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa

TA o ta = temperatura ambiente (ambiente, aproximadamente 25 °C)

sat. = saturado

STAB = triacetoxiborohidruro de sodio (NaBH(OAc)₃)TBSCl o TBDMSCl = cloruro de *terc*-butildimetilsililo10 TBS = *terc*-butildimetilsililoTCEP·HCl = sal de clorhidrato de *tris*(2-carboxietil)fosfinaTEA = trietilamina (Et₃N)

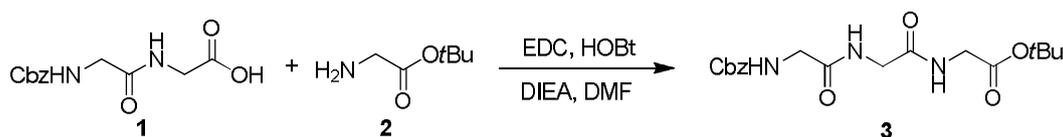
TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetrahidrofurano

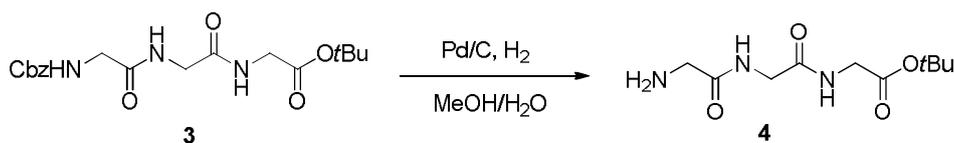
15 TLC = cromatografía de capa fina

Val = valina

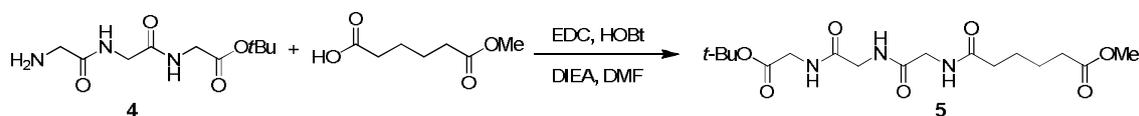
Ejemplo 1. Síntesis de 6-((2-((2-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (compuesto **14**)



25 **Etapa 1:** Se disolvieron Z-Gly-Gly-OH compuesto **1** (5,0 g, 18,78 mmol) y H-Gly-Of-Bu-HCl compuesto **2** (3,46 g, 20,66 mmol) en DMF (37,6 mL). Se agregaron EDC·HCl (3,96 g, 20,66 mmol) y HOBT (2,88 g, 18,78 mmol) al matraz de reacción seguido de DIPEA (8,18 mL, 46,9 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente en Ar durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con NH₄Cl sat., NaHCO₃ sat. seguido de agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/DCM, gradiente, entre el 0 % y el 5 %) para proporcionar el compuesto puro **3** como un sólido blanco (6,35 g, el 89 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,18-8,13 (m, 2H), 7,48 (t, 1H, *J* = 6,0 Hz), 7,37-7,36 (m, 3H), 7,34-7,32 (m, 1H), 5,04 (s, 2H), 4,09 (q, 1H, *J* = 5,2 Hz), 3,74 (t, 4H, *J* = 6,1 Hz), 3,67 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 3,17 (d, 2H, *J* = 5,2 Hz), 1,41 (s, 9H). LCMS = 4,28 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 324,15 (M-*t*-Bu+H).

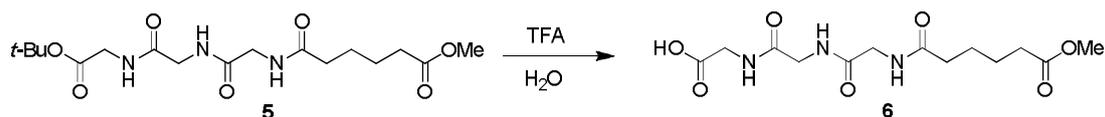


40 **Etapa 2:** Se disolvió el compuesto **3** (6,3 g, 16,60 mmol) en MeOH (52,7 mL) y agua (2,64 mL). La mezcla de reacción se purgó con Ar y se desgasificó durante 5 min. Se agregó lentamente Pd/C (húmedo, 10 %) (0,884 g, 0,830 mmol). Luego se burbujó en H₂ de un balón durante 1 min. La reacción se agitó en un balón de H₂ a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite y la torta del filtro se lavó con MeOH (30 mL) y se concentró. Se agregó CH₃CN (20 mL) al residuo y se concentró. Esto se repitió 2 veces más para obtener un sólido pegajoso. El residuo se suspendió en EtOAc/hexanos (2:1, 50 mL), se filtró y se enjuagó con EtOAc/hexanos (1:1, 30 mL). El sólido se secó al vacío/N₂ durante 1 h para obtener el compuesto **4** como un sólido blanco (3,66 g, 90 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,21-8,18 (m, 1H), 8,12 (bs, 1H), 3,76 (bs, 2H), 3,73 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 3,13 (s, 2H), 1,93 (bs, 2H), 1,41 (s, 9H).



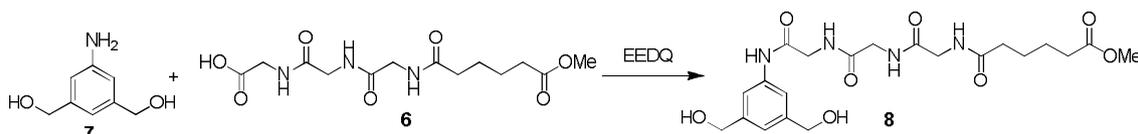
5 **Etapa 3:** se disolvieron amina compuesto **4** (1,0 g, 4,08 mmol) y monometiladipato (664 μ L, 4,48 mmol) en DMF (13,59 mL). Se agregaron EDC·HCl (860 mg, 4,48 mmol) y HOBt (624 mg, 4,08 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (1,424 mL, 8,15 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (20 mL, 5:1) y se lavó con NH_4Cl sat., NaHCO_3 sat., agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente, entre el 0 % y el 20 % de MeOH/DCM) para proporcionar el compuesto puro **5** como un sólido blanco (1,5 g, el 95% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,17-8,06 (m, 3H), 3,74-3,71 (m, 6H), 3,59 (s, 3H), 2,32 (bt, 2H, $J = 6,9$ Hz), 2,14 (bt, 2H, $J = 6,7$ Hz), 1,52-1,49 (m, 4H), 1,41 (s, 9H).

10



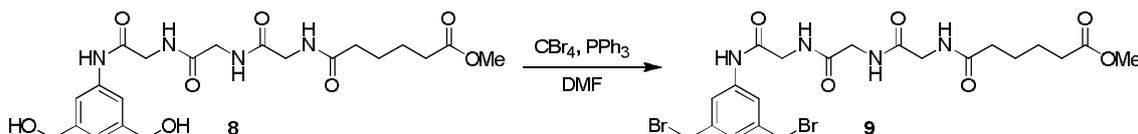
15 **Etapa 4:** El compuesto **5** (1,5 g, 3,87 mmol) se agitó en TFA (5,97 mL, 77,0 mmol) y agua desionizada (300 μ L) a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó CH_3CN (10 mL) a la mezcla de reacción y se agitó durante 5 min. La mezcla se volvió espesa con lotes de precipitado blanco. Se agregó más CH_3CN (30 mL) y se agitó adicionalmente durante 5 min. La mezcla se filtró y se secó al vacío/ N_2 durante 1 h para obtener el compuesto puro **6** como un sólido blanco (0,7 g, 55% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12,56 (s, 1H), 8,16-8,06 (m, 3H), 3,73 (dt, 6H, $J = 8,6, 6,1$ Hz), 3,59 (s, 3H), 2,32-2,29 (m, 2H), 2,16-2,13 (m, 2H), 1,51 (bt, 4H, $J = 3,5$ Hz).

20



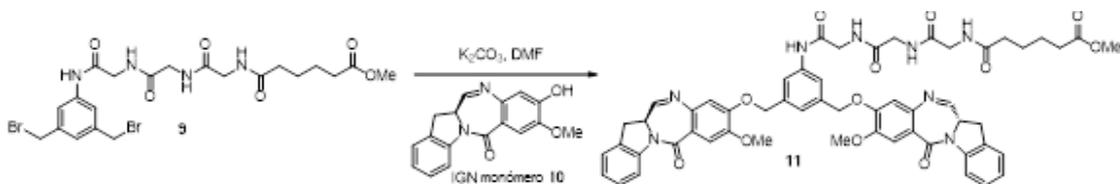
25 **Etapa 5:** Se suspendieron anilina compuesto **7** (100 mg, 0,653 mmol) y ácido compuesto **6** (227 mg, 0,685 mmol) en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (4,35 mL/2,2 mL) a temperatura ambiente. Se agregó EEDQ (323 mg, 1,306 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se concentró y el residuo se suspendió en EtOAc (15 mL) y se filtró. Los sólidos se lavaron con EtOAc (2 x 15 mL) y se secó al vacío/ N_2 para obtener el compuesto **8** como un sólido blanco (260 mg, el 85 % de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,74 (s, 1H), 8,21-8,19 (m, 2H), 8,11-8,08 (m, 1H), 7,45 (s, 2H), 6,96 (s, 1H), 5,17 (t, 2H, $J = 5,7$ Hz), 4,45 (d, 4H, $J = 5,6$ Hz), 3,87 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz), 3,75 (dd, 4H, $J = 5,7, 13,4$ Hz), 3,58 (s, 3H), 2,31-2,27 (m, 2H), 2,16-2,13 (m, 2H), 1,52-1,48 (m, 4H). LCMS = 0,886 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI^+): 489,3 ($\text{M}+\text{Na}$).

30



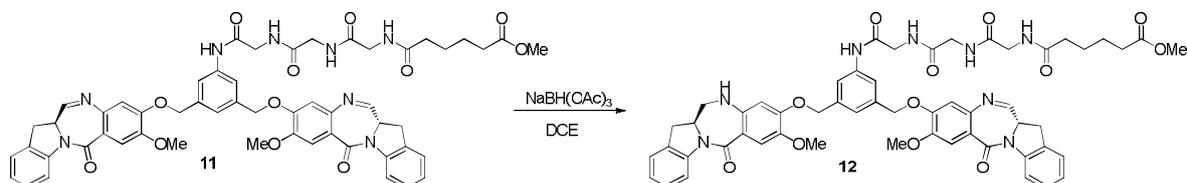
35 **Etapa 6:** se disolvieron diol compuesto **8** (260 mg, 0,557 mmol) y carbontetrabromuro (555 mg, 1,672 mmol) en DMF (5,57 mL). Se agregó trifetilfosfina (439 mg, 1,672 mmol) y la mezcla marrón se agitó en Ar a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (10:1, 30 mL) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/DCM, entre el 0 % y el 10 %, gradiente) para obtener el compuesto **9** como un sólido amarillo. El producto se suspendió en $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (1:10, 30 mL) y luego se filtró. El sólido se lavó con EtOAc y se secó al vacío/ N_2 para proporcionar el compuesto puro **9** como un sólido blanquecino (170 mg, el 52 % de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9,95 (s, 1H), 8,25-8,20 (m, 2H), 8,12-8,10 (m, 1H), 7,65 (s, 2H), 7,22 (s, 1H), 4,68 (s, 3H), 3,89 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz), 3,77 (dd, 4H, $J = 5,7, 7,4$ Hz), 3,58 (s, 3H), 2,31-2,27 (m, 2H), 2,16-2,13 (m, 2H), 1,51-1,49 (m, 4H). LCMS = 3,335 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI^+): 593,2 ($\text{M}+\text{H}$).

40



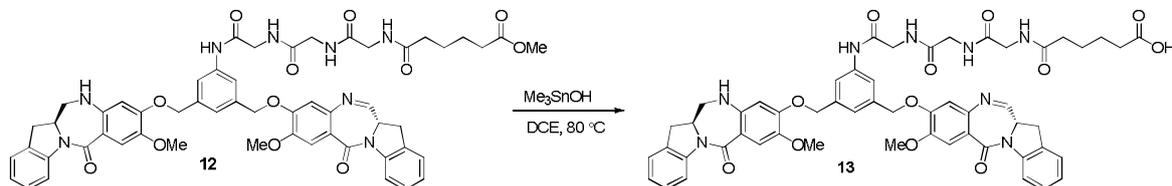
5 **Etap 7:** Se disolvieron dibromuro compuesto **9** (109 mg, 0,184 mmol) y monómero IGN compuesto **10** (119 mg, 0,405 mmol) en DMF (1,84 mL). Se agregó carbonato de potasio (63,6 mg, 0,460 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se agregó agua (20 mL) a la mezcla de reacción para precipitar el producto. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 min y luego se filtró y se secó al vacío/N₂ durante 1 h. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/CH₂Cl₂, gradiente, entre el 0 % y el 5 %) para obtener el compuesto **11** como un sólido amarillo (160 mg, el 60 % de rendimiento, el 70 % de pureza). LCMS = 5,240 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1019,7 (M+H).

10



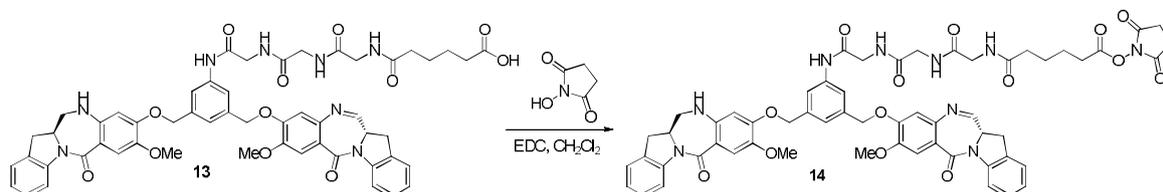
15 **Etap 8:** Se disolvió diimina compuesto **11** (140 mg, 0,11 mmol) en 1,2-dicloroetano (1,1 mL). Se añadió NaBH(OAc)₃ (23,29 mg, 0,11 mmol) a la mezcla de reacción y se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (30 mL) y se inactivó con solución acuosa de NH₄Cl sat. (15 mL). Las capas se separaron y se lavó con salmuera, se secó en Na₂SO₄ y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, CH₃CN/H₂O, gradiente, entre el 35 % y el 55 %) para proporcionar monoimina compuesto **12** como un sólido esponjoso blanco (33 mg, el 29 % de rendimiento) y también se recuperó el material de partida compuesto **11** (25 mg). LCMS = 7,091 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1021,7 (M+H).

20



25 **Etap 9:** Se disolvió metiléster compuesto **12** (33 mg, 0,029 mmol) en THF (1,09 mL) y agua (364 µL). Se agregó LiOH (6,97 mg, 0,291 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (5 mL) y se acidificó con 0,5 M de HCl ac. hasta pH~4. La capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂/MeOH (3:1, 3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron en Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron para obtener el compuesto bruto **13** como un sólido amarillo (29 mg, el 99 % de rendimiento). LCMS = 5,356 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1007,7 (M+H).

30



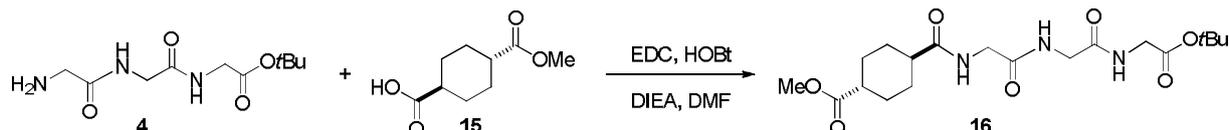
35 **Etap 10:** Se agregó EDC·HCl (22,08 mg, 0,115 mmol) a una solución agitada de ácido compuesto **13** (29 mg, 0,023 mmol) y N-hidroxisuccinamida (21,21 mg, 0,184 mmol) en CH₂Cl₂ (2,3 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con agua (1 x 15 mL) y salmuera (1 x 15 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, CH₃CN/H₂O, gradiente, entre el 35 % y el 55 %). Se combinaron fracciones que contenían el producto y se liofilizaron para obtener 6-((2-((2-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahydro-6H-

benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-6-oxohexanoatode 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, compuesto **14** como un sólido esponjoso blanco (8 mg, el 31 % de rendimiento). LCMS = 5,867 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1104,7 (M+H).

5

Ejemplo 2. Síntesis de 4-((2-((2-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)carbamoil)ciclohexan-carboxilato de (1r,4r)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, (compuesto **23**)

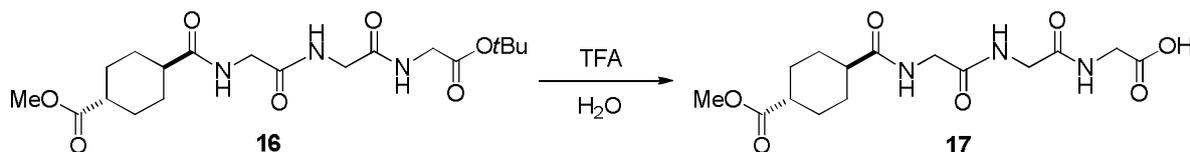
10



Etap 1: Se disolvieron amina compuesto **4** (200 mg, 0,815 mmol) y monometiléster de ácido 1,4-*trans*-ciclohexandicarboxílico compuesto **15** (182 mg, 0,978 mmol) en DMF (2,72 mL). Se agregaron EDC-HCl (188 mg, 0,978 mmol) y HOBT (125 mg, 0,815 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (285 μ L, 1,631 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con NH₄Cl sat., NaHCO₃ sat., salmuera y agua. La capa orgánica se secó en Na₂SO₄ y se concentró hasta un residuo pegajoso. Se agregó CH₃CN (15 mL) al residuo y se concentró. Esto se repitió 2 veces más para obtener el compuesto **16** como un polvo blanco seco (300 mg, el 85 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 8,16 (t, 1H, *J* = 5,9 Hz), 8,04 (dt, 2H, *J* = 5,6, 14,8 Hz), 3,74-3,69 (m, 6H), 3,59 (s, 3H), 2,31-2,25 (m, 1H), 2,20-2,13 (m, 1H), 1,94-1,91 (m, 2H), 1,82-1,79 (m, 2H), 1,41 (s, 9H), 1,34 (d, 3H, *J* = 11,7 Hz).

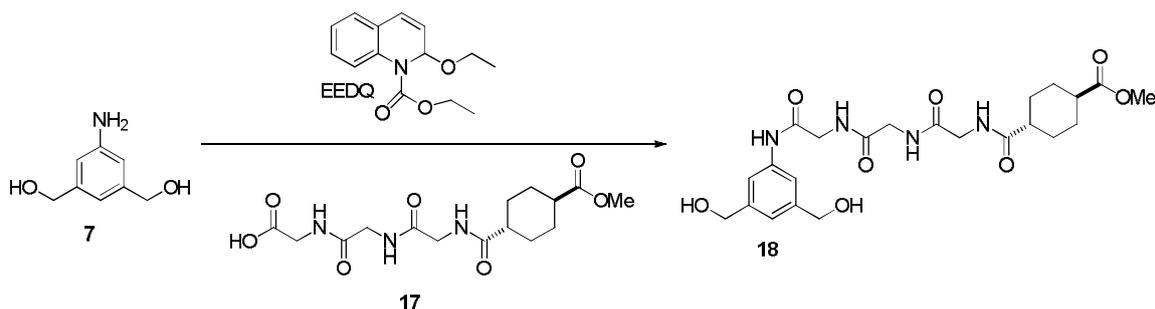
15

20



Etap 2: Se agregaron TFA (1,40 mL, 18,14 mmol) y agua DI (67,8 μ L) al compuesto puro **16** (300 mg, 0,726 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. Se agregó CH₃CN (20 mL) a la mezcla de reacción y se concentró. Esto se repitió dos veces más para obtener el compuesto **17** como un sólido blanco (230 mg, el 89% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 8,16-8,13 (m, 1H), 8,07-8,01 (m, 2H), 3,76-3,73 (m, 4H), 3,70 (bd, 2H, *J* = 5,1 Hz), 3,59 (s, 3H), 2,31-2,25 (m, 1H), 2,19-2,14 (m, 1H), 1,94-1,91 (m, 2H), 1,82-1,79 (m, 2H), 1,42-1,26 (m, 4H).

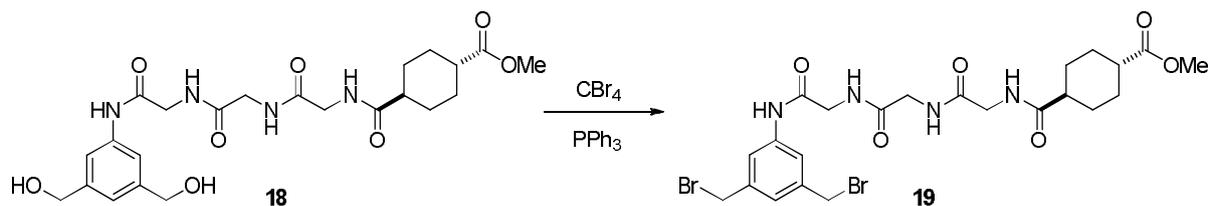
30



Etap 3: Se suspendieron anilina compuesto **7** (135 mg, 0,881 mmol) y ácido compuesto **17** (331 mg, 0,925 mmol) en CH₂Cl₂/MeOH (2,9 mL/1,5 mL) a temperatura ambiente. Se agregó EEDQ (436 mg, 1,763 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se concentró y el residuo se suspendió en EtOAc (15 mL) y se filtró. Los sólidos se lavaron con EtOAc (2 x 15 mL) y se secó al vacío/N₂ para obtener el compuesto **18** como un sólido blanco (330 mg, el 61% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 9,73 (s, 1H), 8,18 (dt, 2H, *J* = 6,0, 19,2 Hz), 8,09-8,01 (m, 2H), 7,45 (s, 2H), 6,96 (s, 1H), 5,17 (t, 2H, *J* = 5,7 Hz), 4,45 (d, 4H, *J* = 5,6 Hz), 3,88-3,84 (m, 3H), 3,77-3,69 (m, 8H), 3,63 (s, 2H), 3,59 (s, 6H), 2,30-2,22 (m, 2H), 2,19-2,13 (m, 2H), 1,94-1,90 (m, 4H), 1,82-1,78 (m, 4H), 1,41-1,26 (m, 8H).

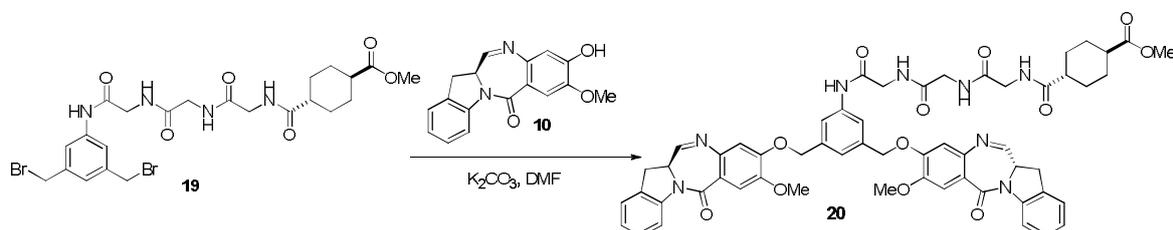
35

40



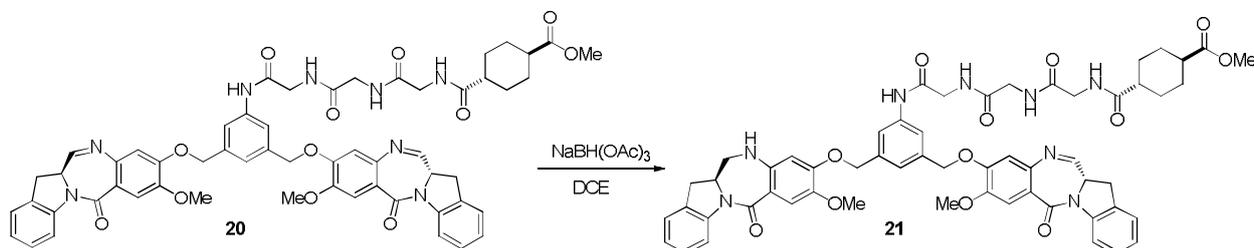
5 **Etapa 4:** Se disolvieron el compuesto **18** (330 mg, 0,536 mmol) y CBr_4 (533 mg, 1,608 mmol) en DMF (5,36 mL). Se agregó PPh_3 (422 mg, 1,608 mmol) a la mezcla de reacción, momento en el que la reacción se puso amarilla con una exotermia leve. La reacción se agitó en Ar durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice ($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el compuesto **19** como un sólido blanco (234 mg, el 64% de rendimiento). LCMS = 4,453 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI^+): 617,10 (M+H).

10



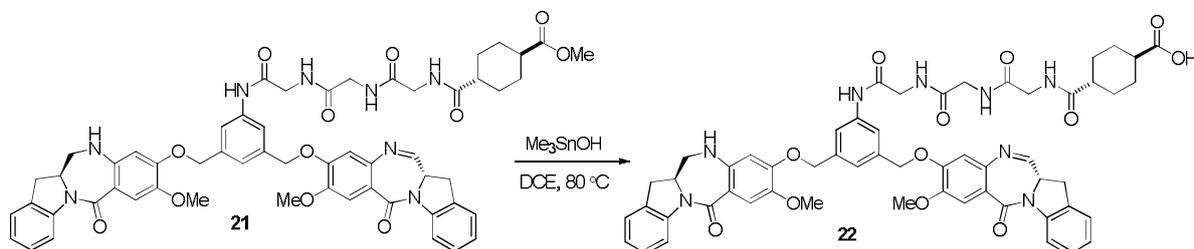
15 **Etapa 5:** Se preparó el compuesto **20** de forma similar al compuesto **11** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **20** como un sólido amarillo después de la purificación (264 mg, el 60 % de rendimiento). LCMS = 4,831 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI^+): 1045,20 (M+H).

15



20 **Etapa 6:** Se preparó el compuesto **21** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **21** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (51 mg, el 31 % de rendimiento). LCMS = 5,127 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI^+): 1047,30 (M+H).

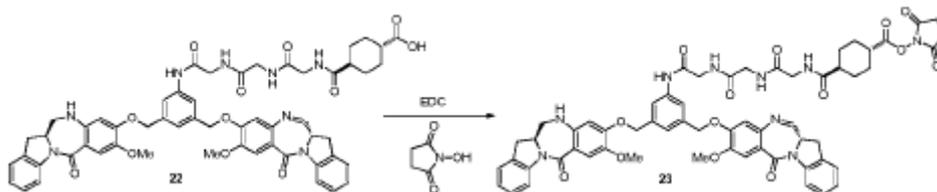
20



25 **Etapa 7:** Se disolvió metiléster compuesto **21** (48 mg, 0,046 mmol) en 1,2-dicloroetano (3,06 mL). Se agregó trimetilstananol (124 mg, 0,688 mmol) a la mezcla de reacción y se calentó a 80 °C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (15 mL). La capa acuosa se acidificó a pH ~ 4 con 1 M de HCl. La mezcla se extrajo con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1, 3 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na_2SO_4 y se concentraron. El residuo bruto se tapó a través de una almohadilla corta de gel de sílice y se enjuagó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (10:1, luego 5:1, 2 x 30 mL) y se concentró. Se obtuvo el ácido compuesto **22**

30

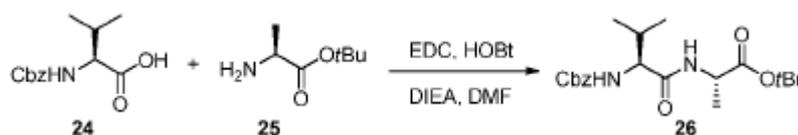
como un sólido amarillo y se usó en el siguiente paso sin purificación adicional (48 mg, el 100 % de rendimiento). LCMS = 5,338 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1033,7 (M+H).



5

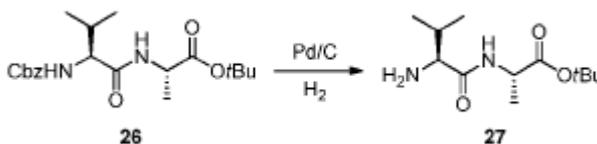
Etapa 8: Se preparó el compuesto **23** de forma similar al compuesto **13** en el ejemplo 1. 4-((2-((2-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)carbamoil)ciclohexanocarboxilato de (1*r*,4*r*)-2,5-dioxipirrolidin-1-ilo, se obtuvo el compuesto **23** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (8 mg, el 19 % de rendimiento). LCMS = 6,007 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1130,8 (M+H).

Ejemplo 3. Síntesis de 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxipirrolidin-1-ilo (compuesto **35**)



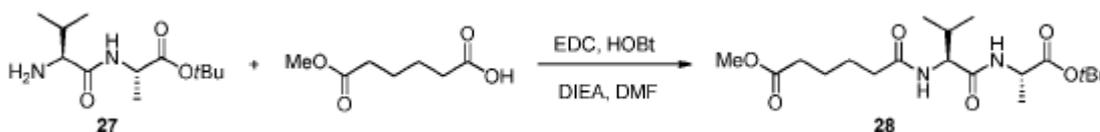
Etapa 1: Se disolvieron Z-Val-OH compuesto **24** (3,0 g, 11,94 mmol) y L-Ala-OfBu compuesto **25** (1,907 g, 13,13 mmol) en DMF (23,88 mL). Se agregaron EDC·HCl (2,52 g, 13,13 mmol) y HOBt (2,011 g, 13,13 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (4,59 mL, 26,3 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche en Ar. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con NaHCO₃ sat., NH₄Cl sat., agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 50%) para obtener el compuesto **26** como un sólido blanco (3,68 g, el 81 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,39-7,29 (m, 5H), 6,29 (bd, 1H, *J* = 6,9 Hz), 5,34 (bd, 1H, *J* = 8,4 Hz), 5,11 (s, 2H), 4,45 (p, 1H, *J* = 7,2 Hz), 4,02-3,98 (m, 1H), 2,18-2,09 (m, 1H), 1,56 (s, 9H), 1,37 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 0,98 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,93 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz). LCMS = 5,571 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 323,25 (M+H).

30

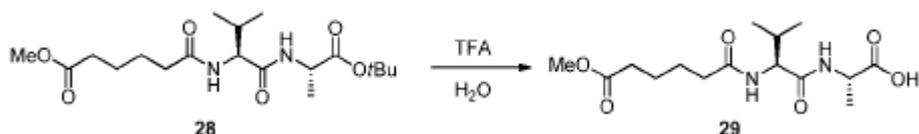


Etapa 2: Se disolvió el compuesto **26** (3,68 g, 9,72 mmol) en MeOH (30,9 mL) y agua (1,543 mL). La solución se purgó con Ar y se desgasificó durante 5 min. Se agregó lentamente Pd/C (10 %, húmedo, 0,517 g) a la mezcla de reacción. Luego se burbujeó H₂ durante un minuto. Se interrumpió el burbujeo y la reacción se agitó en un balón de H₂ durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite y la torta del filtro se lavó la torta con MeOH (30 mL) y se concentró para obtener el compuesto **27** como un sólido blanco (2,35 g, el 99 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,79-7,77 (m, 1H), 4,50 (p, 1H, *J* = 7,3 Hz), 3,27 (d, 1H, *J* = 3,9 Hz), 2,34-2,26 (m, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,40 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,01 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 0,86 (d, 3H, *J* = 6,9 Hz).

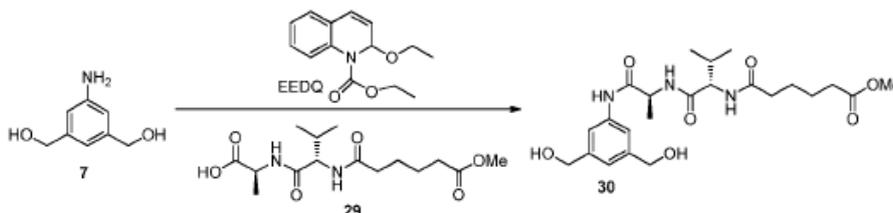
40



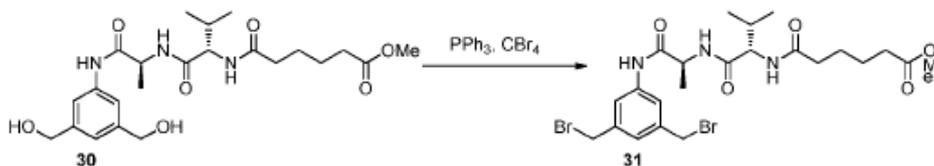
5 **Etapa 3:** Se disolvieron amina compuesto **27** (2,35 g, 9,62 mmol) y monometiladipato (1,69 g, 10,58 mmol) en DMF (32,1 mL). Se agregaron EDC·HCl (1,94 g, 10,10 mmol) y HOBT (1,47 g, 9,62 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (3,36 mL, 19,24 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (20 mL, 5:1) y se lavó con NH₄Cl sat., NaHCO₃ sat., agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 50%) para obtener el compuesto **28** como un sólido blanco (2,77 g, el 75% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6,29 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 6,12 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz), 4,43(p, 1H, *J* = 7,2 Hz), 4,27 (dd, 1H, *J* = 6,4, 8,6 Hz), 3,66 (s, 3H), 2,35-2,31 (m, 2H), 2,26-2,23 (m, 2H), 2,12-2,03 (m, 1H), 1,70-1,63 (m, 4H), 1,46 (s, 9H), 1,36 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 0,95 (t evidente, 6H, *J* = 6,6 Hz).



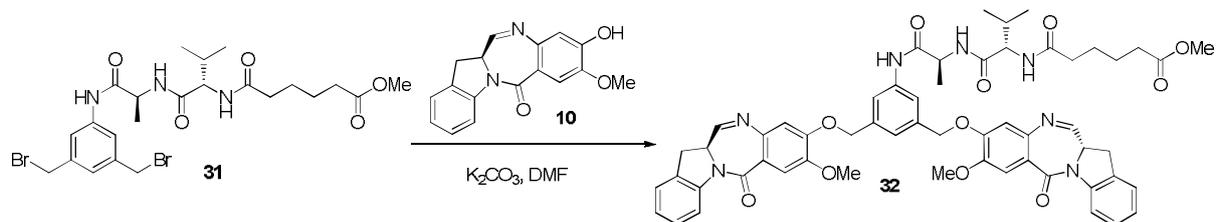
15 **Etapa 4:** Se agregaron TFA (8,28 mL, 108,0 mmol) y agua (0,56 mL) al compuesto puro **28** (2,77 g, 7,17 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 2,5 h. Se agregó CH₃CN (30 mL) a la mezcla de reacción y se concentró. Esto se repitió 2 veces más para obtener el compuesto **29** como un sólido amarillo pálido (2,0 g, el 84% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8,11 (bs, 1H), 7,29 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 7,14 (d, 1H, 6,8 Hz), 4,58 (p, 1H, *J* = 7,1 Hz), 4,37 (t, 1H, *J* = 8,7 Hz), 3,68 (s, 3H), 2,37-2,32 (m, 4H), 2,03-1,99 (m, 2H), 1,69-1,63 (m, 4H), 1,49 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 0,97 (d, 3H, *J* = 4,8 Hz), 0,96 (d, 3H, *J* = 4,8 Hz).



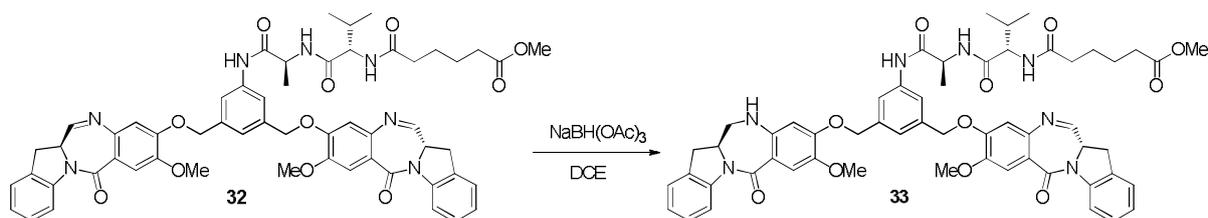
25 **Etapa 5:** Se suspendieron anilina compuesto **7** (150 mg, 0,98 mmol) y ácido compuesto **29** (340 mg, 1,03 mmol) en CH₂Cl₂/MeOH (3,26 mL, 1,62 mL) a temperatura ambiente. Se agregó EEDQ (484 mg, 1,96 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se concentró y el residuo se suspendió en EtOAc/Et₂O (15 mL, 15 mL) y se filtró. Los sólidos se lavaron con Et₂O (2 x 15 mL) y se secó al vacío/N₂ para obtener el compuesto **30** como un sólido blanco (150 mg, el 33% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,61 (s, 2H), 7,47 (d, 1H, *J* = 7,1 Hz), 7,14 (s, 1H), 6,64 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 4,82-4,75 (m, 1H), 4,45-4,40 (m, 4H), 3,64 (s, 3H), 2,36-2,27 (m, 4H), 2,16-2,07 (m, 1H), 1,68-1,59 (m, 4H), 1,47 (d, 3H, *J* = 7,0 Hz), 0,98 (d, 3H, *J* = 3,6 Hz), 0,95 (d, 3H, *J* = 4,8 Hz). LCMS = 3,073 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 466,25 (M+H).



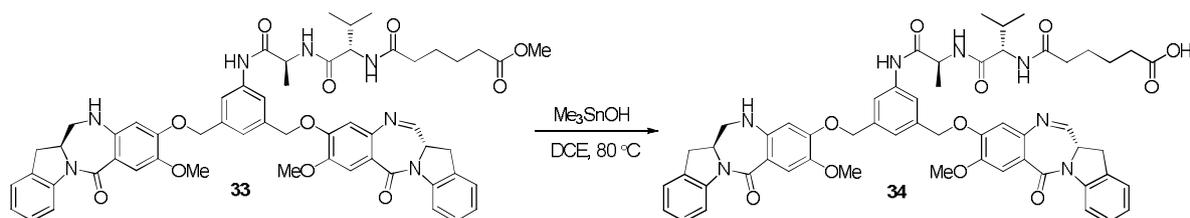
35 **Etapa 6:** Se disolvieron diol compuesto **30** (150 mg, 0,322 mmol) y CBr₄ (321 mg, 0,967 mmol) en DMF (3222 μl). Se agregó PPh₃ (254 mg, 0,967 mmol) a la mezcla de reacción, momento en el que la reacción se puso roja-rosa con una exotermia leve. La reacción se agitó en Ar durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 100%) para obtener el compuesto **31** como un sólido blanquecino (473 mg, el 75% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,19 (d, 1H, *J* = 6,6 Hz), 7,85 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz), 7,64 (s, 2H), 7,21 (s, 1H), 4,68 (s, 3H), 4,37 (p, 1H, *J* = 7,0 Hz), 4,18 (dd, 1H, *J* = 7,2, 8,4 Hz), 3,58 (s, 3H), 2,32-2,29 (m, 2H), 2,33-2,12 (m, 2H), 2,01-1,91 (m, 1H), 1,53-1,49 (m, 4H), 1,31 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 0,89 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,85 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz). LCMS = 5,259 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 592,05 (M+H).



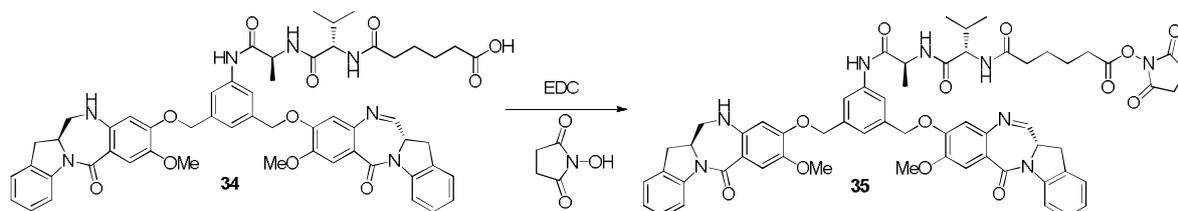
5 **Etapa 7:** Se preparó el compuesto **32** de forma similar al compuesto **11** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **32** como un sólido amarillo después de la purificación (162 mg, el 57% de rendimiento, el 70 % de rendimiento). LCMS = 6,461 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1018,7 (M+H).



10 **Etapa 8:** Se preparó el compuesto **33** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **33** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (40 mg, el 31 % de rendimiento). LCMS = 5,528 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 1020,30 (M+H).

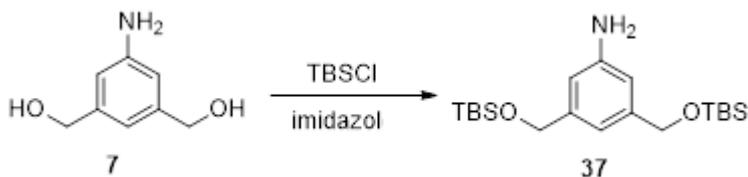


15 **Etapa 9:** Se preparó el compuesto **34** de forma similar al compuesto **22** en el ejemplo 2. Se obtuvo el compuesto **34** como un sólido amarillo después de tapón de sílice (38 mg, el 100% de rendimiento). LCMS = 5,211 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 1006,35 (M+H).

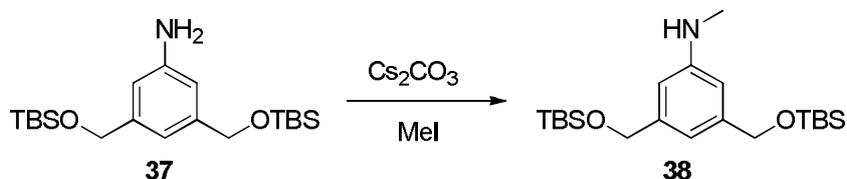


20 **Etapa 10:** Se preparó el compuesto **35** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12, 12a,13-tetrahydro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil) fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxipirrolidin-1-ilo, se obtuvo el compuesto **35** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (8 mg, el 20 % de rendimiento). LCMS = 7,031 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1103,7 (M+H).

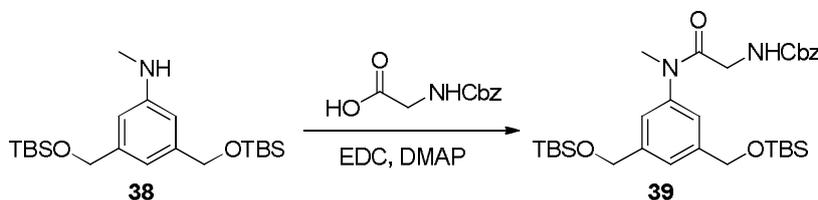
25 **Ejemplo 4.** Síntesis de 2-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahydro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-3,6,9,12-tetraoxo-2,5,8,11-tetraazaheptadecan-17-oato de 2,5-dioxipirrolidin-1-ilo (compuesto **49**)



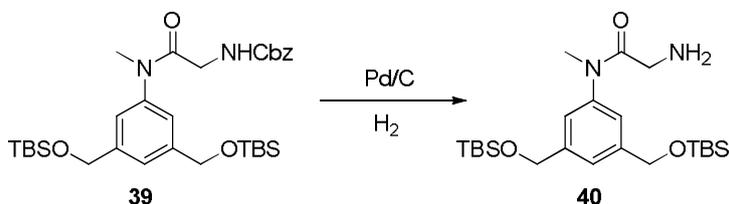
5 **Etapa 1:** Se disolvió (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol compuesto **7** (5,0 g, 32,6 mmol) en THF (65,3 mL). Se agregó TBSCl (12,30 g, 82 mmol) e imidazol (6,67 g, 98 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche en Ar. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NH_4Cl sat. y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 30%) para obtener el compuesto **37** como un aceite amarillo (13 g, el 100% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6,71 (s, 1H), 6,60 (s, 2H), 4,65 (s, 4H), 0,94 (s, 18 H), 0,10 (s, 12 H).



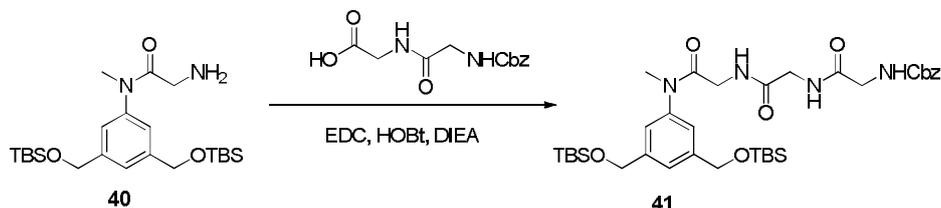
10 **Etapa 2:** Se agregó Cs_2CO_3 (8,54 g, 26,2 mmol) a una solución agitada de anilina compuesto **37** (10 g, 26,2 mmol) en DMF (52,4 mL). Se agregó metilioduro (1,474 mL, 23,58 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Se agregaron agua (10 mL) y EtOAc (30 mL) a la mezcla de reacción. Las capas se separaron y se extrajo con EtOAc (2x). Las capas orgánicas se lavaron con agua (4x), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el producto monometilado deseado compuesto **38** (3,8 g, el 37 % de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6,63 (s, 1H), 6,52 (s, 2H), 4,67 (s, 4H), 2,84 (s, 3H), 0,94 (s, 18H), 0,10 (s, 12H).



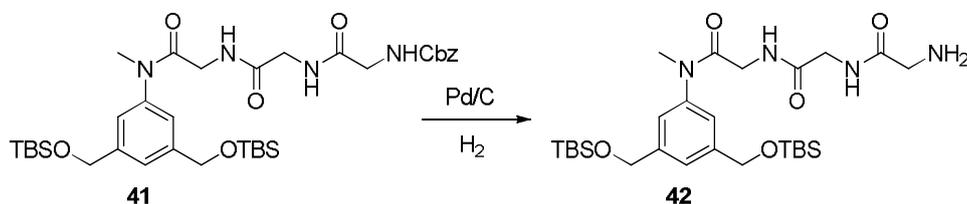
20 **Etapa 3:** Se disolvieron anilina compuesto **38** (1,0 g, 2,53 mmol) y Z-Gly-OH (0,582 g, 2,78 mmol) en DMF (8,42 mL). Se agregaron EDC·HCl (1,21 g, 6,32 mmol) y DMAP (340 mg, 2,78 mmol) a la mezcla de reacción y se calentó a 80 °C durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NaHCO_3 sat. y agua (2x), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 0 % y el 30% y el 100 %) para obtener el compuesto **39** como un sólido pegajoso amarillo (780 mg, el 53% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,27 (m, 6H), 6,90 (s, 2H), 4,94 (s, 2H), 4,62 (s, 4H), 3,58 (s, 2H), 3,16 (s, 3H), 0,83 (s, 18H), 0,00 (s, 12 H).



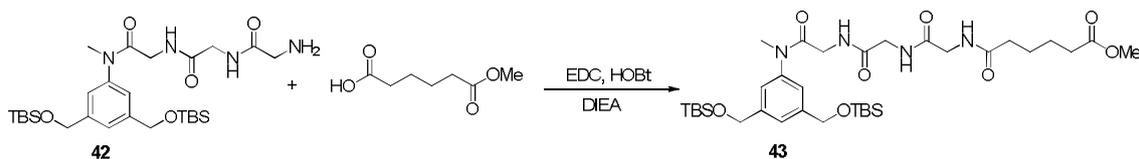
30 **Etapa 4:** Se disolvió el compuesto **39** (1,26 g, 2,147 mmol) en MeOH (6,82 mL) y THF (6,8 mL) y la solución se purgó con N_2 . Se agregó Pd/C (10 %, 0,228 g, 0,215 mmol) y se burbujeó H_2 durante unos minutos. La reacción se agitó en balón de H_2 durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se lavó con MeOH y se concentró para proporcionar el compuesto puro **40** (1 g, el 100 % de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7,41-7,30 (m, 2H), 7,27-7,21 (m, 1H), 7,06 (s, 2H), 4,65 (s, 4H), 3,23 (s, 3H), 3,12 (s, 2H), 0,82 (s, 18H), 0,00 (s, 12H).



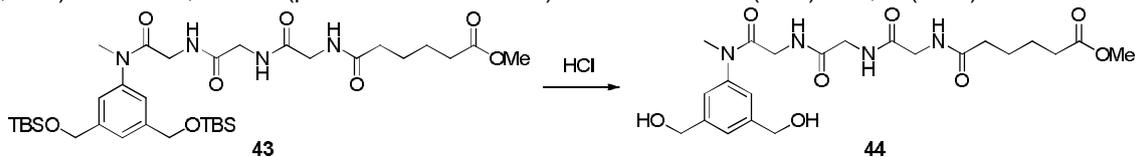
- 5 **Etapa 5:** Se disolvieron amina compuesto **40** (1,0 g, 1,988 mmol) y Z-Gly-Gly-Gly-OH (662 mg, 2,385 mmol) en DMF (6,63 mL). Se agregaron EDC·HCl (457 mg, 2,385 mmol) y HOBT (304 mg, 1,988 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (694 μ L, 3,98 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NaHCO_3 sat., salmuera y agua (2x). La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/DCM, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el compuesto **41** como una espuma pegajosa blanca (994 mg, el 71% de rendimiento).
- 10 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,38-7,32 (m, 7H), 7,31-7,27 (m, 2H), 7,01 (s, 2H), 5,13 (s, 2H), 4,74 (s, 4H), 3,97 (d, 2H, $J = 4,6$ Hz), 3,92 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz), 3,74 (d, 2H, $J = 3,7$ Hz), 3,27 (s, 3H), 0,94 (s, 18H), 0,11 (s, 12H).



- 15 **Etapa 6:** Se suspendió el compuesto **41** (994 mg, 1,418 mmol) en MeOH (6,65 mL) y agua (443 μ L) y se purgó con N_2 . Se agregó Pd/C (10 % húmedo, 302 mg, 0,284 mmol) y se burbujeó H_2 durante unos minutos. La reacción se agitó en balón de H_2 durante la noche. La solución se filtró a través de Celite, se lavó con MeOH y se concentró para obtener el compuesto puro **42** (725 mg, el 90 % de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,10-7,97 (m, 1H), 7,91-7,85 (m, 1H), 7,31-7,23 (m, 1H), 7,05 (s, 2H), 7,65 (s, 4H), 3,68-3,62 (m, 2H), 3,56-3,45 (m, 1H), 3,09 (s, 3H), 3,08-3,06 (m, 2H), 3,06-3,03 (m, 2H), 0,82 (s, 18H), 0,00 (s, 12H). LCMS = 5,574 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI^+): 567,30 (M+H).
- 20



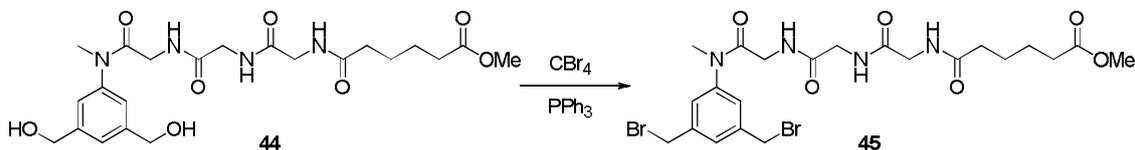
- 25 **Etapa 7:** Se disolvieron amina compuesto **42** (725 mg, 1,279 mmol) y monometiladipato (246 mg, 1,535 mmol) en DMF (6,5 mL). Se agregaron EDC·HCl (294 mg, 1,535 mmol) y HOBT (196 mg, 1,279 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (447 μ L, 2,56 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (20 mL) y se lavó con NH_4Cl sat., NaHCO_3 sat., agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/DCM, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el compuesto **43** (425 mg, el 33% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7,30 (s, 1H), 7,01 (s, 2H), 6,89-6,85 (m, 1H), 6,75-6,72 (m, 1H), 6,41-6,40 (m, 1H), 4,73 (s, 4H), 3,98-3,96 (m, 4H), 3,74 (bd, 2H, $J = 3,5$ Hz), 3,66 (s, 3H), 3,27 (s, 3H), 2,33 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz), 2,28 (t, 2H, $J = 6,5$ Hz), 0,94 (s, 18H), 0,11 (s, 12H). LCMS = 7,709 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI^+): 709,35 (M+H).
- 30



- 35 **Etapa 8:** Se disolvió el compuesto **43** (422 mg, 0,417 mmol) en THF (1,89 mL) y agua (189 μ L). Se agregó HCl (acuoso, 5 M) (833 μ L, 4,17 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. Se concentró la mezcla de reacción.

Se agregó ACN (~ 15 mL) al residuo y se concentró. Esto se repitió dos veces más para obtener el compuesto **44** como una espuma blanca (200 mg, el 100% de rendimiento). LCMS = 0,389 min (procedimiento de 8 min). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,09-8,04 (m, 2H), 7,93-7,90 (m, 1H), 7,30 (bs, 1H), 7,14 (s, 2H), 4,52 (s, 4H), 3,71-3,68 (m, 4H), 3,58 (s, 3H), 3,17 (bs, 3H), 2,22-2,18 (m, 2H), 2,15-2,12 (m, 2H), 1,53-1,47 (m, 4H).

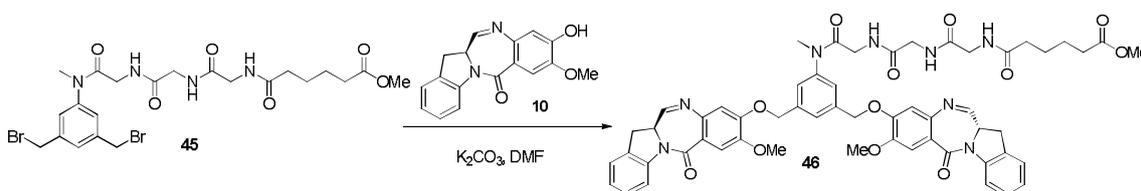
5



Etapa 9: Se disolvieron diol compuesto **44** (110 mg, 0,229 mmol) y CBr₄ (228 mg, 0,687 mmol) en DMF (2,29 mL). Se agregó PPh₃ (180 mg, 0,687 mmol) a la mezcla de reacción, momento en el que la reacción se puso roja-rosa con una exotermia leve. La reacción se agitó en Ar durante 6 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂/MeOH (10:1) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/CH₂Cl₂, gradiente, entre el 0 % y el 10%) para obtener el compuesto **45** (30 mg, el 22% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,46 (bs, 1H), 7,32-7,26 (m, 2H), 7,26-7,19 (m, 2H), 6,89-6,85 (m, 1H), 4,60 (d, 2H, *J* = 3,6 Hz), 4,48 (d, 2H, *J* = 3,9 Hz), 3,98 (d, 4H, *J* = 5,1 Hz), 3,76 (bs, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,30 (bs, 3H), 2,34 (bt, 2H, *J* = 6,7 Hz), 2,30 (bt, 2H, *J* = 6,6 Hz), 1,70-1,64 (m, 4H). LCMS = 4,326 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 605,10 (M+H).

10

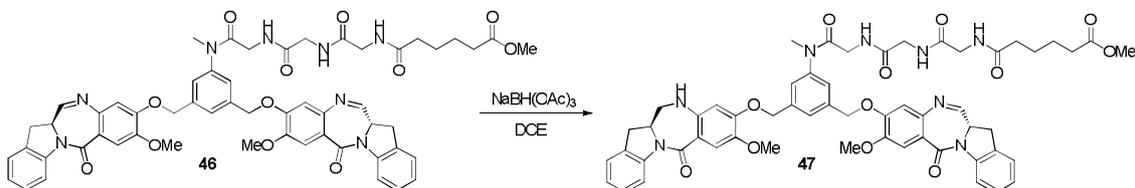
15



20

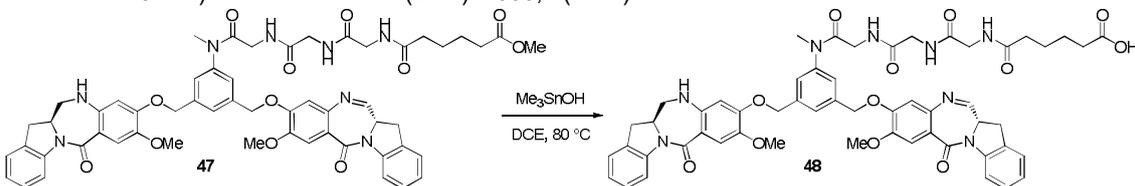
Etapa 10: Se preparó el compuesto **46** de forma similar al compuesto **11** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **46** como un sólido amarillo después de la purificación (40 mg, el 59% de rendimiento). LCMS = 4,751 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 1033,35 (M+H).

25

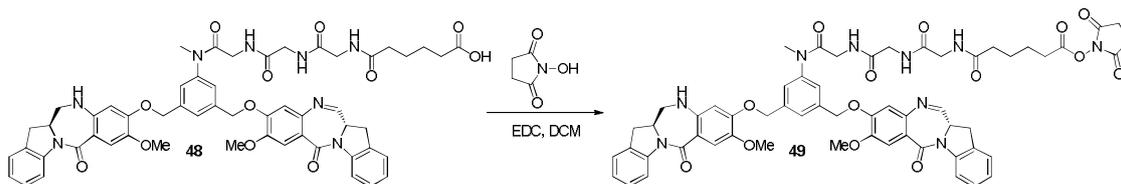


Etapa 11: Se preparó el compuesto **47** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **47** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (14 mg, el 32% de rendimiento). LCMS = 5,857 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1035,7 (M+H).

30

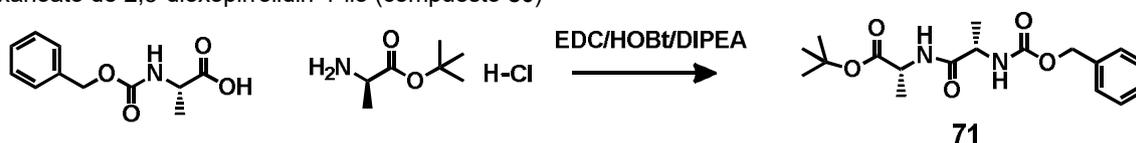


Etapa 12: Se preparó el compuesto **48** de forma similar a **22** en el ejemplo 2. Se obtuvo el compuesto **48** como un sólido amarillo después de tapón de sílice (7 mg, el 100% de rendimiento). LCMS = 4,817 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 1021,35 (M+H).



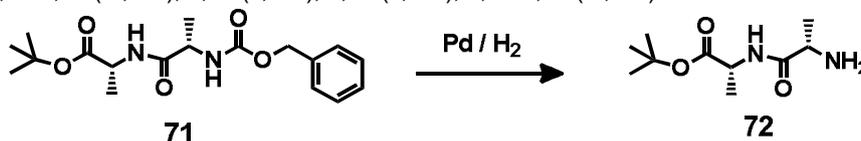
5 **Etapa 13:** Se preparó el compuesto **49** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. 2-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-3,6,9,12-tetraoxo-2,5,8,11-tetraazaheptadecan-17-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-il, se obtuvo el compuesto **49** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (6,5 mg, el 74 % de rendimiento). LCMS = 5,805 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1118,7 (M+H).

10 **Ejemplo 5.** Síntesis de 6-(((S)-1-(((R)-1-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (compuesto **80**)



15 **Etapa 1:** se disolvieron ácido (S)-2-(((benziloxy)carbonil)amino)propanoico (5 g, 22,40 mmol) y clorhidrato de 2-aminopropanoato (R)-terc-butilo (4,48 g, 24,64 mmol) en DMF anhidro (44,8 ml). Se agregaron EDC·HCl (4,72 g, 24,64 mmol), HOBt (3,43 g, 22,40 mmol) y luego DIPEA (9,75 ml, 56,0 mmol). La reacción se agitó en argón a temperatura ambiente, durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y luego se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado, agua y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró.

20 El aceite bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (hexanos/acetato de etilo) para proporcionar el compuesto bruto **71** (5,6 g, el 71 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,39-7,34 (m, 5H), 6,54 (s, 1H) 5,28 (s, 1H), 5,15 (s, 2H), 4,47-4,43 (m, 1H), 4,48 (s, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,42-1,37 (m, 6H).



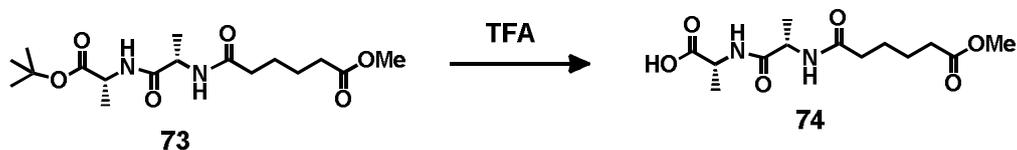
25 **Etapa 2:** Se disolvió el compuesto **71** (5,6 g, 15,98 mmol) en metanol (50,7 mL) y agua (2,54 mL). La solución se purgó con argón durante cinco minutos. Se agregó lentamente paladio en carbono (húmedo, 10 %) (0,850 g, 0,799 mmol). La reacción se agitó durante la noche en una atmósfera de hidrógeno. La solución se filtró a través de Celite, se enjuagó con metanol y se concentró. El residuo se destiló de forma azeotrópica con metanol y acetonitrilo y el aceite resultante se colocó directamente en el vacío alto para proporcionar el compuesto **72** (3,57 g, el 100 % de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente etapa. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,67 (s, 1H), 4,49-4,42 (m, 1H), 3,54-3,49 (m, 1H), 1,48 (s, 9H), 1,40 (d, 3H, J = 7,2 Hz), 1,36 (d, 3H, J = 6,8 Hz).



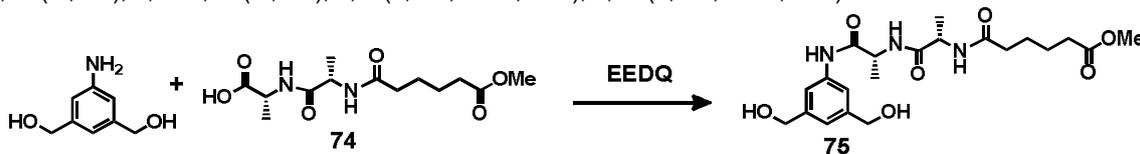
35 **Etapa 3:** el compuesto **72** (3,57 g, 16,51 mmol) y monometiladipato (2,69 mL, 18,16 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (55,0 mL). Se agregaron EDC·HCl (3,48 g, 18,16 mmol) y HOBt (2,53 g, 16,51 mmol) seguido de DIPEA (5,77 mL, 33,0 mmol). Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano/metanol (80 mL, 5:1) y se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado y salmuera. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se limpió. El compuesto se destiló de forma azeotrópica con acetonitrilo (5x), luego se bombeó en el vacío alto a 35 °C para proporcionar el compuesto **73** (5,91 g, el 100 % de rendimiento). El material bruto se tomó para la

40 etapa siguiente sin purificación. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6,67 (d, 1H, J = 6,8 Hz), 6,22 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 4,56-4,49 (m, 1H), 4,46-4,38 (m, 1H), 3,68 (s, 3H), 2,37-2,33 (m, 2H), 2,27-2,24 (m, 2H), 1,70 -1,68 (m, 4H), 1,47 (s, 9H), 1,40 (s,

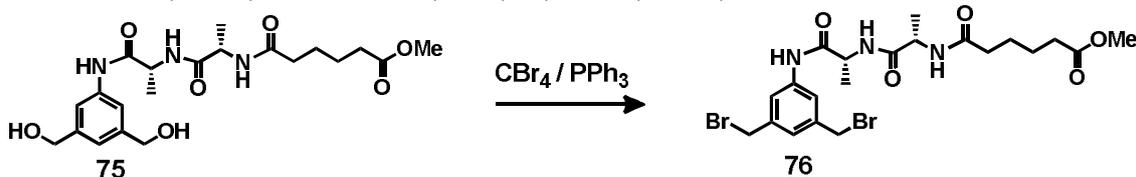
3H), 1,38 (s, 3H).



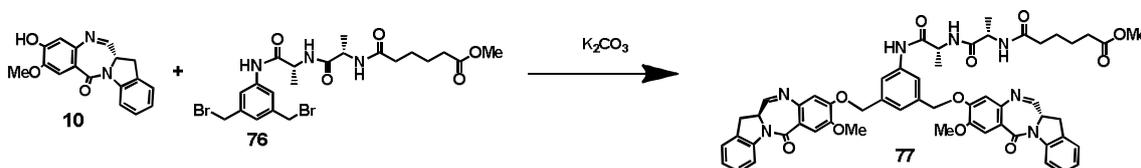
- 5 **Etapa 4:** El compuesto **73** (5,91 g, 16,5 mmol) se agitó en TFA (25,4 mL, 330 mmol) y agua desionizada (1,3 mL) a temperatura ambiente durante tres horas. La mezcla de reacción se concentró con acetonitrilo y se colocó en vacío alto hasta que se secó para proporcionar el compuesto bruto **74** (4,99 g, el 100 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,44 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 6,97 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 4,81-4,73 (m, 1H), 4,59-4,51 (m, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,39-2,32 (m, 2H), 2,31-2,23 (m, 2H), 1,70-1,61 (m, 4H), 1,48(d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,40 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz).



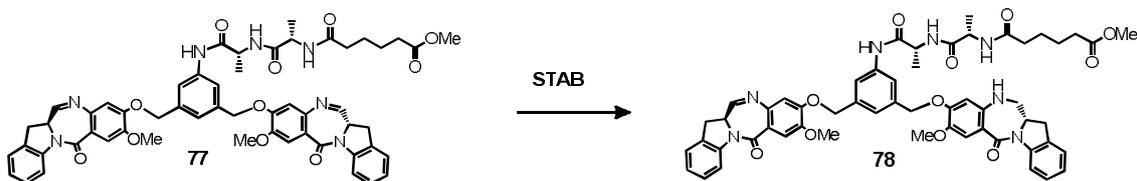
- 10 **Etapa 5:** El compuesto **74** (4,8 g, 15,88 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (101 mL) y metanol anhidro (50,4 mL). Se agregaron (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (2,316 g, 15,12 mmol) y EEDQ (7,48 g, 30,2 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente, durante la noche. El disolvente se limpió y el material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **75** (1,65 g, el 25 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,68 (s, 1H), 8,29 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 8,11 (d, 1H, *J* = 6,4 Hz), 7,52 (s, 2H), 6,97 (s, 1H), 5,15 (s, 2H), 4,45 (s, 4H), 4,39-4,32 (m, 1H), 4,28-4,21 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 2,30-2,27 (m, 2H), 2,17-2,13 (m, 2H), 1,54-1,45 (m, 4H) 1,30 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,20 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz). MS (*m/z*): 460,2 (M + Na)⁺.



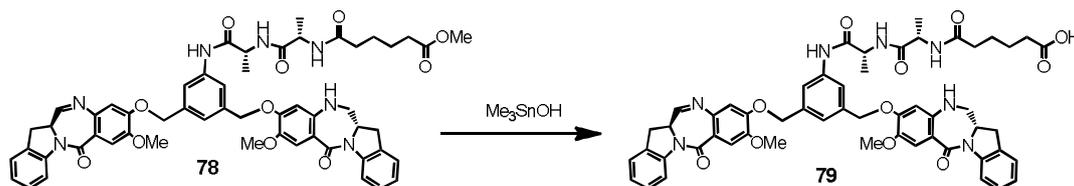
- 20 **Etapa 6:** El Compuesto **75** (0,486 g, 1,111 mmol) y tetrabromuro de carbono (1,105 g, 3,33 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (11,11 mL). Se agregó trifenilfosfina (0,874 g, 3,33 mmol) y la reacción se agitó en argón durante cuatro horas. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (10:1) y se lavó con agua y salmuera. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para proporcionar el compuesto **76** (250 mg, el 40 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,82 (s, 1H), 8,38 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 8,17 (d, 1H, *J* = 6,0 Hz), 7,76 (s, 2H), 7,22 (s, 1H), 4,66 (s, 4H), 4,38-4,31 (m, 1H), 4,25-4,19 (m, 1H), 3,56 (s, 3H), 2,30-2,27 (m, 2H), 2,18-2,15 (m, 2H), 1,53-1,51 (m, 4H), 1,32 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,21 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz).



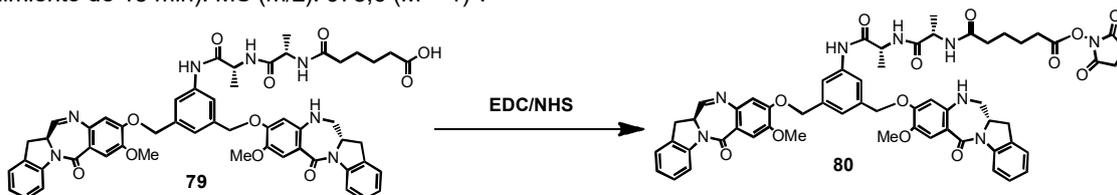
- 30 **Etapa 7:** Se preparó el compuesto **77** de forma similar a **11** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **77** (340 mg, el 60 % de rendimiento, el 77 % de pureza). LCMS = 5,87 min (procedimiento de 15 min). MS (*m/z*): 990,6 (M + 1)⁺.



- 5 **Etapa 8:** Se preparó el compuesto **78** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar el compuesto **78** (103 mg, el 30 % de rendimiento). LCMS = 6,65 min (procedimiento de 15 min). MS (m/z): 992,7 (M + 1)⁺.

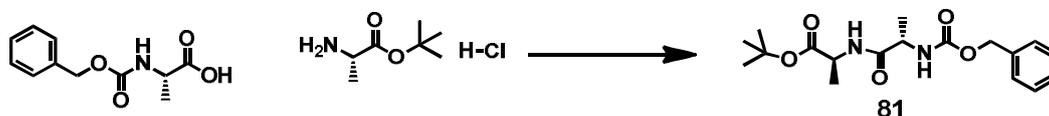


- 10 **Etapa 9:** Se preparó el compuesto **78** de forma similar a **22** en el ejemplo 2. El material bruto se pasó a través de un tapón de sílice para proporcionar el compuesto **79** (38 mg, el 55 % de rendimiento, el 75 % de pureza). LCMS = 5,83 min (procedimiento de 15 min). MS (m/z): 978,6 (M + 1)⁺.

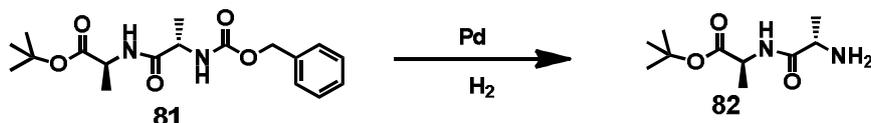


- 15 **Etapa 10:** Se preparó el compuesto **80** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar 6-(((S)-1-(((R)-1-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil) fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, compuesto **80** (6,5 mg, el 30 % de rendimiento). LCMS = 6,53 min
20 (procedimiento de 15 min). MS (m/z): 1075,7 (M + 1)⁺ y 1097,7(M + Na)⁺.

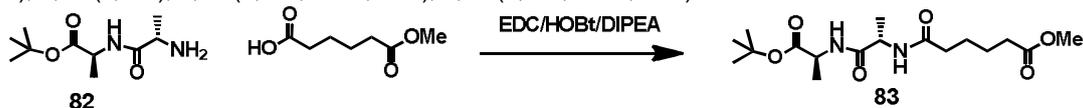
- Ejemplo 6.** Síntesis de 6-(((S)-1-(((S)-1-((3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil) fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, compuesto **90**
25



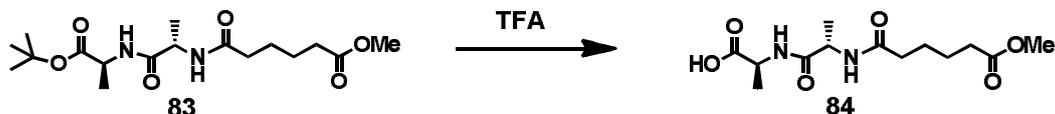
- 30 **Etapa 1:** Se disolvieron ácido (S)-2-(((benciloxi)carbonil)amino)propanoico (5 g, 22,40 mmol) y clorhidrato de 2-aminopropanoato (S)-*terc*-butilo (4,48 g, 24,64 mmol) en DMF anhidro (44,8 mL). Se agregaron EDC·HCl (4,72 g, 24,64 mmol), HOBt (3,43 g, 22,40 mmol) y DIPEA (9,75 mL, 56,0 mmol). La reacción se agitó en argón a temperatura ambiente, durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y luego se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado, agua y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró.
35 El aceite bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (hexanos/acetato de etilo) para proporcionar el compuesto bruto **81** (6,7 g, el 85% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,38-7,31 (m, 5H), 6,53-6,42 (m, 1H), 5,42-5,33 (m, 1H), 5,14 (s, 2H), 4,48-4,41 (m, 1H), 4,32-4,20 (m, 1H), 1,49 (s, 9H), 1,42 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 1,38 (d, 3H, J = 7,2 Hz).



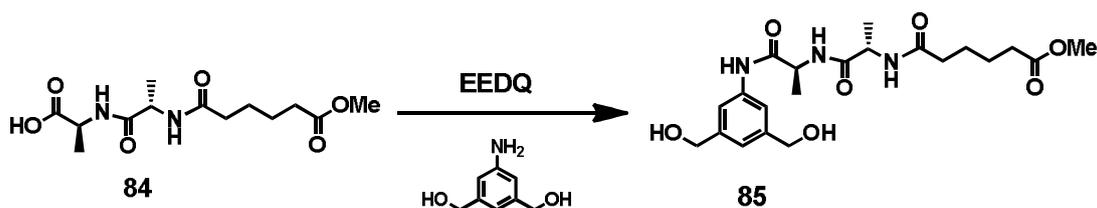
5 **Etapa 2:** Se disolvió el compuesto **81** (6,7 g, 19,12 mmol) en metanol (60,7 mL) y agua (3,03 mL). La solución se purgó con argón durante cinco minutos. Se agregó lentamente paladio en carbono (húmedo, 10 %) (1,017 g, 0,956 mmol). La reacción se agitó durante la noche en una atmósfera de hidrógeno. La solución se filtró a través de Celite, se enjuagó con metanol y se concentró. Se destiló de forma azeotrópica con metanol y acetonitrilo y el aceite resultante se colocó directamente en el vacío alto para proporcionar el compuesto **82** (4,02 g, el 97% de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente etapa. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,78-7,63 (m, 1H), 4,49-4,42 (m, 1H), 3,55-3,50 (m, 1H), 1,73 (s, 2H), 1,48 (s, 9H), 1,39 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,36 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz).



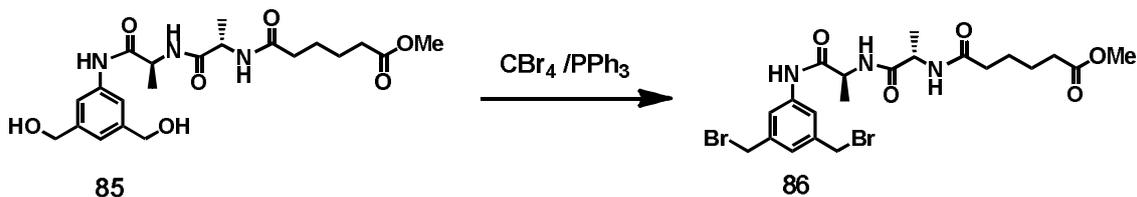
15 **Etapa 3:** El Compuesto **82** (4,02 g, 18,59 mmol) y monometiladipato (3,03 mL, 20,45 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (62,0 mL). Se agregaron EDC·HCl (3,92 g, 20,45 mmol), HOBt (2,85 g, 18,59 mmol) y DIPEA (6,49 mL, 37,2 mmol). Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano/metanol (150 mL, 5:1) y se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado y salmuera. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se limpió. El compuesto se destiló de forma azeotrópica con acetonitrilo (5x), luego se bombeó en el vacío alto a 35 °C para proporcionar el compuesto **83** (6,66 g, el 100 % de rendimiento). El material bruto se tomó para la etapa siguiente sin purificación. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6,75 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 6,44 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 4,52-4,44 (m, 1H), 4,43-4,36 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 2,35-2,29 (m, 2H), 2,25-2,18 (m, 2H), 1,71-1,60 (m, 4H), 1,45 (s, 9H), 1,36 (t, 6H, *J* = 6,0 Hz).



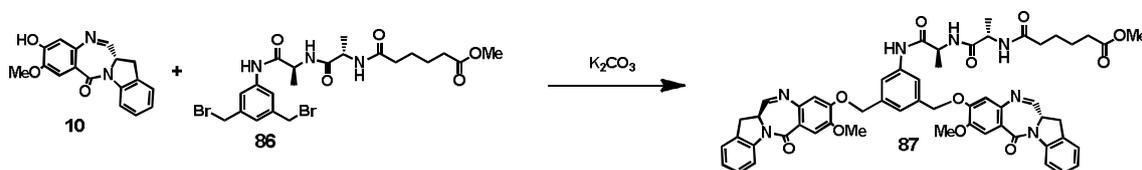
25 **Etapa 4:** El compuesto **83** (5,91 g, 16,5 mmol) se agitó en TFA (28,6 mL, 372 mmol) y agua desionizada (1,5 mL) a temperatura ambiente durante tres horas. La mezcla de reacción se concentró con acetonitrilo y se colocó en vacío alto para proporcionar el compuesto bruto **84** como un sólido pegajoso (5,88 g, el 100 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,21 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 6,81 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 4,69-4,60 (m, 1H), 4,59-4,51 (m, 1H), 3,69 (s, 3H), 2,40-2,33 (m, 2H), 2,31-2,24 (m, 2H), 1,72-1,63 (m, 4H), 1,51-1,45 (m, 3H), 1,42-1,37 (m, 3H).



35 **Etapa 5:** El compuesto **84** (5,6 g, 18,52 mmol) se disolvió en diclorometano anhidro (118 mL) y metanol anhidro (58,8 mL). Se agregaron (5-amino-1,3-fenileno)dimetanol (2,70 g, 17,64 mmol) y EEDQ (8,72 g, 35,3 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente, durante la noche. El disolvente se limpió y se agregó acetato de etilo. La suspensión resultante se filtró, se lavó con acetato de etilo y se secó al vacío/N₂ para proporcionar el compuesto **85** (2,79 g, el 36 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,82 (s, 1H), 8,05 (d, 1H, *J* = 9,2 Hz), 8,01 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz), 7,46 (s, 2H), 6,95 (s, 1H), 5,21-5,12 (m, 2H), 4,47-4,42 (m, 4H), 4,40-4,33 (m, 1H), 4,33-4,24 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,33-2,26 (m, 2H), 2,16-2,09 (m, 2H), 1,54-1,46 (m, 4H), 1,30 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,22 (d, 3H, *J* = 4,4 Hz).



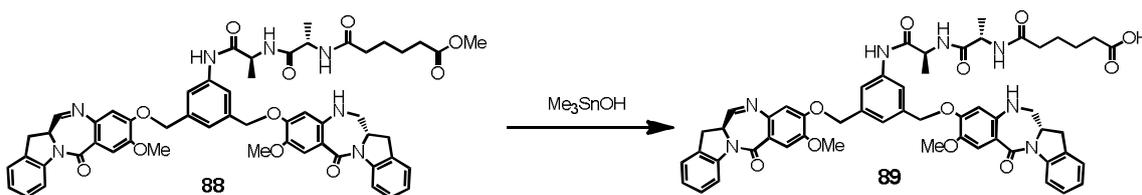
Etapa 6: El Compuesto **85** (0,52 g, 1,189 mmol) y tetrabromuro de carbono (1,183 g, 3,57 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (11,89 mL). Se agregó trifenilfosfina (0,935 g, 3,57 mmol) y la reacción se agitó en argón durante cuatro horas. La mezcla de reacción se diluyó con DCM/MeOH (10:1) y se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para proporcionar el compuesto **86** (262 mg, el 39% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10,01 (s, 1H), 8,11 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 8,03 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 7,67 (s, 2H), 7,21 (s, 1H), 4,70-4,64 (m, 4H), 4,40-4,32 (m, 1H), 4,31-4,23 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,34-2,26 (m, 2H), 2,18-2,10 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 4H), 1,31 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz), 1,21 (d, 3H, *J* = 7,2 Hz).



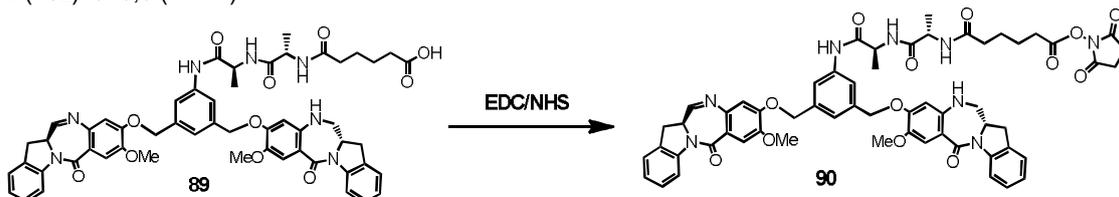
Etapa 7: Se preparó el compuesto **87** de forma similar al compuesto **11** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **87** (336 mg, el 74% de rendimiento). LCMS = 5,91 min (procedimiento de 15 min). MS (*m/z*): 990,6 (*M* + 1)⁺.



Etapa 8: Se preparó el compuesto **88** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar el compuesto **88** (85,5 mg, el 25% de rendimiento). LCMS = 6,64 min (procedimiento de 15 min). MS (*m/z*): 992,6 (*M* + 1)⁺.



Etapa 9: Se preparó el compuesto **89** de forma similar a **22** en el ejemplo 2. El material bruto se pasó a través de un tapón de sílice para proporcionar el compuesto **89** (48,8 mg, el 80% de rendimiento). LCMS = 5,89 min (procedimiento de 15 min). MS (*m/z*): 978,6 (*M* + 1)⁺.

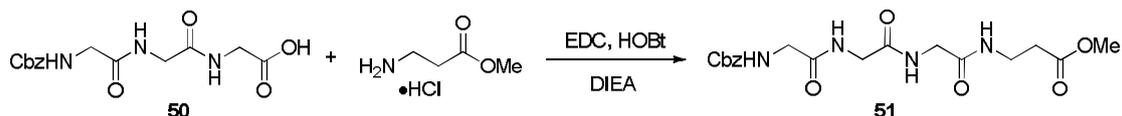


Etapa 10: Se preparó el compuesto **90** de forma similar a **14** en el ejemplo 1. El material bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar 6-(((S)-1-(((S)-1-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-

tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((R)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-6-oxohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, compuesto **90** (8,2 mg, el 30 % de rendimiento). LCMS = 6,64 min (procedimiento de 15 min). MS (m/z): 1075,4 (M + 1)⁺.

5

Ejemplo 7. Síntesis de 1-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-1,4,7,10-tetraoxo-2,5,8,11-tetraazatetradecan-14-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (compuesto **63**)

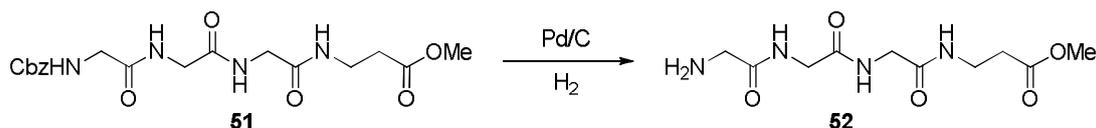


10

Etapa 1: Se disolvieron Z-Gly-Gly-GlyOH compuesto **50** (1,0 g, 3,09 mmol) y β -alanina·metiléster HCl (453 mg, 3,25 mmol) en DMF (12,37 mL). Se agregaron EDC·HCl (623 mg, 3,25 mmol) y HOBT (497 mg, 3,25 mmol) a la mezcla de reacción seguido de DIEA (1,08 mL, 6,19 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se formó un lote de precipitado blanco. La mezcla de reacción se diluyó con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5:1, 30 mL) y se lavó con NaHCO_3 sat., NH_4Cl sat. y salmuera. La capa orgánica se puso turbia. Se agregó EtOAc (15 mL) a la capa orgánica para precipitar el producto. La mezcla se filtró y el sólido se lavó con agua (10 mL) y CH_3CN (2 x 15 mL) para obtener el compuesto puro **51** como un polvo blanco (880 mg, el 70 % de rendimiento) sin purificación. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,16 (bt, 1H, $J = 5,4$ Hz), 8,11 (bt, 1H, $J = 5,6$ Hz), 7,88-7,85 (m, 1H), 7,49 (bt, 1H, $J = 5,5$ Hz), 7,40-7,31 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 3,74 (d, 2H, $J = 5,5$ Hz), 3,67 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz), 3,60 (s, 3H), 3,29 (q, 1H, $J = 6,4$ Hz), 2,47 (t, 3H, $J = 6,9$ Hz).

15

20

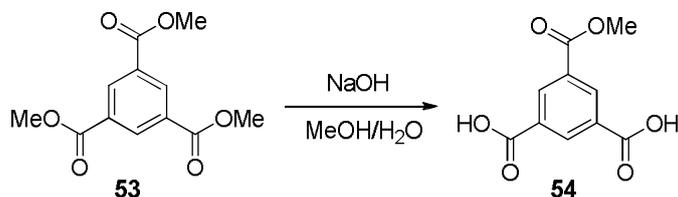


25

Etapa 2: Se disolvió el compuesto **51** (876 mg, 2,145 mmol) en MeOH (20,4 mL) y agua (1,02 mL) y se purgó con Ar. La solución se desgasificó durante 5 min. Se agregó lentamente Pd/C (10 %, húmedo con el 50 % de agua, 228 mg). Se burbujó H_2 a través de un balón durante un minuto. La reacción se agitó en un balón de H_2 durante la noche. Se agregó H_2O (~ 3 mL) a la mezcla de reacción para disolver todos los sólidos blancos formados. La solución luego se filtró a través de Celite y la torta del filtro se lavó con MeOH (30 mL) y se concentró. El residuo se disolvió en CH_3CN (20 mL) y se concentró. Esto se repitió 2 veces más. El sólido gomoso resultante se precipitó con la adición de CH_3CN (~ 15 mL). La suspensión blanca espesa se agitó durante 10 min, se filtró y se lavó con CH_3CN . El sólido se secó al vacío/ N_2 durante 1,5 h para obtener el compuesto **52** como un sólido blanco (450 mg, 76% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,18-8,12 (m, 2H), 7,88 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz), 3,75 (s, 2H), 3,65 (d, 2H, $J = 5,9$ Hz), 3,6 (s, 3H), 3,33-3,27 (m, 4H), 2,47 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz), 1,94 (bs, 1H).

30

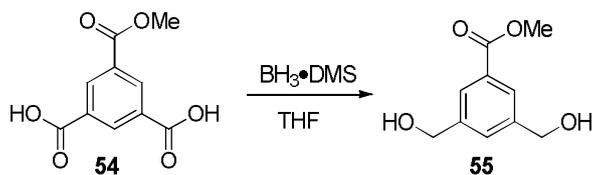
35



Etapa 3: Se agregó NaOH (1,665 g, 41,6 mmol) a una solución agitada de benceno-1,3,5-tricarboxilato de trimetilo compuesto **53** (5 g, 19,82 mmol) en MeOH (66,1 mL) y agua (13,22 mL). La mezcla de reacción se sometió a reflujo en Ar durante 3 h. Se formaron lotes de precipitado blanco. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con H_2O hasta que se disolvieron todos los sólidos. La mezcla se acidificó a pH ~ 2-3 con 5 N de HCl acuoso, se extrajo con EtOAc (3x), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. El producto bruto se disolvió en EtOAc caliente (50 mL) y se enfrió a temperatura ambiente lentamente. El precipitado se filtró (el precipitado era subproducto y no producto). El licor madre se concentró para obtener el compuesto **54** como un sólido blanco (3,45 g, el 78 % de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 13,62 (bs, 2H), 8,65 (s, 3H), 3,93 (s, 3H). LCMS = 3,209 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 244,90 (M+H).

40

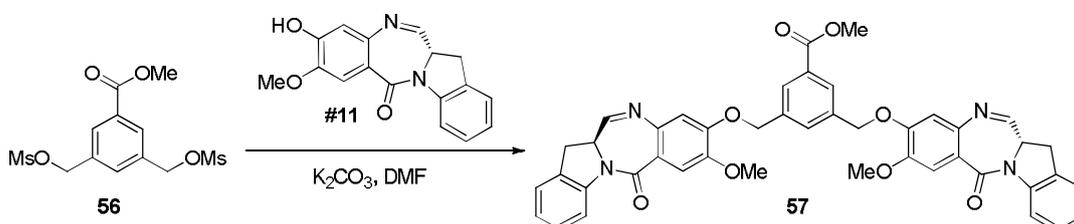
45



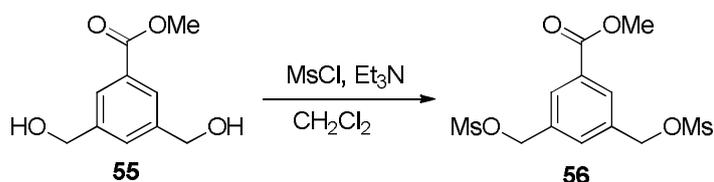
5 **Etapa 4:** Se disolvió diácido compuesto **54** (1,0 g, 4,46 mmol) en THF (17,84 mL). La solución se enfrió a 0 °C y se agregó lentamente $\text{BH}_3\cdot\text{DMS}$ (2 M en THF) (8,92 mL, 17,84 mmol) en Ar. La mezcla se agitó a 0 °C durante 5 min, luego se entibió a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se expuso al aire y se inactivó lentamente con MeOH, seguido de adición lenta de H_2O hasta que no se observó ninguna evolución del gas. La mezcla se extrajo con EtOAc (2x) y las capas se separaron. Las capas orgánicas se lavaron con ~ 3 % H_2O_2 acuoso, solución de ácido cítrico ac. y salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 20% y el 100%) para obtener diol compuesto **55** como un sólido blanco (385 mg, el 44% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7,81 (s, 2H), 7,52 (s, 1H), 5,33 (bs, 2H), 4,56 (s, 4H), 3,86 (s, 3H).



15 **Etapa 5:** Se disolvió diol compuesto **55** (320 mg, 1,631 mmol) en DCM (10,9 mL) en Ar. La solución se enfrió a -5 °C y se agregó TEA (0,568 mL, 4,08 mmol), seguido de una adición lenta de MsCl (0,292 mL, 3,75 mmol), momento en el que el color se volvió inmediatamente amarillo tras la adición, luego rojo oscuro/marrón. La mezcla de reacción se agitó a -5 °C en Ar durante 1,5 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua helada y se extrajo con EtOAc (2x). La capa orgánica se lavó con agua (2x), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró para obtener el dimesilato puro compuesto **56** (435 mg, el 76 % de rendimiento).



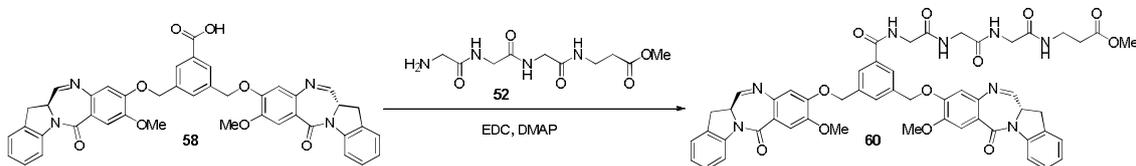
25 **Etapa 6:** Se disolvió dimesilato compuesto **56** (435 mg, 1,11 mmol) en DMF (5,55 mL). Se agregó monómero IGN compuesto **10** (719 mg, 2,444 mmol), seguido de K_2CO_3 (384 mg, 2,78 mmol) y se agitó a temperatura ambiente en Ar durante la noche. Se agregó agua (20 mL) para precipitar el producto. La suspensión se agitó durante 5 min, se filtró y se secó al vacío/ N_2 durante 1,5 h. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (EtOAc/hexanos, gradiente, entre el 50% y el 100%; luego el 5 % de MeOH/DCM) para obtener el compuesto **57** como un sólido amarillo (535 mg, el 64% de rendimiento, 2 etapas). LCMS = 6,973 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 749,4 (M+H).



35 **Etapa 7:** Se disolvió el compuesto **57** (100 mg, 0,134 mmol) en DCE (1,34 mL). Se agregó trimetilestananol (362 mg, 2,003 mmol) y se calentó a 80 °C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua. La capa acuosa se acidificó a pH ~4 con 1 M HCl y se extrajo con DCM (3x), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y

se concentró. El producto bruto se tapó a través de un tapón de sílice corto, se enjuagó con DCM/MeOH (10:1, 50 mL) y se concentró para obtener el compuesto **58** como un sólido amarillo pálido (100 mg, el 100 % de rendimiento). LCMS = 5,872 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 735,3 (M+H).

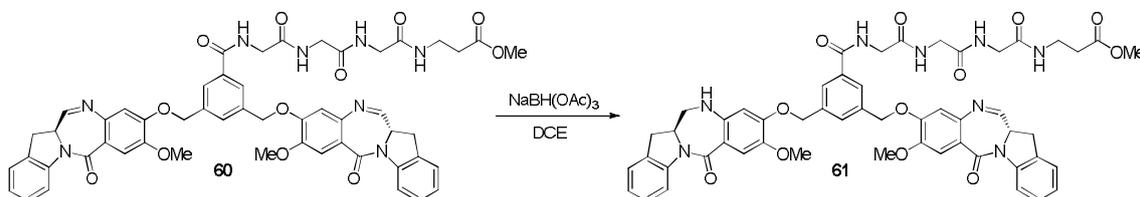
5



10

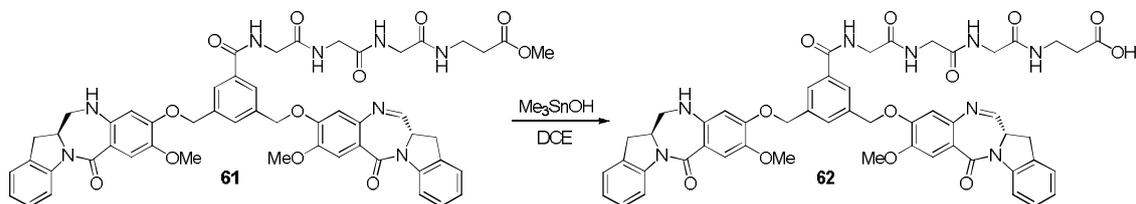
Etapa 8: Se disolvieron ácido compuesto **58** (80 mg, 0,087 mmol) y amina compuesto **52** (36 mg, 0,131 mmol) en DMF (871 μ L). Se agregaron EDC·HCl (25 mg, 0,131 mmol) y DMAP (10,6 mg, 0,087 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Se agregó agua (4 mL) para precipitar el producto. La suspensión se agitó durante 5 min, se filtró y se secó al vacío/N₂. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (MeOH/DCM, gradiente, entre el 0 % y el 20%) para obtener el compuesto **60** como un sólido amarillo (37 mg, el 43% de rendimiento). LCMS = 4,605 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 991,35 (M+H).

15



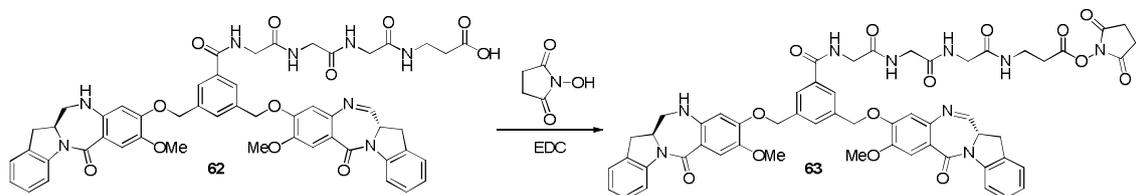
Etapa 9: Se preparó el compuesto **61** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **61** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (8 mg, el 25% de rendimiento). LCMS = 5,421 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 993,7 (M+H).

20



25

Etapa 10: Se preparó el compuesto **62** de forma similar al compuesto **22** en el ejemplo 2. Se obtuvo el compuesto bruto **62** como un sólido amarillo después del taponamiento a través de un tapón de sílice corto (13 mg, el 90 % de rendimiento). LCMS = 4,693 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI⁺): 979,35 (M+H).

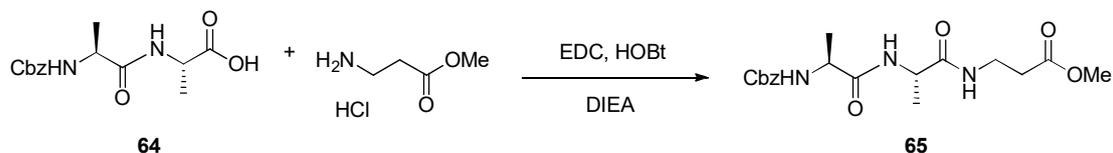


30

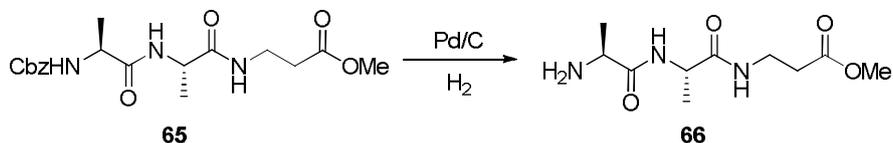
Etapa 11: Se preparó el compuesto **63** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. 1-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahydro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)-1,4,7,10-tetraoxo-2,5,8,11-tetraazatetradecan-14-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo, se obtuvo el compuesto **63** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (4 mg, el 31 % de rendimiento). LCMS = 5,495 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1076,7 (M+H).

35

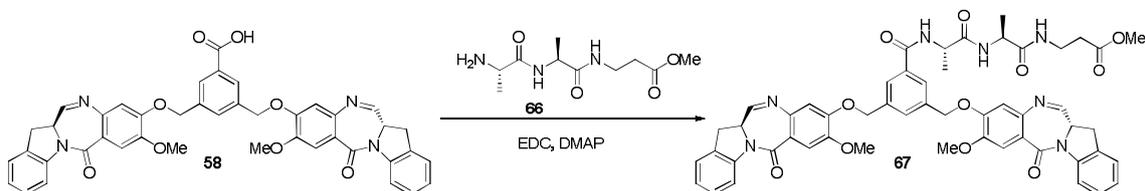
Ejemplo 8. Síntesis de 3-((S)-2-((S)-2-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahydro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)benzamido)propanamido)propanamido)propanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (compuesto **70**)



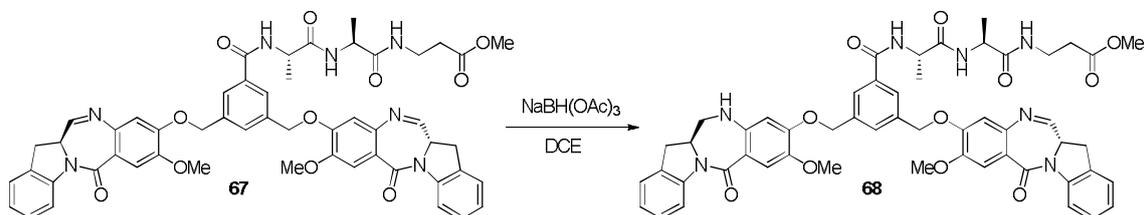
5 **Etap 1:** Se disolvieron Z-L-Ala-L-Ala-OH compuesto **64** (3,0 g, 10,19 mmol) y β -alanina-metiléster HCl (1,565 g, 11,21 mmol) en DMF (20,39 mL). Se agregaron EDC-HCl (2,150 g, 11,21 mmol) y HOBt (1,561 g, 10,19 mmol) seguido de DIPEA (4,44 mL, 25,5 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente en Ar durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NH_4Cl sat., NaHCO_3 sat. y salmuera. Se agregaron hexanos a la capa orgánica, momento en el que la solución se volvió turbia con precipitado. La suspensión se agitó durante unos minutos, se filtró y se lavó con EtOAc/hexanos (3:1). El sólido se secó al vacío/ N_2 para obtener el compuesto **65** como un sólido blanco (3,11 g, 80% de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 7,91 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz), 7,46 (d, 1H, $J = 7,4$ Hz), 6,39-7,30 (m, 5H), 5,02 (d, 2H, $J = 2,3$ Hz), 4,20 (p, 1H, $J = 7,2$ Hz), 4,04 (p, 1H, $J = 7,3$ Hz), 3,59 (s, 3H), 3,30-3,22 (m, 1H), 2,45 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz), 1,18 (t evidente, 6H, $J = 7,2$ Hz). LCMS = 3,942 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI^+): 380,10 (M+H).



15 **Etap 2:** Se disolvió el compuesto **65** (1,0 g, 2,64 mmol) en metanol (12,55 mL), agua (0,628 mL) y THF (2 mL). La solución se purgó con Ar y luego se desgasificó durante 5 min. Se agregó lentamente Pd/C (10 %, húmedo con el 50 % de agua, 0,140 g). Se burbujeó H_2 en la solución durante un minuto y la reacción se agitó adicionalmente en un balón de H_2 (1 atm) durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se lavó con MeOH (30 mL) y se concentró. Se agregó CH_3CN (15 mL) al residuo y se concentró. Esto se repitió 2 veces más para obtener el compuesto **66** como un sólido blanquecino (650 mg, el 100 % de rendimiento). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8,03-7,99 (m, 2H), 4,24-4,18 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,31-3,22 (m, 5H), 2,46 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz), 1,17 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz), 1,12 (d, 3H, $J = 6,9$ Hz).

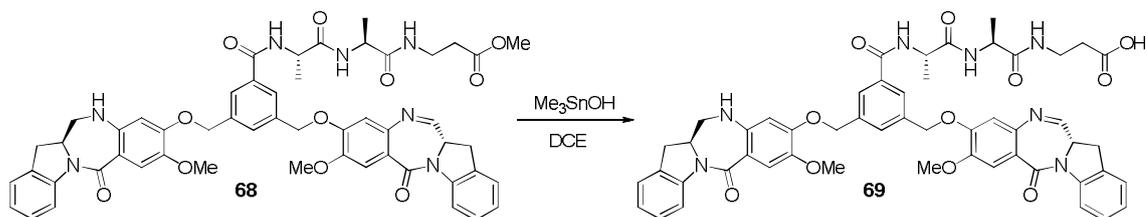


25 **Etap 3:** Se preparó el compuesto **67** de forma similar a **60** en el ejemplo 7. Se obtuvo el compuesto **67** como un sólido amarillo después de cromatografía en gel de sílice (69 mg, el 53 % de rendimiento). LCMS = 4,843 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI^+): 962,25 (M+H).

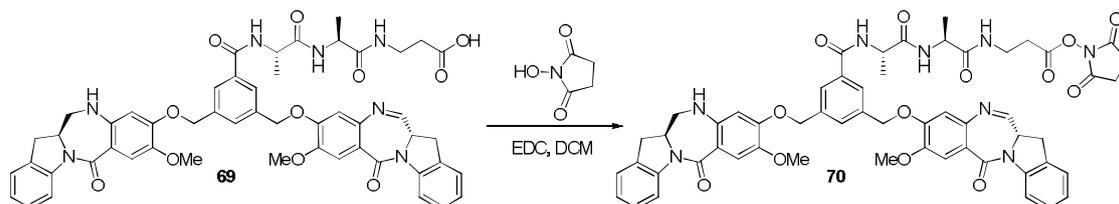


30 **Etap 4:** Se preparó el compuesto **68** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. Se obtuvo el compuesto **68** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (11,5 mg, el 19% de rendimiento). LCMS = 5,136 min (procedimiento de 8 min). Masa observada (ESI^+): 964,35 (M+H).

35

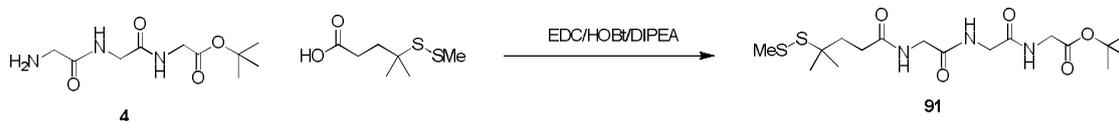


Etapa 5: Se preparó el compuesto **69** de forma similar al compuesto **22** en el ejemplo 2. Se obtuvo el compuesto bruto **69** como un sólido amarillo después del taponamiento a través de un tapón de sílice corto (13 mg, el 100% de rendimiento). LCMS = 5,640 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 950,4 (M+H).



Etapa 6: Se preparó el compuesto **70** de forma similar al compuesto **14** en el ejemplo 1. 2,5-dioxopirrolidin-1-il-3-(((S)-2-((S)-2-(3-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-12a,13-dihidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)benzamido)propanamido)propanamido)propanoato, se obtuvo el compuesto **70** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (5 mg, el 35 % de rendimiento). LCMS = 6,138 min (procedimiento de 15 min). Masa observada (ESI⁺): 1047,4 (M+H).

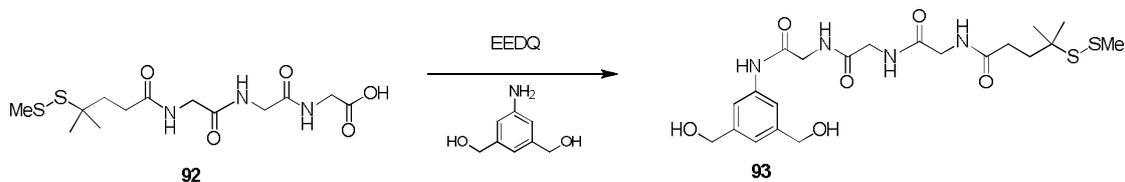
Ejemplo 9. Síntesis de ácido (12S,12aS)-9-((3-(2-(2-(2-(4-mercapto-4-metilpentanamido)acetamido)acetamido)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)encil)oxi)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-12-sulfónico (compuesto **98**)



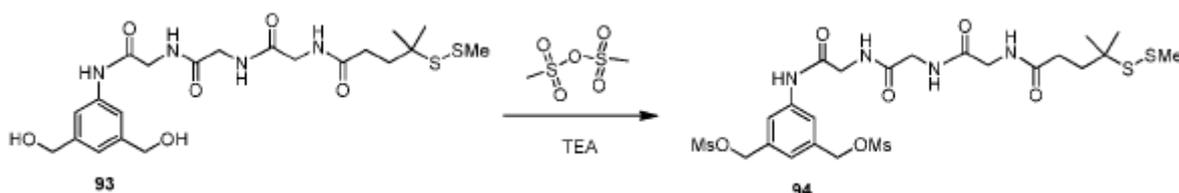
Etapa 1: se disolvieron el compuesto **4** (2,0 g, 8,15 mmol) y ácido 4-metil-4-(metildisulfanil)pentanoico (1,743 g, 8,97 mmol) en DMF anhidro (27,2 mL). Se agregaron EDC·HCl (1,719 g, 8,97 mmol) y HOBt (1,249 g, 8,15 mmol) seguido de DIPEA (2,85 mL, 16,31 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se diluyó con diclorometano/metanol (5:1) y se lavó con cloruro de amonio saturado, bicarbonato de sodio saturado y salmuera. Se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se limpió. El aceite bruto se destiló de forma azeotrópica con acetonitrilo (3x), luego se bombeó en vacío alto a 35 °C durante aproximadamente 1,5 horas para proporcionar el compuesto **91**, el cual se tomó sin purificación adicional (3,44 g, el 100 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,18-8,09 (m, 3H), 3,76-3,68 (m, 6H), 2,41 (s, 3H), 2,28-2,21 (m, 2H), 1,84-1,77 (m, 2H), 1,41 (s, 9H), 1,25 (s, 6H).



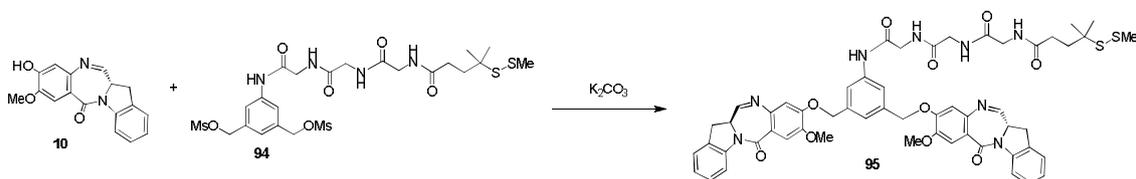
Etapa 2: El compuesto **91** (3,44 g, 8,15 mmol) se agitó en TFA (12,56 mL, 163 mmol) y agua desionizada (0,65 mL) a temperatura ambiente durante 3,5 horas. La reacción se diluyó con acetonitrilo y se evaporó hasta que se secó. El sólido bruto se suspendió con acetato de etilo, se filtró y se enjuagó con acetato de etilo y luego diclorometano/metanol (1:1) para proporcionar el compuesto **92** (2,98 g, el 100 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,19-8,08 (m, 3H), 3,80-3,68 (m, 6H), 2,41 (s, 3H), 2,28-2,20 (m, 2H), 1,85-1,76 (m, 2H), 1,25 (s, 6H).



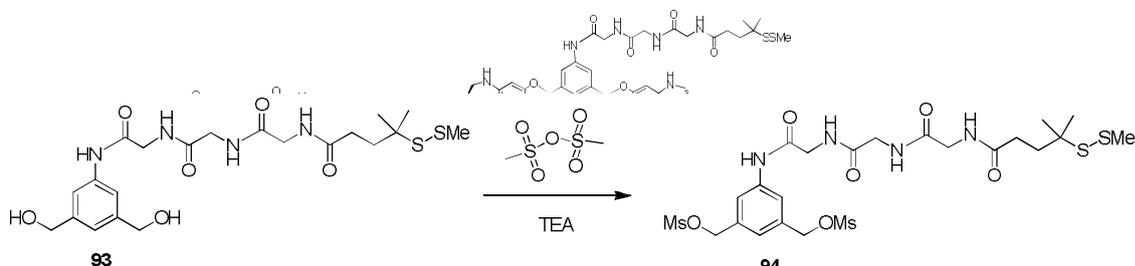
5 **Etapa 3:** El compuesto **92** (1,74 g, 4,76 mmol) se disolvió en diclorometano (30,2 mL) y metanol (15,11 mL). Se agregaron N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (2,243 g, 9,07 mmol) y (5-amino-1,3-fenilen)dimetanol (0,695 g, 4,53 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó y se agregó acetato de etilo. El sólido se filtró a través de Celite y se lavó con acetato de etilo y luego metanol. El filtrado se evaporó y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **93** (569 mg, el 25 % de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 9,74 (s, 1H), 8,24-8,15 (m, 3H), 7,45 (s, 2H), 6,96 (s, 1H), 5,17 (t, 2H, *J* = 5,6 Hz), 4,45 (d, 4H, *J* = 5,6 Hz), 3,87 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 3,77 (d, 2H, *J* = 6,0 Hz), 3,73 (d, 2H, *J* = 5,6 Hz), 2,40 (s, 3H), 2,28-2,21 (m, 2H), 1,83-1,76 (m, 2H), 1,24 (s, 6H).



15 **Etapa 4:** El Compuesto **93** (305 mg, 0,609 mmol) se suspendió en DCM anhidro (5,992 mL). Se agregó DMF anhidro hasta que la solución se volvió homogénea (~2,5 mL). La solución se enfrió a -10 °C en un baño de acetona/hielo seco. Se agregaron trietilamina (0,425 mL, 3,05 mmol), seguido de anhídrido metanosulfónico (274 mg, 1,523 mmol). La mezcla se agitó a -10 °C durante 1 hora. La reacción se inactivó con agua helada y se extrajo con acetato de etilo/metanol helado (20:1). La capa orgánica se lavó con agua helada, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró. El material bruto se secó en vacío alto para proporcionar el compuesto **94** (380 mg, el 95 % de rendimiento). LCMS = 4,2 min (procedimiento de 15 min). MS (*m/z*): 655,0 (*M*-1).

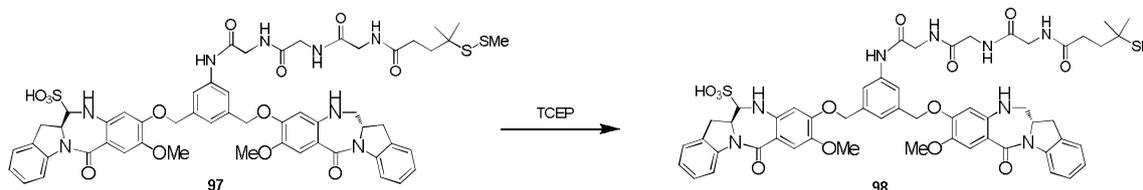


25 **Etapa 5:** Se preparó el compuesto **95** de forma similar al compuesto **57** en el ejemplo 7. El sólido bruto se disolvió en diclorometano/metanol (10:1), se lavó con agua y la orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se extrajo *in vacuo* y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (diclorometano/metanol) para proporcionar el compuesto **95** (445 mg, el 42% de pureza). LCMS = 6,64 min (procedimiento de 15 min). MS (*m/z*): 1053,4 (*M* + 1)⁺ y 1051,3 (*M* - 1).



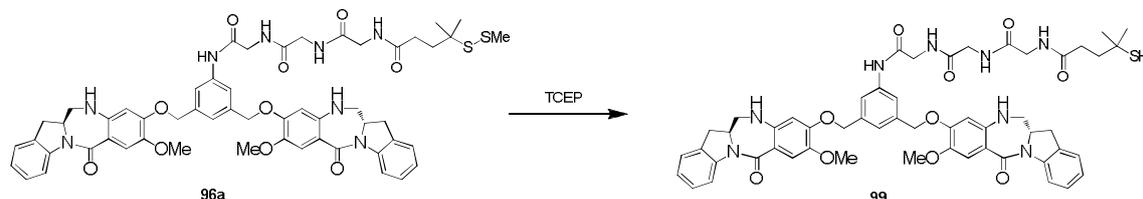
30 **Etapa 6:** Se disolvió el compuesto **95** (445 mg, 0,423 mmol) en 1,2-dicloroetano (2,82 mL). Se agitó triacetoxyborohidruro de sodio (80 mg, 0,359 mmol) a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con cloruro de amonio saturado. La capa orgánica se lavó con salmuera y se secó para proporcionar una mezcla

de los compuestos **95**, **96** y **96a** (496 mg). La mezcla bruta se disolvió en 2-propanol (39,17 mL) y agua (19,59 mL). Se agregó bisulfito de sodio (245 mg, 2,35 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3,5 horas. La mezcla se congeló y liofilizó para proporcionar un sólido blanco esponjoso que se purificó mediante RPHPLC (C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar el compuesto **97** (54 mg, el 10 % de rendimiento) y el compuesto **96a** (24 mg, el 5 % de rendimiento). LCMS (compuesto **97**) = 4,83 min (procedimiento de 15 min) y LCMS (compuesto **96a**) = 8,05 min (procedimiento de 15 min).



Etapa 7: a una solución agitada del compuesto **97** (54 mg, 0,047 mmol) en CH₃CN (3,85 mL) se agregó solución amortiguadora de TCEP/pH 6,5 reacción preparada (TCEP·HCl (46,7 mg), se disolvió en unas gotas de agua desionizada, seguido de goteo de bicarbonato de sodio saturado hasta pH ~ 6,5. La solución se diluyó con 0,55 mL de pH=6,5, 1 M de amortiguador de fosfato de sodio y metanol (2,75 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y luego se congeló y se liofilizó. El sólido se purificó mediante RPHPLC (C18, acetonitrilo/agua) para proporcionar ácido (12S,12aS)-9-((3-(2-(2-(2-(4-mercapto-4-metilpentanamido)acetamido) acetamido)acetamido)-5-(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4] diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)encil)oxi)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indole-12-sulfónico, compuesto **98** (2 mg, el 4 % de rendimiento). LCMS = 4,32 min (procedimiento de 15 min). MS (m/z): 1089,3 (M -1):

Ejemplo 10. Síntesis de N-(2-((2-((2-((3,5-bis(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)-4-mercapto-4-metilpentanamida (compuesto **99**)



Se preparó el compuesto **99** de forma similar al compuesto **98** en el ejemplo 9. N-(2-((2-((2-((3,5-bis(((S)-8-metoxi-6-oxo-11,12,12a,13-tetrahidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino[1,2-a]indol-9-il)oxi)metil)fenil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)amino)-2-oxoetil)-4-mercapto-4-metilpentanamida, se obtuvo el compuesto **99** como un sólido blanco después de la purificación de C18 (6,3 mg, el 27 % de rendimiento). LCMS = 7,26 min (procedimiento de 15 min). MS (m/z): 1033,5 (M +Na)⁺.

Ejemplo 11. Preparación de huMOV19-14

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 8 equivalentes molares compuesto **14** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (N,N-dimetilacetamida) se dejó conjugarse durante 6 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 μM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 20 horas a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 3,0 de moléculas de IGN91 unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el compuesto **14**, y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201.400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 90 % de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <0,1 % del compuesto no conjugado **14** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 0,78 mg/ml. Se encontró que el compuesto conjugado era >87 % intacto mediante

análisis de chip de gel. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7A.

Ejemplo 12. Preparación de huMOV19-sulfo-SPDB-98

- 5 Una mezcla in situ que contenía concentraciones finales de 3,9 mM del compuesto **98** y 3 mM de enlazador sulfo-SPDB en un DMA que contenía 10 mM de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) se incubó durante 60 min antes de agregar un exceso de 20 veces del compuesto resultante **98**-sulfo-SPDB-NHS a una reacción que contenía 4 mg/ml de anticuerpo huMOV19 en 15 mM de HEPES pH 8,5 (90:10 agua: DMA). La solución se dejó conjugar durante la noche a 25 °C.
- 10 Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 100 mM de glicina, 20 mM de arginina, 2% de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).
- 15 Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 3,7 de moléculas del compuesto **98** unidas por anticuerpo (mediante SEC utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el compuesto **98**, y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201.400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 99% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño) y una concentración de proteína final de 0,18 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7A.

Ejemplo 13. Preparación de huMOV19-35

- 25 Una reacción que contenía 2,5 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 5 equivalentes molares del compuesto **35**, (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 6 horas a 25 °C.
- 30 Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 8 horas a temperatura ambiente utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).
- 35 Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,9 de moléculas del compuesto **35** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.484\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para IGN128 y $\epsilon_{280} = 201.400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 97% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <1% del compuesto no conjugado **35** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,4 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7A.

Ejemplo 14. Preparación de huMOV19-63

- 45 Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 7 equivalentes molares del compuesto **63** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 6 horas a 25 °C.
- 50 Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 20 horas a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).
- 55 Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,7 de moléculas del compuesto **63** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para IGN131 y $\epsilon_{280} = 201.400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 99% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <0,1% del compuesto no conjugado **63** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,6 mg/ml. Se encontró que el compuesto conjugado era >90% intacto mediante análisis de chip de gel. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7B.

Ejemplo 15. Preparación de huMOV19-80

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 7 equivalentes molares del compuesto **80** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 6 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 20 horas a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,5 de moléculas del compuesto **80** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el compuesto **80** y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201.400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 99% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <0,1% del compuesto no conjugado **80** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 2,4 mg/ml. Se encontró que el compuesto conjugado era >90% intacto mediante análisis de chip de gel.

Ejemplo 16. Preparación de huMOV19-90

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 3,9 equivalentes molares del compuesto **90** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 95:5 DMA:50 mM de succinato pH 5,5 durante 4 horas a 25 °C) en 15 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se incubó durante 4 horas a 25 °C. Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 10 mM de succinato, 50 mM de cloruro de sodio, 8,5% p/v de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 4 horas a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 30.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía una concentración de proteína final de 1,8 mg/ml y un promedio de 2,7 de moléculas del compuesto **90** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para IGN152 y $\epsilon_{280} = 201.400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 98,3% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño); y <1,1% del compuesto no conjugado **90** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa). Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7B.

Ejemplo 17. Preparación de huMOV19-49

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 5 equivalentes molares del compuesto **49** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 10% v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 4 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 4 horas a temperatura ambiente utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,8 de moléculas del compuesto **49** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el compuesto **49** y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201.400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 94% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <0,1% del compuesto no conjugado **49** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,5 mg/ml. Se encontró que el compuesto conjugado era >95% intacto mediante análisis de chip de gel. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7C.

Ejemplo 18. Preparación de huMOV19-sulfo-SPDB-99

60

Una mezcla in situ que contenía concentraciones finales de 1,95 mM del compuesto **99** y 1,5 mM de enlazador sulfo-SPDB en DMA que contenía 10 mM de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) se incubó durante 20 min antes de la formación de casquetes con 4 mM de ácido maleimidopropiónico MPA. Un exceso de 6 veces del **99**-sulfo-SPDB-NHS resultante se agregó a una reacción que contenía 2,5 mg/ml de anticuerpo huMOV19 en 15 mM de HEPES pH 8,5 (82:18 agua: DMA). La solución se dejó conjugar durante la noche a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 20 mM de histidina, 50 mM de cloruro de sodio, 8,5% de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 1,6 de moléculas del compuesto **99** unidas por anticuerpo (mediante UV/Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330 \text{ nm}} = 15.484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30,115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el compuesto **99**, y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 201.400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 99% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño) y una concentración de proteína final de 0,59 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7C.

Ejemplo 19. Preparación de huMOV19-70

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 5 equivalentes molares del compuesto **70** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 10% v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 4 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 20 mM de histidina, 100 mM de arginina, 2% de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Después de la purificación, se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 18 horas a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 3,0 de moléculas del compuesto **70** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330 \text{ nm}} = 15.484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30.115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el compuesto **70** y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 201.400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 94% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <0,1% del compuesto no conjugado **70** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,3 mg/ml.

Ejemplo 20. Preparación de huMOV19-23

Una reacción que contenía 2,5 mg/mL de anticuerpo huMOV19 y 4 equivalentes molares del compuesto **23** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:agua) en 50 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) a pH 8,5 y el 15 % v/v codisolvente DMA (*N,N*-dimetilacetamida) se dejó conjugar durante 6 horas a 25 °C.

Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 250 mM de glicina, 10 mM de histidina, 1 % de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 8 horas a temperatura ambiente utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,8 de moléculas del compuesto **23** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330 \text{ nm}} = 15.484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30,115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el compuesto **23** y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 201.400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 98% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño), <3% del compuesto no conjugado **23** (mediante precipitación de acetona, análisis HPLC de fase inversa) y una concentración de proteína final de 1,3 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 7D.

Ejemplo 21. Ensayo de citometría de flujo para la afinidad de unión de los conjugados huMOV19-14, huMOV19-90 y huMOV19-107

Se diluyeron 100 µl/pocillo del conjugado huMOV19-14, huMOV19-90 o huMOV19-107 o el anticuerpo huMOV19 en

amortiguador FACS (1 % de BSA, 1x PBS) en una placa de 96 pocillos (Falcon, fondo redondo) en una concentración inicial de 3×10^{-8} M por duplicado y se diluyeron en serie 3 veces en amortiguador FACS a 4 °C. Se cultivaron células T47D (tumor de mama humano) en RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies), 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) y 0,2 IU de insulina bovina/ml (Sigma), se lavaron una vez en PBS y se retiraron con versene (Life Technologies). Se resuspendieron las células T47D en medio de cultivo (véase arriba) para neutralizar la versene y se contabilizaron en un contador Coulter. Se lavaron las células dos veces en amortiguador FACS frío, se centrifugaron entre los lavados a 1200 rpm durante 5 min. Se añadieron 100 μ l/ml de 2×10^4 células/pocillo a los pocillos que contenían el conjugado, anticuerpo o amortiguador FACS solo y se incubaron a 4 °C durante 2 h. Después de la incubación, se centrifugaron las células como antes y se lavaron una vez en 200 μ l/pocillo de amortiguador FACS frío. Se tiñeron las células con 200 μ l/pocillo de anticuerpo secundario Anti-Humano-IgG-Fcy de cabra conjugado con FITC (los controles incluidos fueron células sin teñir y células teñidas solo con el anticuerpo secundario) durante 40 min a 4 °C, se centrifugaron y se lavaron una vez en 200 μ l/pocillo de PBS-D frío. Se fijaron las células en 200 μ l/pocillo de 1 % de formaldehído/PBS-D y se almacenaron a 4 °C. Después del almacenamiento, se detectó la tinción de la superficie celular del conjugado o el anticuerpo utilizando citometría de flujo en un FACS Calibur (BD Biosciences). Se graficaron las medias geométricas contra la concentración logarítmica del conjugado o el anticuerpo utilizando GraphPad Prism y se calculó el EC_{50} a través de un análisis de regresión logística de 4 parámetros no lineal.

El ensayo de unión se repitió para el conjugado huMOV19-90 y los datos se muestran en la figura 15B.

Tal como se muestra en la figura 1, la figura 15A, la figura 15B y la figura 20, los conjugados se unen de forma similar a la superficie de células T47D que expresan el antígeno diana que el anticuerpo no conjugado en citometría de flujo, demostrando así que la unión no se ve afectada por el proceso de conjugación.

Ejemplo 22. Ensayo de citotoxicidad para el conjugado huMOV19-14

Se diluyeron 100 μ l/pocillo de conjugado huMOV19-14 en RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) en una placa de 96 pocillos (Corning, fondo plano) en concentraciones iniciales de $3,5 \times 10^{-9}$ M a $3,5 \times 10^{-8}$ M por triplicado y se diluyeron en serie 3 veces en el medio anterior a temperatura ambiente. Se lavaron células KB (tumor epitelial bucal), cultivadas en EMEM (ATCC) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) una vez en PBS y se retiraron con 0,05 % de tripsina-EDTA (Life Technologies). Se resuspendieron las células KB en medio de cultivo (véase arriba) para neutralizar la tripsina y se contabilizaron en un contador Coulter. Se añadieron 100 μ l/ml de 1×10^3 células/pocillo a pocillos que contenían el conjugado o medio solo y se incubaron en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 5 días con y sin 1 μ M de anticuerpo anti-FOLR1 de bloqueo (huMOV19). El volumen total es de 200 μ l/pocillo. Después de la incubación, se analizó la viabilidad celular mediante el añadido de 20 μ l/pocillo de WST-8 (Dojindo) y se dejaron crecer durante 2 h. Se leyó la absorbancia en un lector de placas a 450 y 620 nm. Se restaron las absorbancias a 620 nm de las absorbancias a 450 nm. Se restó adicionalmente el fondo en los pocillos que contenían medio solo de las absorbancias corregidas y la fracción superviviente (SF) de células sin tratar se calculó en Excel. Se creó una gráfica XY de concentración de ADC (M) en función de SF utilizando Graph Pad Prism.

Tal como se muestra en la figura 2, el conjugado es altamente potente contra las células KB con un IC_{50} de 4×10^{-12} M. La adición de un exceso de anticuerpo no conjugado reduce significativamente el efecto citotóxico, lo que demuestra especificidad de antígeno.

Ejemplo 23. Ensayo de citotoxicidad no específica para los conjugados huMOV19-14 y huMOV19-90

Se diluyeron 100 μ l/pocillo de huMOV19-14 o huMOV19-90 en RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies), 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) y β ME (Life Technologies) en una placa de 96 pocillos (Falcon, fondo redondo) en concentraciones entre 1 e-10 M y 4 e-10 M por sextuplicado. Ambas células 300.19 (ratón) con expresión de FOLR1(FR1#14) recombinante o sin vector de expresión (parental) se contaron en un contador Coulter. Se añadieron 50 μ l/ml de 1000 células FR1#14/pocillo a pocillos que contenían el conjugado o medio solo, se añadieron 50 μ l/ml de 2000 células parentales/pocillo a pocillos que contenían el conjugado o medio solo y ambas FR1#14 y las células parentales se añadieron juntas a pocillos que contenían el conjugado o medio solo. Se incubaron todas las placas en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO_2 durante 4 días. El volumen total fue de 150 μ l/pocillo. Después de la incubación, se analizó la viabilidad celular mediante el añadido de 75 μ l/pocillo de Cell Titer Glo (Promega) y se dejaron crecer durante 45 min. Se leyó la luminiscencia en un luminómetro y se sustrajo el fondo en los pocillos que contenían medio solo de todos los valores. Se graficó una gráfica de barras del promedio de cada tratamiento de células utilizando Graph Pad Prism.

Tal como se muestra en la figura 3, el conjugado huMOV19-14 presenta efecto citotóxico testigo débil en las células

negativas al antígeno vecinas.

Tal como se muestra en la figura 13, el conjugado **huMov19-90** presenta actividad de destrucción no específica fuerte.

5 **Ejemplo 24.** Ensayo de citotoxicidad *in vitro* para el conjugados **huMy9-6-14**

Se agregaron diluciones de conjugados a pocillos de placas de 96 pocillos que contenían entre 2×10^3 y 1×10^4 células por pocillo en medio de crecimiento adecuado. Se incluyeron en cada placa de ensayo pocillos de control que contenían células y el medio, pero que carecían de los compuestos de prueba, así como pocillos que contenían el medio solo. Las placas se incubaron de cuatro a seis días a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía el 6 % de CO₂. Luego se agregó reactivo WST-8, 10 % v/v, (Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MD), a los pocillos y las placas se incubaron a 37 °C de 2 a 6 h. Luego se midió la absorbancia en un espectrofotómetro lector de placas en el modo de longitud de onda doble 450 nm/650 nm y se sustrajo la absorbancia en 650 nm (dispersión de luz no específica por células). Se calculó la fracción superviviente evidente de células en cada pocillo mediante la corrección en primer lugar para la absorbancia de fondo de medio y después dividiendo cada valor entre el promedio de los valores en los pocillos de control (células no tratadas).

Tal como se muestra en la figura 3, el conjugado es altamente potente contra diversas células cancerosas positivas del antígeno; mientras las células L-540 negativos del antígeno permanecen cuando se exponen al mismo conjugado.

20 **Ejemplo 25.** Ensayo de citotoxicidad no específica para el conjugados **huMy9-6-14**

SE realizaron pruebas preliminares para determinar la concentración de **huMy9-6-14** que no era citotóxica para las células RADA-1 negativas del antígeno, pero destruyó todas las células KARA positivas del antígeno. Se colocaron en placas RADA-1 (500 células por pocillo) y KARA (500, 1000, 2000, 4000 células por pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se prepararon diluciones de **huMy9-6-14** en el medio de cultivo celular (medio RPMI1640 complementado con el 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor y 50 mg/L de gentamicina) y se agregaron a las células. Se incubaron las placas durante 4 días a 37 °C y se determinó la viabilidad de las células en cada pocillo utilizando reactivo WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Para evaluar la potencia no específica de los conjugados, se mezclaron células RADA-1 y células KARA en diferentes proporciones (500 células RADA-1 más ninguna célula KARA; 500 células RADA-1 más 500 células KARA; 500 células RADA-1 más 1000 células KARA; 500 células RADA-1 más 2000 células KARA; 500 células RADA-1 más 4000 células KARA) y se colocaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Luego se agregaron $1,0 \times 10^{-9}$ M o $5,0 \times 10^{-10}$ M de **huMy9-6-14** - las concentraciones que no eran citotóxicas para las células RADA-1 pero que destruyeron todas las células KARA - a las mezclas celulares. Se incubaron placas durante 4 días a 37 °C y se determinó la viabilidad de las células RADA-1 en cada pocillo utilizando reactivo WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.). Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro lector de placas en el modo de longitud de onda doble 450 nm/650 nm y se sustrajo la absorbancia en 650 nm (dispersión de luz no específica por células).

Tal como se muestra en la figura 5, el conjugado presenta efecto de destrucción no específica en las células negativas del antígeno vecinas.

45 **Ejemplo 26. Actividad antitumoral de huMOV19-80 y huMOV19-90 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC en ratones SCID hembra**

Los ratones SCID CB.17 hembra, de 6 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Se inocularon los ratones con 1×10^7 células tumorales de NCI-H2110 suspendidas en 0,1 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm³ (día 7 después de la inoculación), se aleatorizaron los animales basándose en el volumen tumoral en 5 grupos de 6 ratones cada uno. Los ratones recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón), **huMOV19-80** o **huMOV19-90** en 5 y 25 µg/kg basándose en concentración de **huMOV19-80** o **huMOV19-90** en el día 1 (día 8 después de la inoculación). huMOV19 es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une selectivamente al receptor 1 de folato (FOLR1).

Se midió el tamaño de los tumores entre dos y tres veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. Se expresó el volumen tumoral en mm³ utilizando la fórmula $V = \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura} \times \frac{1}{2}$. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50 % o más y una regresión tumoral completa (CR) cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. Se determinó el volumen tumoral con el software StudyLog. Se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (valor de T/C) utilizando la siguiente fórmula: $T/C (\%) = \frac{\text{volumen tumoral medio de los tratados}}{\text{volumen tumoral medio de control}} \times 100$.

Se determinó el volumen tumoral simultáneamente para los grupos tratados (T) y de control de vehículo (C) cuando el volumen tumoral del control de vehículo alcanzaba un tamaño predeterminado de 1000 mm³. Se determinó el volumen tumoral medio diario de cada grupo tratado, incluidos los ratones sin tumor (0 mm³). De acuerdo con las normas NCI, un T/C ≤ 42 % es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un T/C < 10 % se considera un nivel de actividad antitumoral alto.

Tal como se muestra en la figura 6, el conjugado **huMOV19-90** es altamente activo en la dosis de 5 y de 25 µg/kg; mientras que el conjugado **huMOV19-80** es altamente activo en la dosis de 25 µg/kg.

Ejemplo 27. Preparación de huML66-90

Una reacción que contenía 2,0 mg/mL de anticuerpo huML66, un anticuerpo anti-EGFR (véase WO 2012/058592) y 3,5 equivalentes molares del compuesto **90** (pretratados con un exceso de 5 veces de bisulfito de sodio en 90:10 DMA:50 mM de succinato pH 5,5 durante 4 horas a 25 °C) en 15 mM de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico) a pH 8,5 y el 10% v/v codisolvente DMA (N,N-dimetilacetamida) se incubó durante 4 horas a 25 °C. Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambiaba en 20 mM de histidina, 50 mM de cloruro de sodio, 8,5% p/v de sucrosa, 0,01 % de Tween-20, 50 µM de amortiguador de formulación de bisulfito de sodio pH 6,2 utilizando columnas de desalación NAP (Ilustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante 4 horas a temperatura ambiente y luego durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 30.000 MWCO).

Se encontró que el conjugado purificado tenía una concentración de proteína final de 0,9 mg/ml y un promedio de 2,7 de moléculas del compuesto **90** unidas por anticuerpo (mediante UV-Vis utilizando coeficientes de extinción molares $\epsilon_{330\text{ nm}} = 15.280\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 30,115\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el compuesto **90**, y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 205.520\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para el anticuerpo huML66); el 99,1 % de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño); y el <1 % de IGN149 no conjugado (análisis HPLC de fase inversa de columna doble). Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 8.

Ejemplo 28. Ensayos citotóxicos in vitro para el conjugado huML66-90

Se midió la capacidad del conjugado **huML66-90** de inhibir el crecimiento celular utilizando ensayos de citotoxicidad in vitro. Las células diana se colocaron en placas en 1-2.000 células por pocillo en 100 µL en medio RPMI completo (RPMI-1640, 10 % de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, el 1 % de penicilina-estreptomina, todos reactivos de Invitrogen). Los anticuerpos se diluyeron en medio RPMI completo utilizando series de dilución de 3 veces y se agregaron 100 µL por pocillo. La concentración final típicamente osciló entre $3 \times 10^{-8}\text{ M}$ y $4,6 \times 10^{-12}\text{ M}$. Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂ durante 5-6 días. Se determinó la viabilidad de las células restantes mediante ensayo WST-8 colorimétrico (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, US). WST-8 se reduce por deshidrogenasas en las células vivas a un producto de formazán naranja que es soluble en medios de cultivo tisular. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. Se agregó WST-8 a 10 % del volumen final y las placas se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂ durante un adicional de 2-4 horas. Las placas se analizaron mediante la medición de la absorbancia en 450 nm (A450) en un lector de placas multipocillos. Se sustrajo la absorbancia A450 de fondo de los pocillos con medio y WST-8 solo de todos los valores. Se calculó el porcentaje de viabilidad dividiendo el valor de cada muestra tratada por el valor promedio de pocillos con células no tratadas. Porcentaje de viabilidad = $100 \times (\text{muestra tratada de A450} - \text{A450 de fondo}) / (\text{muestra no tratada A450} - \text{A450 de fondo})$. El valor del porcentaje de viabilidad se graficó contra la concentración de anticuerpo en una gráfica semilogarítmica para cada tratamiento. Se generaron curvas con respuesta a la dosis mediante regresión no lineal y se calculó el valor de EC₅₀ de cada curva utilizando GraphPad Prism (GraphPad software, San Diego, CA).

Actividad citotóxica in vitro

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* del conjugado **huML66-90** en presencia y ausencia de exceso de anticuerpo no conjugado y se comparó con la actividad de un conjugado **hulgG-90** no específico en células que expresaban EGFR y los resultados de un ensayo de citotoxicidad típico se muestran en la figura 9. El conjugado **huML66-90** produjo la destrucción celular específica de células SCC-HN Detroit-562 con un valor de EC₅₀ de 16 pM. La presencia de exceso de anticuerpo no conjugado redujo significativamente la actividad y produjo un valor de EC₅₀ de aproximadamente 2 nM. De forma similar, el conjugado **hulgG-90** sin ningún anticuerpo de control hulgG que no es de unión produjo la destrucción celular con un valor de EC₅₀ de aproximadamente 8 nM.

Del mismo modo, el conjugado **huML66-90** produjo una destrucción celular específica de las células NCI-H292 NSCLC con un valor de EC₅₀ de 12 pM. La presencia de exceso de anticuerpo no conjugado redujo significativamente la actividad y produjo un valor de EC₅₀ de aproximadamente 2 nM. De forma similar, el conjugado **hulgG-90** sin ningún anticuerpo de control hulgG que no es de unión produjo la destrucción celular con un valor de EC₅₀ de aproximadamente 8 nM.

De forma similar, también se observó la destrucción celular específica de células NCI-H1703.

Tabla 1.

5

r	EC ₅₀ de Detroit en pM	EC ₅₀ de NCI-H292 en pM	EC ₅₀ de NCI-H1703 en pM
huML66-90	16	12	20
huML66-90 +bloque	2.350	1.570	2.140
hulG-90 control	8.350	8.350	N/A

Ejemplo 29. Actividad citotóxica *in vitro* para huMOV19-90

10 Se diluyeron 100 µl/pocillo de conjugado **huMOV19-90** en RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) en una placa de 96 pocillos (Corning, fondo plano) en concentraciones iniciales entre 3,5e-9 M y 3,5 e-8 M por triplicado y se diluyeron en serie 3 veces en el medio anterior a temperatura ambiente. Se lavaron células KB (tumor epitelial bucal), cultivadas en EMEM (ATCC) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies) una vez en PBS y se retiraron con 0,05 % de tripsina-EDTA (Life Technologies). Otras células evaluadas fueron NCI-H2110 (NSCLC) y T47D (epiteliales de mama) cultivadas en RPMI-1640 (Life Technologies) complementado con 10 % de FBS inactivado con calor (Life Technologies) y 0,1 mg/ml de gentamicina (Life Technologies). También se complementó el medio de T47D con 0,2 IU/ml de insulina bovina. Se resuspendieron todas las células en medio de cultivo (véase arriba) para neutralizar la tripsina y se contabilizaron utilizando un hemacitómetro. Se añadieron 100 µl/ml de 1000 células KB/pocillo o 2000 células T47D y NCI-H2110/pocillo a pocillos que contenían el conjugado o medio solo y se incubaron en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 5 días con y sin 1 µM de anticuerpo anti-FOLR1 de bloqueo (huMOV19). El volumen total es de 200 µl/pocillo. La concentración inicial de cada conjugado en células KB fue de 3,5e-9 M y para células T47D y NCI-H2110, la concentración inicial de cada conjugado fue de 3,5e-8 M. Después de la incubación, se analizó la viabilidad celular mediante el añadido de 20 µl/pocillo de WST-8 (Dojindo) y se dejaron crecer durante 2 h. Se leyó la absorbancia en un lector de placas a 450 y 620 nm. Se restaron las absorbancias a 620 nm de las absorbancias a 450 nm. Se restó adicionalmente el fondo en los pocillos que contenían medio solo de las absorbancias corregidas y la fracción superviviente (SF) de células sin tratar se calculó en Excel. Se creó una gráfica XY de concentración de ADC (M) en función de SF utilizando Graph Pad Prism.

30 Tal como se muestra en las figuras 10-12 y la tabla 2, el conjugado **huMOV19-90** es altamente potente contra las células KB, las células T47 D y las células NCI-H2110. La adición de un exceso de anticuerpo no conjugado reduce significativamente el efecto citotóxico, lo que demuestra especificidad de antígeno.

Tabla 2.

	KB		NCI-H2110		T47D	
	-Bloque	+Bloque	-Bloque	+Bloque	-Bloque	+Bloque
IC ₅₀	4e-12 M	8e-10 M	2e-11 M	1e-8 M	3e-11 M	8e-9 M

35

En otro experimento, se midió la capacidad de los conjugados de inhibir el crecimiento celular utilizando un ensayo de citotoxicidad *in vitro* basado en WST-8. Se trataron células en placas de 96 pocillos (típicamente, 1x10³ por pocillo) con el conjugado en diversas concentraciones en un medios de cultivo celular adecuado con un volumen total de 0,2 ml. Se incluyeron en cada placa de ensayo pocillos de control que contenían células y el medio, pero que carecían de los compuestos de prueba, y pocillos que contenían el medio solo. Las placas se incubaron de 4 a 6 días a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía el 6 % de CO₂. Luego se agregó reactivo WST-8 (10 %, volumen/volumen; Dojindo Molecular Technologies), a los pocillos y las placas se incubaron a 37 °C de 2 a 6 horas dependiendo de la línea celular. Luego, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro lector de placas en el modo de longitud de onda doble 450 nm/620 nm y se sustrajo la absorbancia en 620 nm (dispersión de luz no específica por células). Los valores de OD₄₅₀ resultantes se utilizaron para calcular fracciones supervivientes evidentes de las células utilizado GraphPad Prism v4

45

(GraphPad software, San Diego, CA). Se calculó la fracción superviviente evidente de células en cada pocillo mediante la corrección en primer lugar para la absorbancia de fondo de medio y después dividiendo cada valor entre el promedio de los valores en los pocillos de control (células no tratadas). Se generaron curvas de respuesta a la dosis mediante regresión no lineal utilizando una curva sigmoidea con pendiente variable en Graph Pad Prism. Se generó IC₅₀ (concentración inhibidora 50 %) a través del software.

Los conjugados eran activos contra las líneas celulares evaluadas Ishikawa (cáncer de endometrio), KB (cáncer de cuello uterino) y NCI-H2110 (cáncer de pulmón de células no pequeñas) como se muestra en la figura 21 y la tabla 3. La actividad de destrucción de células era dependiente de FOLR1, debido a que un exceso de anticuerpo huMOV19 no modificado (1 µM) disminuyó considerablemente la potencia del conjugado (entre 20 y 200 veces).

Tabla 3

Línea celular	IC50, nM			
	huMOV19-90		huMOV19-107	
	Conjugado	Conjugado+anticuerpo no modificado	Conjugado	Conjugado+anticuerpo no modificado
Ishikawa	0,05	1,0	0,05	2,0
KB	0,005	1,0	0,005	0,8
NCI-H2110	0,1	4,0	0,1	7,0

Ejemplo 30. Actividad antitumoral del conjugado huMOV19-90 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC en ratones SCID hembra

Los ratones SCID CB.17 hembra, de 6 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Se inocularon los ratones con 1×10^7 células tumorales de NCI-H2110 suspendidas en 0,1 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm³ (día 7 después de la inoculación), se aleatorizaron los animales basándose en el volumen tumoral en 4 grupos de 6 ratones cada uno. Los ratones recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón) o huMOV19-90 en 1, 3 o 5 µg/kg basándose en la concentración del compuesto 90 en el día 1 (día 8 después de la inoculación).

Se midió el tamaño de los tumores entre dos y tres veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. Se expresó el volumen tumoral en mm³ utilizando la fórmula $V = \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura} \times \frac{1}{2}$. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50 % o más y una regresión tumoral completa (CR) cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. Se determinó el volumen tumoral con el software StudyLog.

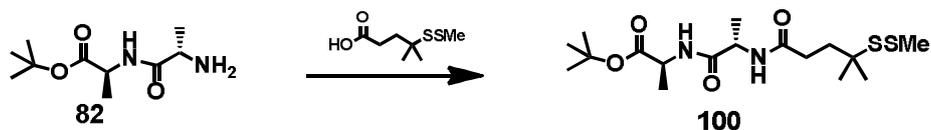
Se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (valor de T/C) utilizando la siguiente fórmula:

$$T/C (\%) = \text{volumen tumoral medio de los tratados} / \text{volumen tumoral medio de control} \times 100.$$

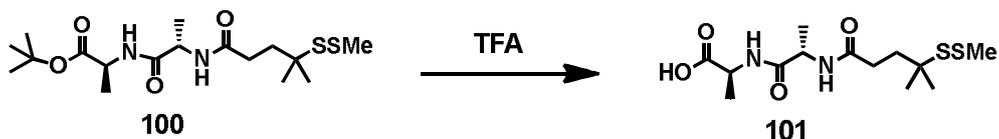
Se determinó el volumen tumoral simultáneamente para los grupos tratados (T) y de control de vehículo (C) cuando el volumen tumoral del control de vehículo alcanzaba un tamaño predeterminado de 1000 mm³. Se determinó el volumen tumoral medio diario de cada grupo tratado, incluidos los ratones sin tumor (0 mm³). De acuerdo con las normas NCI, un $T/C \leq 42 \%$ es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un $T/C < 10 \%$ se considera un nivel de actividad antitumoral alto.

Tal como se muestra 14, el conjugado huMOV19-90 es activo en dosis de 3 µg/kg y es altamente activo en dosis de 5 µg/kg.

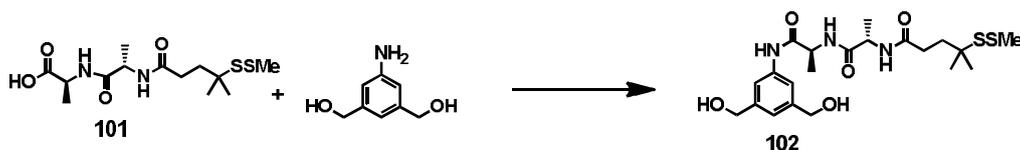
Ejemplo 31. Síntesis del compuesto 107



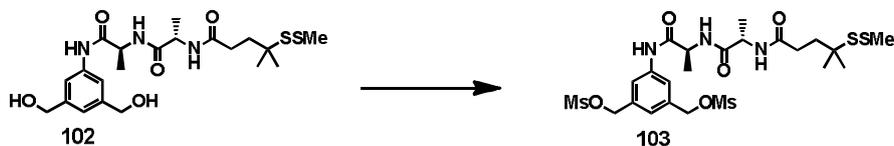
5 **Etapa 1:** Se disolvieron el compuesto **82** (500 mg, 2,31 mmol), ácido 4-metil-4-(metildisulfanil)pentanoico (449 mg, 2,31 mmol), EDC·HCl (465 mg, 2,43 mmol), HOBt (354 mg, 2,31 mmol) y DIPEA (0,81 mL, 4,62 mmol) en DMF (7,7 mL) y se agitó durante la noche hasta que la reacción se completó. La reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio saturado, cloruro de amonio saturado y dos veces con agua. La capa orgánica se secó y se concentró in vacuo para proporcionar el compuesto **100** (875 mg, el 96 % de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente etapa. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): δ 8,15 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 8,02 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 4,26-4,33 (m, 1H), 4,03-4,12 (m, 1H), 2,41 (s, 3H), 2,18-2,22 (m, 2H), 1,76-1,80 (m, 2H), 1,39 (s, 9H), 1,24 (s, 6H), 1,24 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz), 1,19 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz).



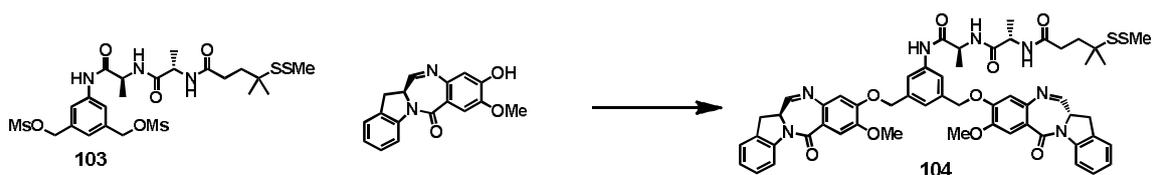
15 **Etapa 2:** se agregaron TFA (2,6 ml) y agua (0,17 ml) al compuesto puro **100** (875 mg, 2,23 mmol) y se agitó a temperatura ambiente hasta que la reacción se completó. La reacción se diluyó y se destiló de forma azeotrópica con acetonitrilo para obtener un aceite pegajoso. Luego se diluyó con acetonitrilo y agua, se congeló y se liofilizó para proporcionar el compuesto **101** (1 g, el 100 % de rendimiento) como un sólido blanquecino que se utilizó sin purificación adicional. LCMS = 3,99 min (procedimiento de 8 min). MS (m/z): 337,0 ($M + 1$) $^+$.



20 **Etapa 3:** Se disolvieron el compuesto **101** (923 mg, 1,65 mmol) y (5-amino-1,3-fenil)dimetanol (240 mg, 1,57 mmol) en DMF (5,2 ml). Se agregaron EDC·HCl (601 mg, 3,13 mmol) y DMAP (96 mg, 0,78 mmol) a temperatura ambiente y la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se diluyó la reacción con acetato de etilo y se lavó con agua tres veces. La capa orgánica se secó, se concentró in vacuo y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (DCM/MeOH) para proporcionar el compuesto **102** (150 mg, el 20 % de rendimiento). LCMS = 3,91 min (procedimiento de 8 min). MS (m/z): 472,2 ($M + 1$) $^+$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ 9,69 (s, 1H), 8,21 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 8,18 (d, 1H, $J = 6,8$ Hz), 7,52 (s, 2H), 7,12 (s, 1H), 4,58 (s, 4H), 4,44-4,48 (m, 1H), 4,29-4,32 (m, 1H), 3,34 (s, 2H), 2,38 (s, 3H), 2,34-2,40 (m, 2H), 1,90-1,95 (m, 2H), 1,43 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz), 1,36 (d, 3H, $J = 7,2$ Hz), 1,30 (s, 6H).

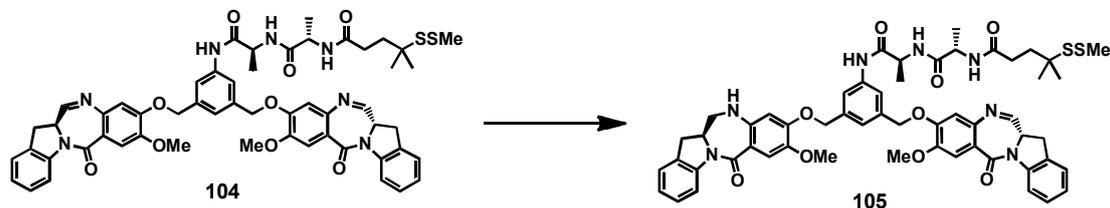


25 **Etapa 4:** Se preparó el compuesto **102** de forma similar al compuesto **94** en el ejemplo 9. El material bruto se secó en vacío alto para proporcionar el compuesto **103** (174 mgs, el 101 % de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS = 4,95 min (procedimiento de 8 min).



30 **Etapa 5:** Se preparó el compuesto **103** de forma similar al compuesto **57** en el ejemplo 7. El sólido bruto contenía

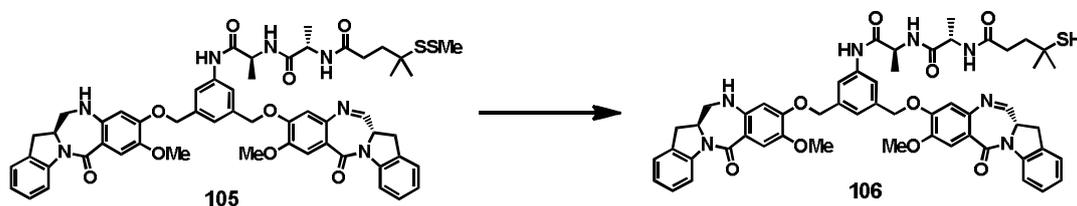
compuesto **104** (203 mg, el 44 % de rendimiento, el 60 % de pureza) que se utilizó sin purificación adicional. LCMS = 5,68 min (procedimiento de 8 min). MS (m/z): 1024,3(M + 1)⁺.



5

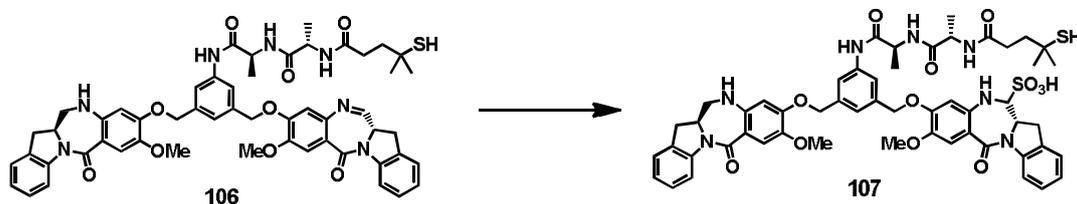
Etapa 6: Se preparó el compuesto **104** de forma similar al compuesto **12** en el ejemplo 1. El residuo bruto se purificó mediante RPHPLC (columna C18, CH₃CN/H₂O, gradiente, entre el 50% y el 65%) para proporcionar monomina compuesto **105** como un sólido (22 mg, el 16% de rendimiento, el 90 % bruto). LCMS = 6,00 min (procedimiento de 8 min). MS (m/z): 1027,3(M + 1)⁺.

10



15

Etapa 7: Se disolvió el compuesto **106** en THF (0,5 mL) y ACN (0,23 mL) en temperatura ambiente. Luego se preparó de forma similar al compuesto **98** en el ejemplo 9. La mezcla se agitó hasta completarse y luego se diluyó con DCM y agua DI. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó y se filtró. El filtrado se concentró para proporcionar el tior bruto, el compuesto **106** (21 mg, el 100 % de rendimiento) que se utilizó directamente en la siguiente reacción. LCMS = 5,67 min (procedimiento de 8 min). MS (m/z): 980,4 (M + 1)⁺.



20

Etapa 8: El compuesto **106** (21 mg, 0,021 mmol) se suspendió en 2-propanol (1428 μl) y agua (714 μl). Se agregó metabisulfito de sodio (22,30 mg, 0,214 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente hasta completarse. La mezcla de reacción se diluyó con acetonitrilo/agua, se congeló y se liofilizó. El polvo blanco resultante se purificó mediante RPHPLC (columna C18, CH₃CN/H₂O, gradiente, entre el 20 % y el 40 %) y las fracciones deseadas se recogieron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto **107** (5,3 mg, el 23 % de rendimiento). LCMS = 5,67 min (procedimiento de 8 min). MS (m/z): 1060,2 (M - 1)⁻.

25

Ejemplo 32. Preparación del conjugado huMOV19-sulfo-SPDB-107 (o huMOV19-107)

30 Una mezcla in situ que contenía concentraciones finales de 1,95 mM del compuesto **107** y 1,5 mM de enlazador sulfo-SPDB en amortiguador succinato (pH 5) : DMA (30 : 70) se incubó durante 6 h antes de la adición de un exceso de 7 veces de **107**-sulfo-SPDB-NHS a una reacción que contenía 4 mg/ml de anticuerpo huMOV19 en 15 mM HEPES pH 8,5 (87:13, agua: DMA). La solución se dejó conjugarse durante la noche a 25 °C.

35 Después de la reacción, el conjugado se purificó y el amortiguador se intercambió en 10 mM de Tris, 80 mM de NaCl, 50 μM de disulfito, el 3,5 % de sacarosa, el 0,01 % de amortiguador de formulación Tween-20 pH 7,6 utilizando columnas de desalación NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). Se realizó la diálisis en el mismo amortiguador durante la noche a 4 °C utilizando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer (ThermoScientific 10.000 MWCO).

40 Se encontró que el conjugado purificado tenía un promedio de 2,7 de moléculas del compuesto **107** unidas por anticuerpo (mediante UV/Vis y SEC utilizando coeficientes de extinción molar $\epsilon_{330 \text{ nm}} = 15.484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ y $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30, 115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para

el compuesto **107**, y $\epsilon_{280\text{ nm}} = 201.400\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para anticuerpo huMOV19), el 95% de monómero (mediante cromatografía de exclusión por tamaño) y una concentración de proteína final de 1,1 mg/ml. Los datos de espectrometría MS se muestra en la figura 16.

5 **Ejemplo 33. Actividad antitumoral del conjugado huML66-90 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H1703 NSCLC en ratones SCID hembra**

10 Los ratones SCID CB.17 hembra, de 6 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Se inocularon los ratones con 5×10^6 células tumorales de NCI-H1703 suspendidas en 0,2 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 (día 16 después de la inoculación), se aleatorizaron los animales basándose en el volumen tumoral en 4 grupos de 6 ratones cada uno. Los ratones recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,1 ml/ratón) o conjugado **huML66-90** en 5, 20 o 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ basándose en la concentración del compuesto **90** en el día 1 (día 17 después de la inoculación).

15 Se midió el tamaño de los tumores entre dos y tres veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. Se expresó el volumen tumoral en mm^3 utilizando la fórmula $V = \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura} \times \frac{1}{2}$. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50 % o más y una regresión tumoral completa (CR) cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. Se determinó el volumen tumoral con el software StudyLog.

20 Se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (valor de T/C) utilizando la siguiente fórmula:

$$25 \quad T/C (\%) = \text{volumen tumoral medio de los tratados} / \text{volumen tumoral medio de control} \times 100.$$

Se determinó el volumen tumoral simultáneamente para los grupos tratados (T) y de control de vehículo (C) cuando el volumen tumoral del control de vehículo alcanzaba un tamaño predeterminado de 1000 mm^3 . Se determinó el volumen tumoral medio diario de cada grupo tratado, incluidos los ratones sin tumor (0 mm^3). De acuerdo con las normas NCI, un $T/C \leq 42\%$ es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un $T/C < 10\%$ se considera un nivel de actividad antitumoral alto.

30 Tal como se muestra en la figura 17, el conjugado **huML66-90** es altamente activo en 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ como dosis eficaz mínima (MED).

35 **Ejemplo 34. Farmacocinética del conjugado huMov19-90 de dosis única en ratones CD-1 hembra**

Los ratones CD-1 hembra, de 7 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Los ratones recibieron una administración IV única del conjugado **huMov19-90** como una inyección en bolo intravenosa única mediante una vena lateral de la cola. Cada ratón recibió una dosis de 2,5 mg/kg en base a Ab. La dosis y el volumen inyectado se individualizaron sobre la base del peso corporal de cada ratón. Se llevaron a cabo inyecciones utilizando una jeringa de 1,0 mL equipada con una aguja calibre 27, de $\frac{1}{2}$ pulgada. En el minuto 2 y 30, en las horas 2, 4 y 8, y en los días 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 después de la administración del conjugado **huMov19-90**, se anestesió a los ratones mediante inhalación de isoflurano y se recogió aproximadamente 150 μL de sangre de los ratones a través del seno sanguíneo retroorbital derecho en un tubo capilar heparinizado. En cada punto de tiempo (entre 0 y 21 días), se recogió sangre de los tres ratones en un grupo. A su vez, se tomaron muestras de sangre de los grupos; de modo que los ratones en el conjunto no se le tomaron muestras de sangre más de dos veces en un período de 24 horas. En punto de tiempo final, 28 días después de la administración, todos los ratones se incluyeron para la recolección de muestras. Las muestras de sangre se centrifugaron para separar el plasma. Se transfirió 30 μL de plasma a tubos de microcentrifuga etiquetados individuales para cada muestra y punto de tiempo, y luego se almacenó y se congeló a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ para permitir el análisis posterior mediante ELISA para determinar las concentraciones de Ab total (Ab no conjugado y conjugado intacto) y el conjugado intacto utilizando un anticuerpo anti-indolinobenzodiazepina.

50 Tal como se muestra en la figura 18, el conjugado **huMov19-90** tiene depuración similar a la del anticuerpo.

55 **Ejemplo 35. Enriquecimiento de catabolitos mediante captura por afinidad con resina de proteína A**

Se cultivaron células KB con expresión del receptor α de folato (FR α) en $5 \times \text{T150}$ placas de cultivo tisular. Se incubó una cantidad de saturación de FR α dirigido al conjugado **huMov19-90** con células KB durante 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ en una incubadora humidificada amortiguada con 5 % de CO_2 . Después de 24 horas, se recogió el medio que contenía catabolitos de eflujo celular y se agrupó para el siguiente ensayo.

Se unió una cantidad saturante de anticuerpo anti-indolinobenzodiazepina a una suspensión de resinas de proteína A mediante incubación durante la noche a 4 °C. Se incubó 1 mL de complejo de proteína A unida previamente/anticuerpo anti-indolinobenzodiazepina con 25 mL de medio en un rotador de extremo a extremo durante varias horas. Se centrifugaron suavemente las resinas a 1000 rpm y se decantó el sobrenadante. Las resinas de proteína-A/anticuerpo anti-indolinobenzodiazepina unidas a los catabolitos se lavaron con PBS. Se liberaron los catabolitos a la fase orgánica mediante extracción de acetona. Los catabolitos se secaron al vacío durante la noche hasta que se evaporó completamente la solución orgánica. Se reconstituyeron los catabolitos con 20 % de acetonitrilo en agua y se analizaron mediante LC/MS.

10 Análisis MS

Se identificaron los catabolitos celulares mediante UHPLC/MS/MS utilizando espec. de masas de alta resolución Q-Exactive (Thermo). Se utilizaron los cromatogramas iónicos extraídos (XIC) para identificar y caracterizar los catabolitos de células diana. Se identificaron todas las especies de catabolitos que contenían las firmas de masas de indolinobenzodiazepina características (286 m/z) (véase las figuras 19A y 19B).

Ejemplo 36. Actividad antitumoral de huMov19-90 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC, xenoinjertos endometriales Hec-1b y xenoinjertos endometriales Ishikawa en ratones CB.17 SCID hembra

Los ratones SCID CB.17 hembra, de 6 semanas, fueron proporcionados por Charles River Laboratories. Se inoculó un Cohorte de ratones con 1×10^7 células tumorales de NCI-H2110 suspendidas en 0,1 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Se inoculó un segundo Cohorte de ratones con 1×10^7 de células tumorales Hec-1b suspendidas en 0,1 ml de medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho. Se inoculó un tercer Cohorte de ratones con 1×10^7 células tumorales de Ishikawa suspendidas en 0,1 ml de 50 % de matrigel/medio libre de suero mediante inyección subcutánea en el costado derecho.

Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 100 mm³ (NCI-H2110 en el día 7, Hec-1b en el día 7 y Ishikawa en el día 17 después de la inoculación), se aleatorizaron los animales basándose en el volumen tumoral en grupos de 6 ratones cada uno.

Los ratones en el experimento de xenoinjerto NCI-H2110 recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón) o huMov19-90 en 1, 3 o 5 µg/kg basándose en la concentración de fármaco en el día 1 (día 8 después de la inoculación).

Los ratones en el experimento de xenoinjerto Hec-1b recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón) o huMov19-90 en 10 o 30 µg/kg o el conjugado de control no dirigido chKTI-90 en 30 µg/kg basándose en la concentración de fármaco en el día 1 (día 8 después de la inoculación).

Los ratones en el experimento de xenoinjerto Ishikawa recibieron una administración IV única de control de vehículo (0,2 ml/ratón) o huMov19-90 en 10 o 30 µg/kg o el conjugado de control no dirigido chKTI-90 en 30 µg/kg basándose en la concentración de fármaco en el día 1 (día 18 después de la inoculación).

Para todos los experimentos, se midió el tamaño de los tumores entre dos y tres veces por semana en tres dimensiones utilizando un calibrador. Se expresó el volumen tumoral en mm³ utilizando la fórmula $V = \text{longitud} \times \text{ancho} \times \text{altura} \times \frac{1}{2}$. Se consideró que un ratón tenía una regresión parcial (PR) cuando el volumen del tumor se reducía en un 50 % o más y una regresión tumoral completa (CR) cuando no se podía detectar ningún tumor palpable. Se determinó el volumen tumoral con el software StudyLog.

Se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (valor de T/C) utilizando la siguiente fórmula:

$$T/C (\%) = \text{volumen tumoral medio de los tratados} / \text{volumen tumoral medio de control} \times 100.$$

Se determinó el volumen tumoral simultáneamente para los grupos tratados (T) y de control de vehículo (C) cuando el volumen tumoral del control de vehículo alcanzaba un tamaño predeterminado de 1000 mm³. Se determinó el volumen tumoral medio diario de cada grupo tratado, incluidos los ratones sin tumor (0 mm³). De acuerdo con las normas NCI, un $T/C \leq 42\%$ es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un $T/C < 10\%$ se considera un nivel de actividad antitumoral alto.

Tal como se muestra en la figura 22, el conjugado huMov19-90 era inactivo en el modelo de xenoinjerto NCI-H2110 en una dosis de 1 µg/kg, activo en una dosis de 3 µg/kg con un T/C del 13 % y 1/6 PRs y altamente activo en una dosis de 5 µg/kg con un T/C del 2 %, 6/6 PRs y 4/6 CRs.

Tal como se muestra en la figura 23, el conjugado huMov19-90 era activo en el modelo de xenoinjerto Hec-1b en una dosis de 10 µg/kg con un T/C del 15% y 1/6 PRs y altamente activo en una dosis de 30 µg/kg con un T/C del 9%, 6/6 PRs y 6/6 CRs. El conjugado de control no dirigido chKTI-90 era activo en una dosis de 30 µg/kg con un T/C del 34 %.

Tal como se muestra en la figura 24, el conjugado huMov19-90 era activo en el modelo de xenoinjerto Hec-1b en una dosis de 10 µg/kg con un T/C del 27%, 6/6 PRs y 6/6 CRs y activo en una dosis de 30 µg/kg con un T/C del 15%, 6/6 PRs y 6/6 CRs. El conjugado de control no dirigido chKTI-90 era activo en una dosis de 30 µg/kg con un T/C del 24 % y 4/6 PRs.

Ejemplo 37. Actividad antitumoral de huMov19-107 de dosis única contra xenoinjertos NCI-H2110 NSCLC, en ratones CB.17 SCID hembra

Se realizó la actividad antitumoral in vivo de huMOV19-107 en ratones SCID de acuerdo con los protocolos descritos en el ejemplo 30 anterior. Tal como se muestra en la figura 25, el conjugado **huMov19-107** era altamente activo en dosis de 10 µg/kg y 6/6 CRs.

Ejemplo 38. Afinidad de unión del conjugado CD123-90

Se evaluó la afinidad de unión del conjugado ADC de un anticuerpo anti-CD123 humanizado ejemplar, anticuerpo huCD123-6Gv4.7S3, y se comparó con el anticuerpo no conjugado correspondiente mediante citometría de flujo utilizando células HNT-34. Las células HNT-34 (5×10^4 células por muestra) se incubaron con diversas concentraciones del ADC y el anticuerpo huCD123-6Gv4.7S3 no conjugado en 200 µL de amortiguador FACS (medio DMEM complementado con el 2 % de suero de cabra normal). Luego las células se sedimentaron, se lavaron dos veces y se incubaron durante 1 h con 100 µL de anticuerpo IgG de cabra antihumano conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson Laboratory). Las células se sedimentaron una vez más, se lavaron con amortiguador FACS y se suspendieron nuevamente en 200 µL de PBS que contenía formaldehído al 1 %. Las muestras se adquirieron utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur con el muestreador multipocillos de HTS o un citómetro de flujo de barrido FACS y se analizó utilizando CellQuest Pro (todos de BD Biosciences, San Diego, EUA). Para cada muestra la intensidad geo promedio de fluorescencia para FL2 se calculó y se graficó con la concentración de anticuerpo en una gráfica semilogarítmica. Se generó una curva de respuesta a la dosis mediante regresión no lineal y se calculó el valor de EC50 de cada curva, que corresponde a la constante de disociación aparente (Kd) de cada anticuerpo, utilizando GraphPad Prism v4 (GraphPad software, San Diego, CA).

Tal como se muestra en la figura 26, la conjugación solo afectó moderadamente la afinidad de unión del anticuerpo anti-CD123 ejemplar.

Ejemplo 39. Actividad citotóxica *in vitro* para huCD123-90

SE midió la capacidad de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de huCD123-6, un anticuerpo anti-CD123, de destruir células que expresan CD123 en su superficie celular utilizando ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Se cultivaron las líneas celulares en medio de cultivo según lo recomendado por el proveedor de las células (ATCC o DSMZ). Se añadieron las células, 2.000 a 10.000 en 100 µL del medio de cultivo a cada pocillo de placas de 96 pocillos de fondo plano. Para bloquear los receptores Fc en la superficie celular, se complementó el medio de cultivo con 100 nM de anticuerpo chKTI (un anticuerpo del mismo isotipo). Se diluyeron los conjugados en el medio de cultivo utilizando una serie de diluciones de 3 veces y se añadieron 100 µL por pocillo. Para determinar la contribución de la citotoxicidad independiente de CD123, se añadió el bloque CD123 (p. ej., 100 nM de anticuerpo chCD123-6) a algunos pocillos antes que los conjugados. Se incluyeron en cada placa de ensayo pocillos de control que contenían células y el medio, pero que carecían de los conjugados, así como pocillos que contenían el medio solo. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada punto de datos. Se incubaron las placas a 37 °C en una incubadora humidificada con 6 % de CO₂ durante 4 a 7 días. Se determinó la cantidad relativa de células viables en cada pocillo utilizando el Kit de conteo de células 8 basado en WST-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD). Se calculó la fracción superviviente evidente de células en cada pocillo mediante la corrección en primer lugar para la absorbancia de fondo de medio y después dividiendo cada valor entre el promedio de los valores en los pocillos de control (células no tratadas). Se graficó la fracción superviviente de células contra la concentración de conjugado en gráficas semilogarítmicas.

Se utilizaron quince líneas celulares positivas de CD123 de origen diferente (AML, B-ALL, CML y NHL) en el estudio (tabla 4). La mayoría de las líneas celulares derivaron de pacientes portadores de un tumor maligno con al menos un factor de pronóstico negativo (p. ej., sobreexpresión de P-glicoproteína, sobreexpresión de EVI1, alteraciones de p53, mutación de DNMT3A, duplicación de tándem interno de FLT3). Los conjugados demostraron alta potencia en estas líneas celulares con valores de IC50 que variaban entre sub-pM y nM bajo (tabla 4).

Tabla 4. Citotoxicidad in vitro del conjugado **huCD123-6-90** contra líneas celulares positivas de CD123 de origen diferente

Línea celular	Origen	Factor de pronóstico negativo	IC ₅₀ (M)
THP1	AML	Eliminación de p53	6,7E-12
SHI-1	AML	Alteraciones del gen p53	1,3E-11
KO52	AML	mutante p53, sobreexpresión de Pgp	1,4E-11
KASUMI-3	AML	EV11 y sobreexpresión de Pgp	9,8E-12
KG-1	AML	mutante p53, sobreexpresión de Pgp	2,2E-10
OCI-AML2	AML	Mutación de DNMT3A	8,8E-11
HNT-34	AML	Sobreexpresión de MECOM (EV11)	2,0E-12
MV4-11	AML	Duplicación de tándem interno de FLT3	5,6E-13
MOLM-13	AML	Duplicación de tándem interno de FLT3	4,9E-13
EOL-1	AML		2,5E-12
MOLM-1	CML	EV11 y sobreexpresión de Pgp	2,9E-11
KOPN8	B-ALL		1,1E-11
JM-1	B-ALL		2,4E-11
KCL-22	CML		3,0E-11
Granta519	NHL		1,2E-12

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ImmunoGen, Inc.

- 5 <120> DERIVADOS DE BENZODIAZEPINA CITOTÓXICOS
- <130> PE958255EP
- 10 <150> 62/045,248
<151> 2014-09-03
- <150> 62/087,040
<151> 2014-12-03
- 15 <150> 62/149,370
<151> 2015-04-17
- <150> 62/164,305
<151> 2015-05-20
- 20 <160> 29
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la cadena pesada CDR1 del receptor 1 de folato humano
- <400> 1
- 35 Gly Tyr Phe Met Asn
1 5
- 40 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial
- 45 <220>
<223> anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la cadena pesada CDR2 del receptor 1 de folato humano
- 50 <220>
<221> X
<222> (14)..(14)
<223> Lys, Gln, His, o Arg
- 55 <220>
<221> X
<222> (16)..(16)
<223> Gln, His, Asn, or Arg
- 60 <220>

ES 2 815 353 T3

<221> X
<222> (17)..(17)
<223> Gly, GLu, Thr, Ser, Ala, or Val

5 <220>
<221> X
<222> (17)..(17)
<223> Gly, Glu, Thr, Ser, Ala, or Val

10 <400> 2

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa
1 5 10 15

15 Xaa

20 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la cadena pesada CDR3 del receptor 1 de folato humano

<400> 3

30 Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

35 <210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la cadena ligera CDR1 del receptor 1 de folato humano

<400> 4

45 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
1 5 10 15

50 <210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la cadena ligera CDR2 del receptor 1 de folato humano

<400> 5

60

ES 2 815 353 T3

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

5 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la cadena ligera CDR3 del receptor 1 de folato humano

<400> 6
15 Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

20 <210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> anticuerpo humanizado o fragmento de unión al antígeno de este preferido que se une específicamente a la cadena pesada CDR2 del receptor 1 de folato humano

30 <400> 7
Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

35 Gly

40 <210> 8
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> anticuerpo del receptor anti-folato que es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la cadena pesada del receptor 1 de folato humano

<400> 8
50 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

55 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

60 Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

ES 2 815 353 T3

5 Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

10 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

15 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

20 Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

25 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

30 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

35 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

40 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

45 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

50 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

55 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

60 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

65 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

70 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

75 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

ES 2 815 353 T3

5 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

10 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

15 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

20 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

25 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

30 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

35 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

40 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

45 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

50 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 9

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> anticuerpo del receptor anti-folato que es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la cadena ligera del receptor 1 de folato humano

<400> 9

55 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

60 Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

ES 2 815 353 T3

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

5 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

10 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
65 70 75 80

15 Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

20 Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

25 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

30 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

35 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

40 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

45 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

50 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

55 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

60 <210> 10
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> anticuerpo del receptor anti-folato que es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente a la cadena ligera del receptor 1 de folato humano

<400> 10

ES 2 815 353 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

5 Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
 20 25 30

10 Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
 35 40 45

15 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
 50 55 60

20 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

25 Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

30 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

35 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

40 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

45 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

50 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

55 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

60 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 11
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 815 353 T3

<220>

<223> anticuerpo del receptor anti-folato que es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al dominio variable de cadena pesada del receptor 1 de folato humano

5

<400> 11

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

10

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

15

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

20

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

25

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

30

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

35

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

40

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

45

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

50

<220>

<223> anticuerpo del receptor anti-folato que es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al dominio variable de cadena ligera del receptor 1 de folato humano

55

<400> 12

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

60

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

65

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

ES 2 815 353 T3

5 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

10 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
65 70 75 80

15 Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

20 <210> 13
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> anticuerpo del receptor anti-folato que es un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno de este que se une específicamente al dominio variable de cadena ligera del receptor 1 de folato humano

30 <400> 13

35 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

40 Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

45 Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

50 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

55 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

60 Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

65 Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

60 <210> 14
<211> 445
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Anticuerpo: cadena pesada de longitud completa de huML66HC

5

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

10

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Leu Ser Leu Ala Ser Asn
20 25 30

15

Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

20

Gly Val Ile Trp Asn His Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Ile Lys
50 55 60

25

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

30

Lys Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Val
85 90 95

35

Arg Lys Gly Gly Ile Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val
100 105 110

40

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

45

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

50

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

55

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

60

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

65

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

70

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

ES 2 815 353 T3

210 215 220

5 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

10 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

15 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

20 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

25 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

30 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

35 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

40 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

45 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

50 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

55 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

60 <210> 15

ES 2 815 353 T3

<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Anticuerpo: cadena ligera de longitud completa de huML66LC

<400> 15

10 Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

15 Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu Met
20 25 30

20 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Leu Ala Ser His Arg Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

25 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

30 Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Asn Asp Pro Trp Thr
85 90 95

35 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

40 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

45 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

50 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

55 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

60 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

5
<210> 16
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> cadena pesada de inmunoglobulina de anticuerpo anti-EGFR

15
<400> 16
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

20 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

25 Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Cys Ile
35 40 45

30 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Thr Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60

35 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

40 Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

45 Ala Arg Tyr Asp Ala Pro Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

50 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

55 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

60 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

65 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

70 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser

ES 2 815 353 T3

180 185 190

5 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

10 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

15 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

20 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

25 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

30 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

35 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

40 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

45 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

50 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

55 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

60 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

65 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

70 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

75 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

ES 2 815 353 T3

420 425 430

5 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

10 <210> 17
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> cadena ligera de inmunoglobulina de anticuerpo anti-EGFR
<400> 17

20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

30 Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

35 His Tyr Thr Ser Thr Leu His Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

40 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

45 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Tyr
85 90 95

50 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

55 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

60 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

65 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

70 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

ES 2 815 353 T3

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

5
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

10 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 18
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
20 <223> cadena ligera de inmunoglobulina de anticuerpo anti-EGFR
<400> 18

25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

35 His Tyr Thr Ser Thr Leu His Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

40 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

45 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Leu Tyr
85 90 95

50 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

55 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

60 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

ES 2 815 353 T3

145 150 155 160

5 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

10 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

15 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

20 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

25 <210> 19
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cadena pesada de anticuerpo anti-CD19
 <400> 19

35 Gln Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

40 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Asn
 20 25 30

45 Trp Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

50 Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60

55 Gln Gly Lys Ala Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

60 Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

65 Ala Arg Gly Ser Asn Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

70 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

ES 2 815 353 T3

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 5
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 10 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 15 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 20 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 25 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 30 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 35 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 40 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 45 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 50 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 55 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 60 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

ES 2 815 353 T3

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

5

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

10

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

15

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

20

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

25

Gly Lys
 450

30

<210> 20
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> cadena ligera de anticuerpo anti-CD19
 <400> 20

40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

45

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Gly Val Asn Tyr Met
 20 25 30

50

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Arg Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45

55

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu
 65 70 75 80

65

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Gly Ser Tyr Thr Phe Gly
 85 90 95

70

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val

ES 2 815 353 T3

100 105 110
 5 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 115 120 125
 10 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 130 135 140
 15 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 145 150 155 160
 20 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 165 170 175
 25 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 180 185 190
 30 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 195 200 205
 35 Gly Glu Cys
 210
 <210> 21
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cadena pesada de anticuerpo anti-Muc1
 40 <400> 21
 Gln Ala Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 45 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 50 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 55 Gly Tyr Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 60 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

ES 2 815 353 T3

Met Gln Ile Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 5
 Ala Arg Gly Asp Ser Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 10
 Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 15
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 20
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 25
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 30
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 35
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 40
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 45
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 50
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 55
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 60
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

ES 2 815 353 T3

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

5 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

10 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

15 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

20 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

25 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

30 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

35 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 22
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
40 <223> cadena ligera de anticuerpo anti-Muc1

<400> 22

45 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

50 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala His Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

55 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

60 Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Gly Gly Ser
50 55 60

60 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu

ES 2 815 353 T3

65 70 75 80

5 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
 85 90 95

10 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

15 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

20 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

25 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

30 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

35 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

40 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

45 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

50 <210> 23
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> cadena pesada de inmunoglobulina de anticuerpo anti-CD33
 <400> 23

60 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

65 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

70 Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

ES 2 815 353 T3

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

5

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

10

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

15

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

20

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

25

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

30

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

35

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

40

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

45

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

50

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

55

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

60

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

65

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

70

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

ES 2 815 353 T3

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

5 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

10 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

15 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

20 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

25 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

30 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

35 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

40 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 24
<211> 219
<212> PRT
45 <213> Artificial

<220>
<223> cadena ligera de inmunoglobulina de anticuerpo anti-CD33

50 <400> 24

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

55 Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser
20 25 30

60 Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln

ES 2 815 353 T3

35 40 45
 5 Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 10 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 15 Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 20 Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 25 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 30 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 35 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 40 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 45 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 50 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 55 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 60 <210> 25
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cadena ligera de inmunoglobulina de anticuerpo anti-CD37
 <400> 25
 65 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15

ES 2 815 353 T3

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Arg Ser Asn
20 25 30

5
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Val
35 40 45

10
Asn Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

15
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

20
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Trp Gly Thr Thr Trp
85 90 95

25
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

30
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

35
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

40
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

45
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

50
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

55
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 26
<211> 444
<212> PRT
<213> artificial

<220>
60 <223> cadena pesada de inmunoglobulina de anticuerpo anti-CD37

<400> 26

5 Gln Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15

10 Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

15 Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

20 Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

25 Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

30 Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

35 Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

40 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125

45 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

50 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

55 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

60 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

65 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

70 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

75 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu

ES 2 815 353 T3

225 230 235 240

5 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

10 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

15 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

20 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

25 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

30 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

35 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

40 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

45 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

50 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

55 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

60 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

65 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

70 <210> 27
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 815 353 T3

<220>

<223> cadena pesada de inmunoglobulina de anticuerpo anti-CD37

<400> 27

5
Gln Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

10
Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
20 25 30

15
Gly Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

20
Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Ser Leu Lys
50 55 60

25
Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

30
Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

35
Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

40
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

45
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

50
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

55
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

60
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

65
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

70
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

ES 2 815 353 T3

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

5

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

10

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

15

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

20

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

25

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

30

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

35

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

40

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

45

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

50

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

55

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

60

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 28
 <211> 213
 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> cadena ligera de inmunoglobulina de anticuerpo anti-CD37

5

<400> 28

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

10

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30

15

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

20

Asp Thr Ser Asn Leu Pro Tyr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

25

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

30

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Pro Thr
85 90 95

35

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

40

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

45

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

50

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

55

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

60

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

65

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

70

Asn Arg Gly Glu Cys

210

5 <210> 29
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <220>
 <223> cadena pesada de inmunoglobulina de anticuerpo anti-CD37

<400> 29

15 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

20 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Phe Ala Trp His Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

25 Met Gly Tyr Ile Leu Tyr Ser Gly Ser Thr Val Tyr Ser Pro Ser Leu
 50 55 60

30 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe
 65 70 75 80

35 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

40 Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

45 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

50 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

55 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

60 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

ES 2 815 353 T3

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 5
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 10
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 15
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 20
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 25
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 30
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 35
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 40
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 45
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 50
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 55
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 60
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

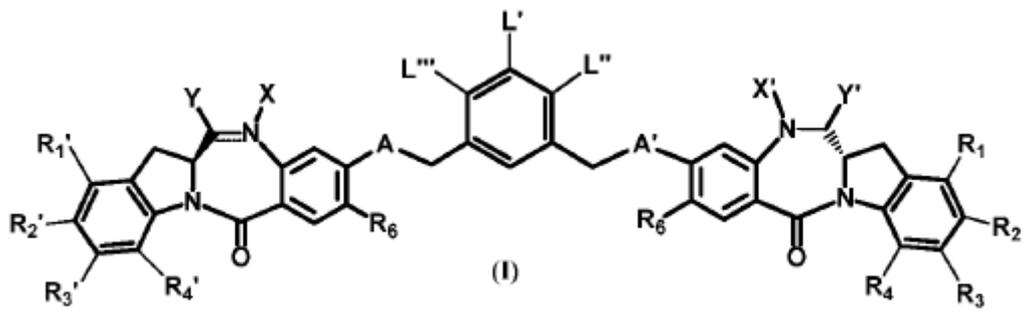
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

5

Gly

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto citotóxico representado por la siguiente fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:
L' se representa por la siguiente fórmula:

- NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-J (B1);
- NR₅-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_{m'}-J (B2); or
- NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^s (B3); or

donde:

P es un residuo de aminoácido o un péptido que contiene entre 2 y 20 residuos de aminoácidos;

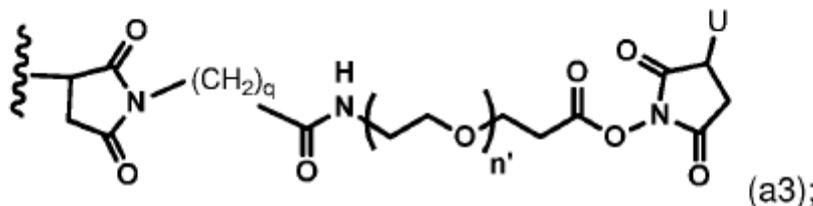
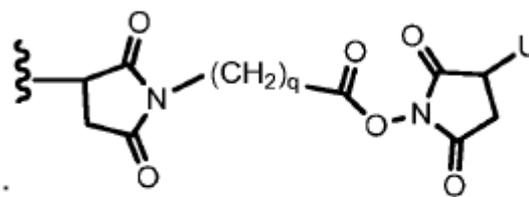
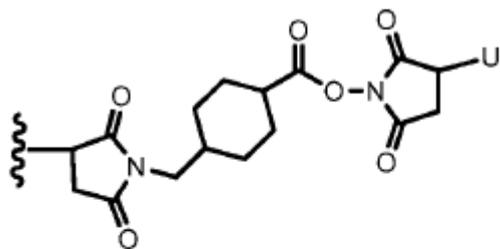
J es un éster de N-hidroxisuccinimida, éster de N-hidroxisulfosuccinimida, éster de nitrofenilo, éster de dinitrofenilo, éster de sulfo-tetrafluorfenilo y éster de pentafluorfenilo;

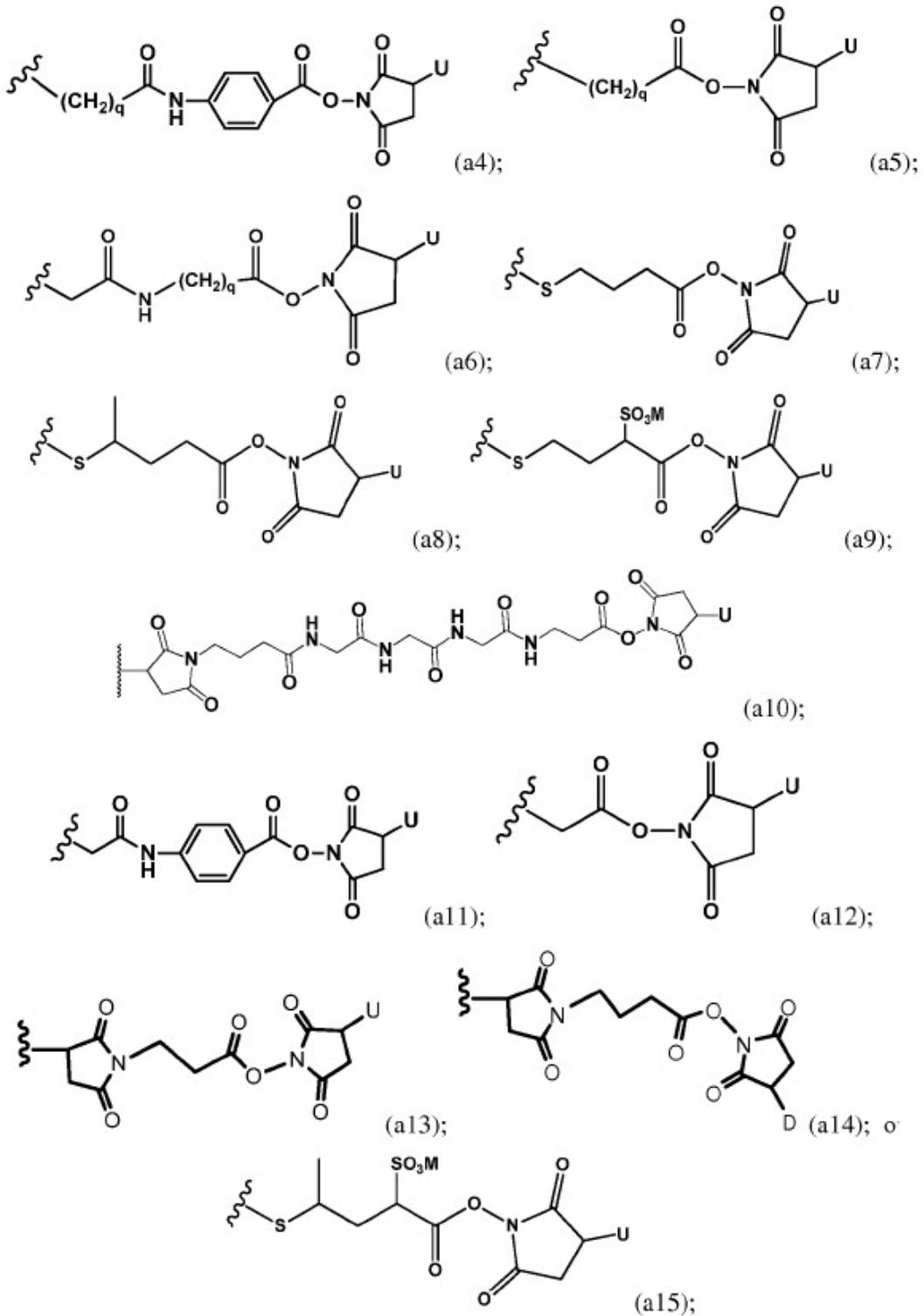
R_a y R_b, para cada aparición, son cada uno independientemente -H, alquilo (C₁-C₃) o un sustituyente cargado o un grupo ionizable Q, donde Q es SO₃H o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

m es un número entero de 1 a 6;

m' es 0 o un número entero de 1 a 6;

Cy es un alquilo cíclico que tiene 5 o 6 átomos de carbono en el anillo opcionalmente sustituido con halógeno, -OH, alquilo (C₁-C₃), alcoxi (C₁-C₃) o haloalquilo (C₁-C₃); y Z^s es -H, -SR_d, -C(=O)R_{d1} o se selecciona de cualquiera de las siguientes fórmulas:





donde:

- 5 q es un número entero de 1 a 5;
 n' es un número entero de 2 a 6;
 U es -H o SO₃M;

M es H⁺, Na⁺ o K⁺;

R^d es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono o se selecciona de fenilo, nitrofenilo, dinitrofenilo, carboxinitrofenilo, piridilo o nitropiridilo; y

R^{d1} es un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono;

5

L" y L" son ambos -H;

la línea doble = entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, siempre que cuando sea un enlace doble X esté ausente e Y sea -H, o un alquilo lineal o ramificado que tenga de 1 a 4 átomos de carbono, y cuando sea un enlace simple, X sea -H, Y sea -OH o -SO₃M;

10 R₁, R₂, R₃, R₄, R₁' , R₂' , R₃' y R₄' son todos -H;

R₆ es OMe;

X' e Y' son ambos -H;

A y A' son -O-; y

M es H, Na⁺ o K⁺; y

15 para cada aparición R₅ es independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde L' está representado por las siguientes fórmulas:

20 -NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-J (B1); o

-NR₅-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_m'-J (B2),

opcionalmente donde ambos R_a y R_b son H; Cy para la fórmula (B2) es ciclohexano; R₅ es H o Me y m' es 0 o 1.

25 3. El compuesto de la reivindicación 2, donde L' está representado por la formula B1.

4. El compuesto de la reivindicación 1, donde L' está representado por la siguiente formula:

-NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^s (B3),

30

opcionalmente, donde:

(i) ambos R_a y R_b son -H y R₅ es H o Me, o

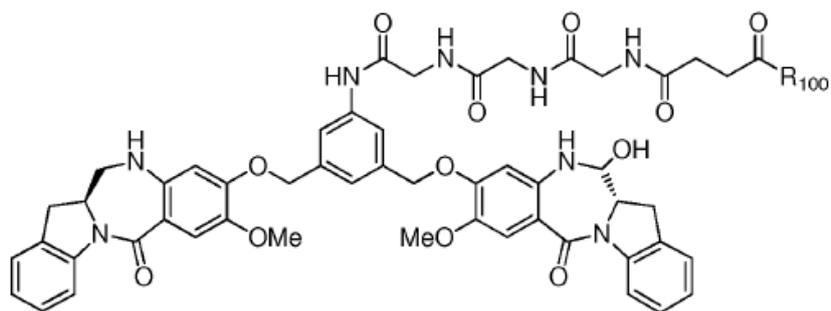
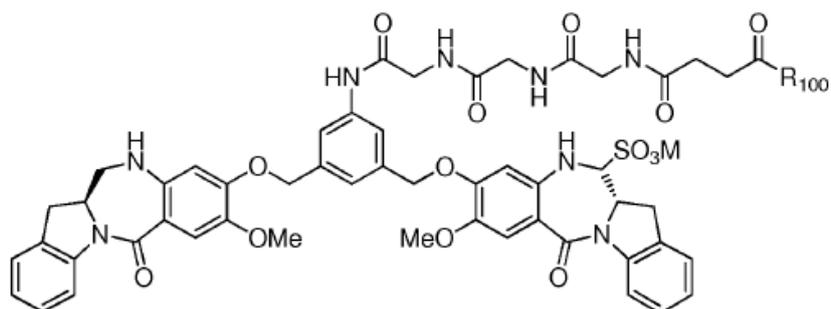
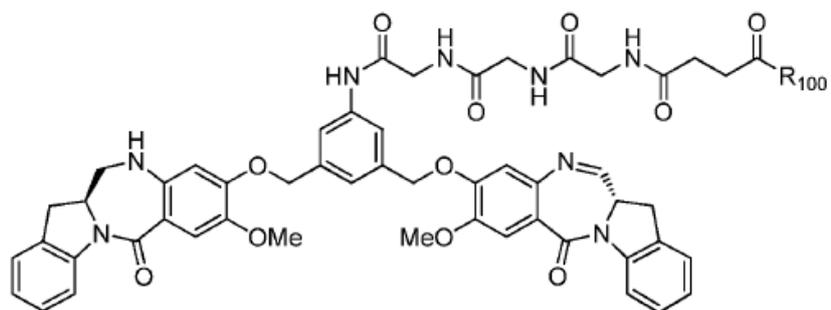
(ii) -(CR_aR_b)_m' es -(CH₂)_m'-C(Me₂)- y m' es un entero entre 1 y 5.

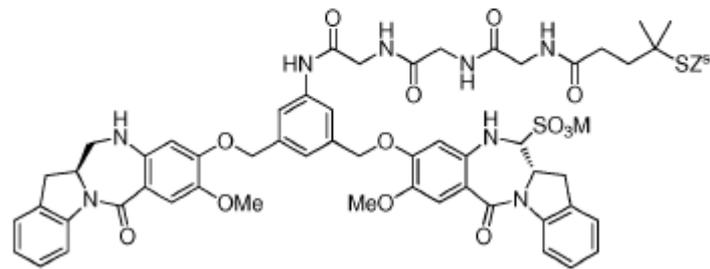
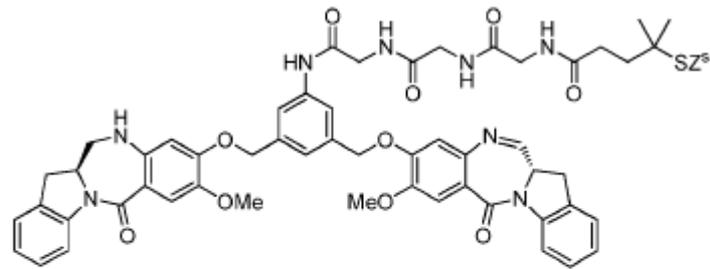
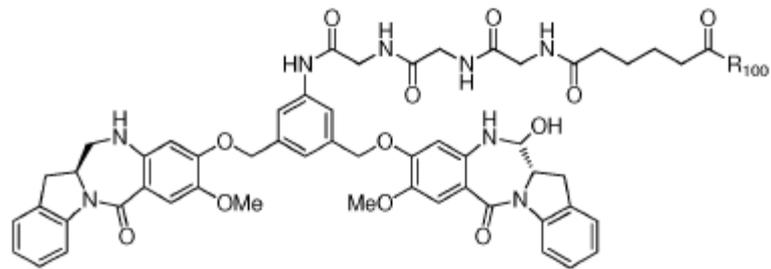
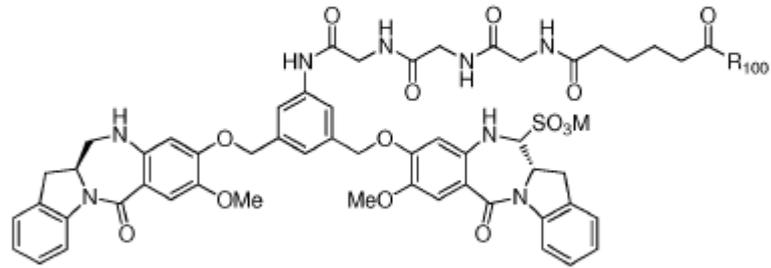
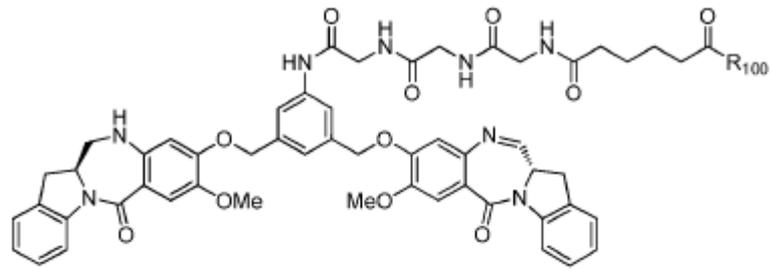
35

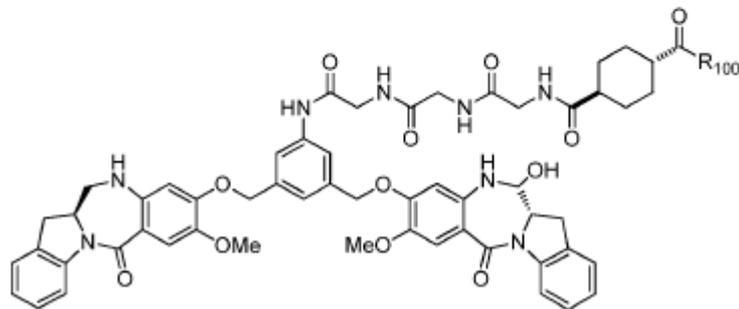
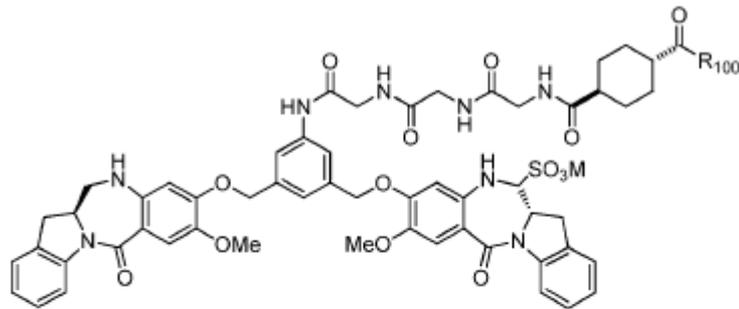
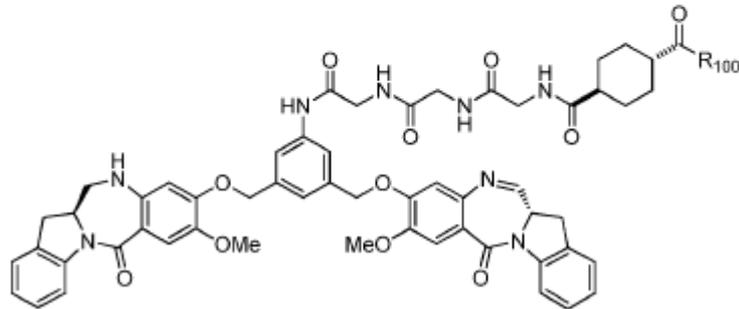
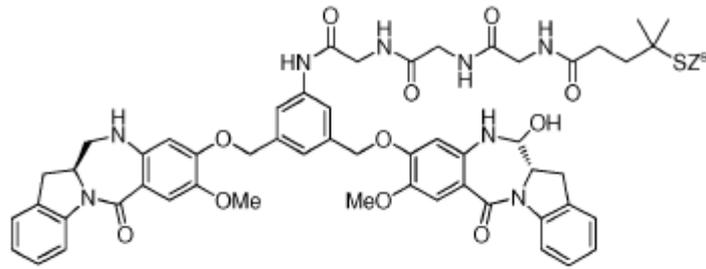
5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde P es un péptido que contiene de 2 a 5 residuos de aminoácidos.

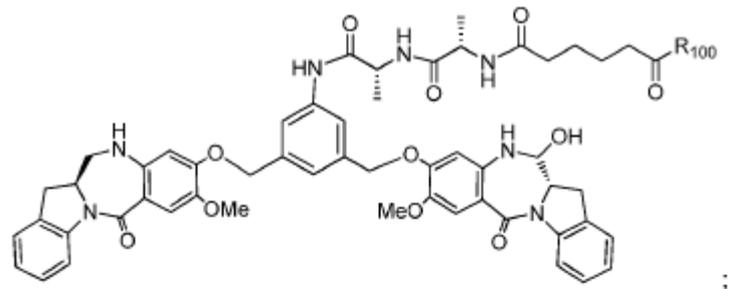
6. El compuesto de la reivindicación 5 caracterizado por que P se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosil-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu y Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met y Met-Ala.

45 7. El compuesto de la reivindicación 1 caracterizado por que el compuesto se selecciona de cualquiera de las siguientes fórmulas:

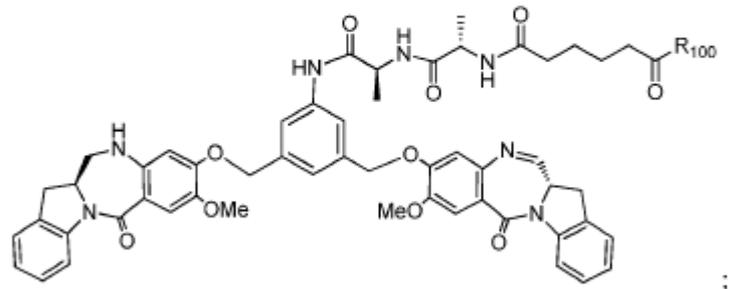




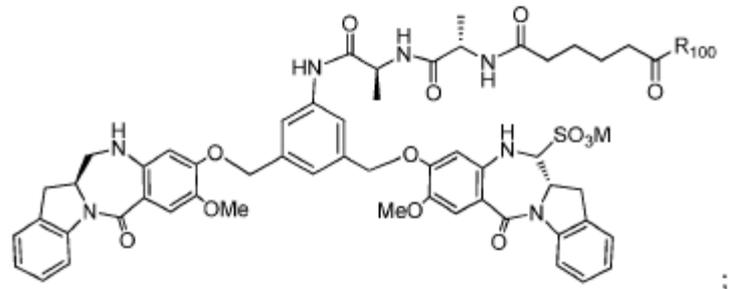




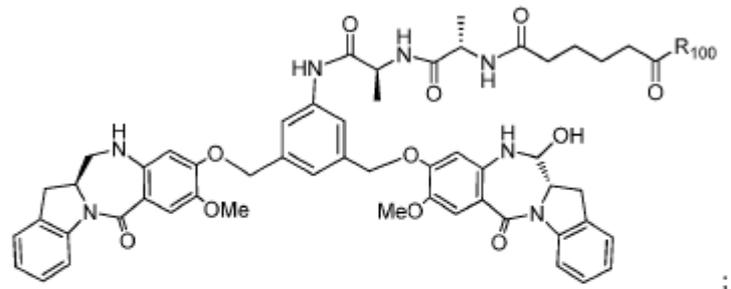
;



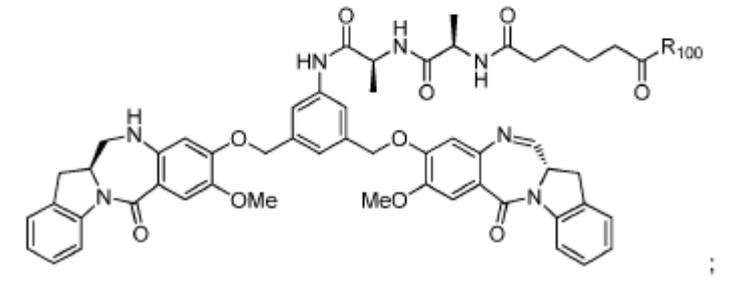
;



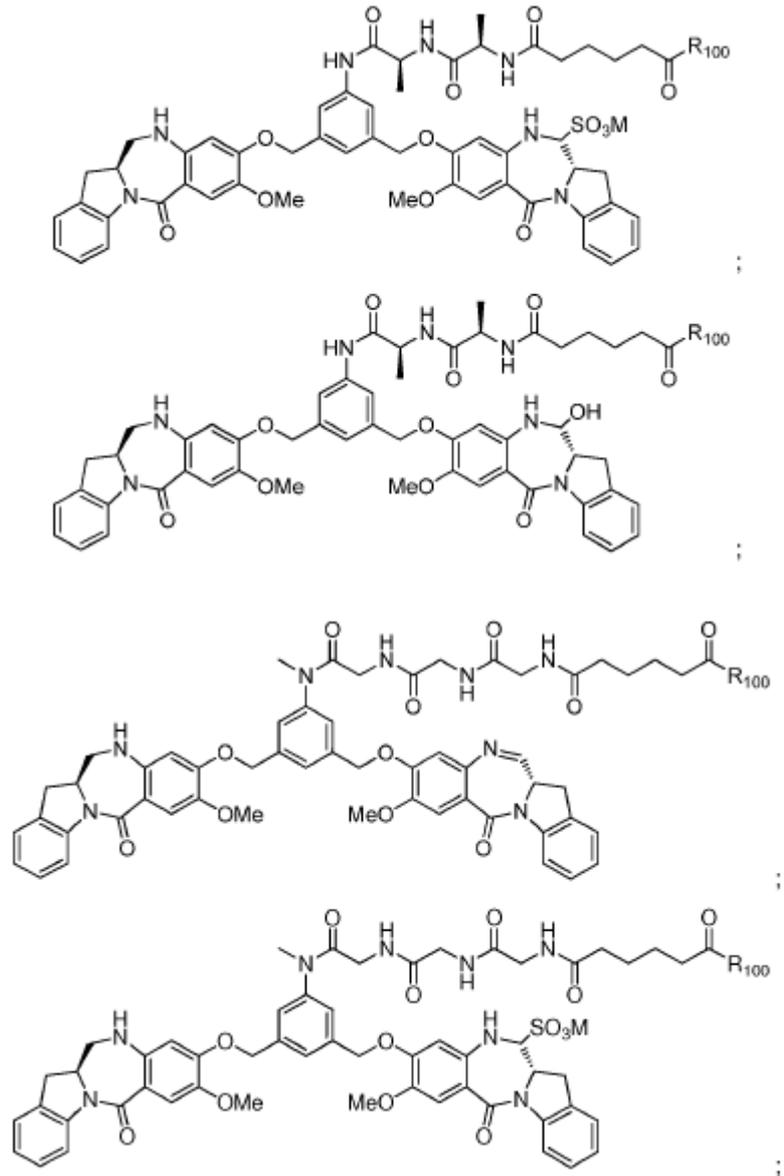
;

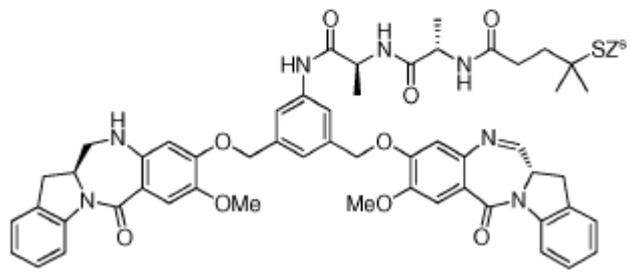
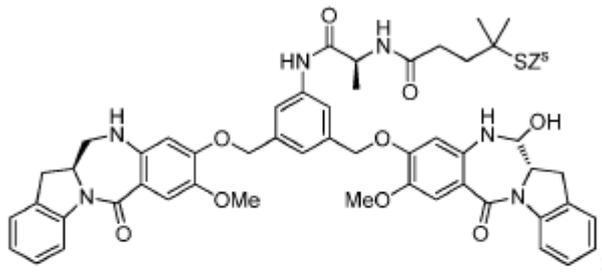
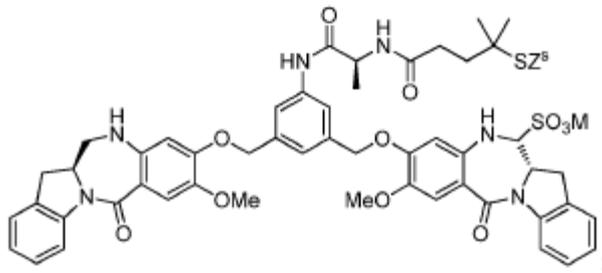
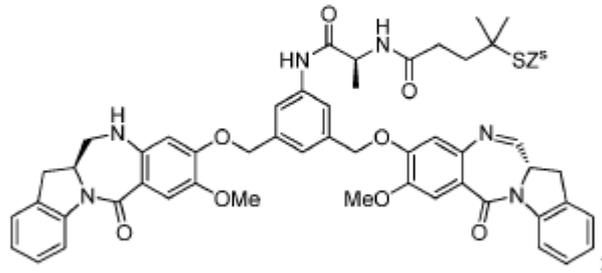
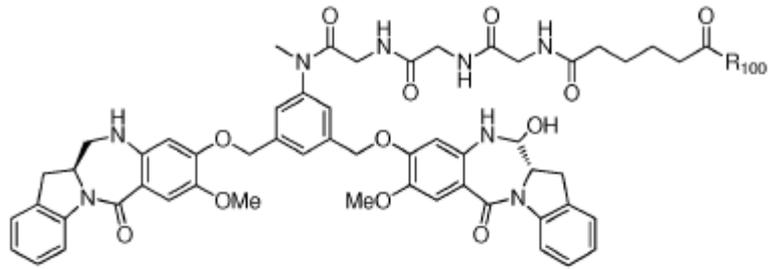


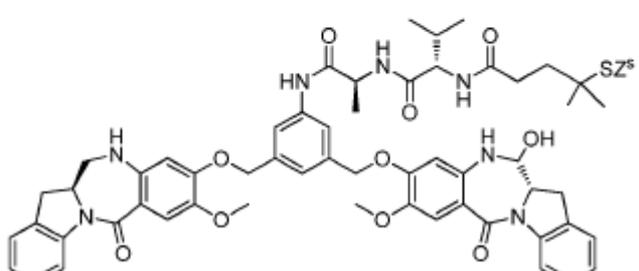
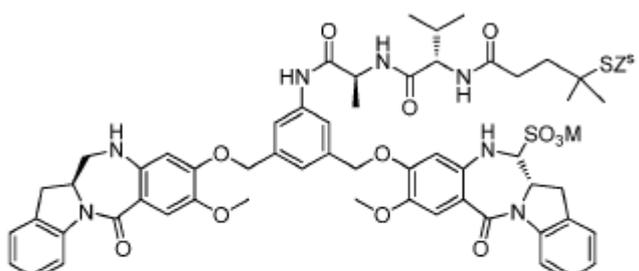
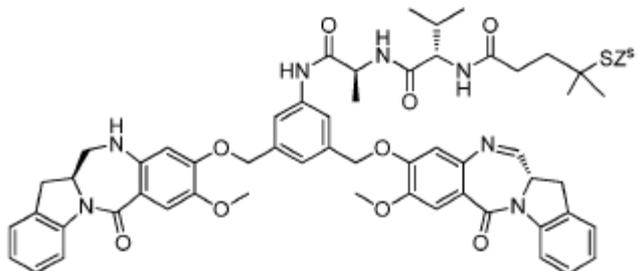
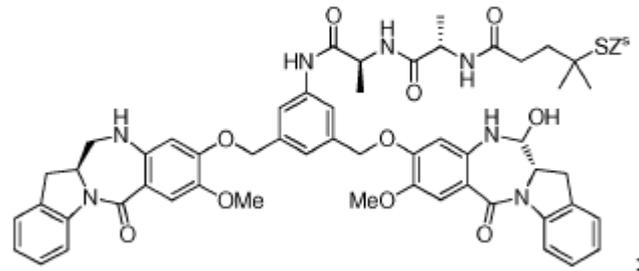
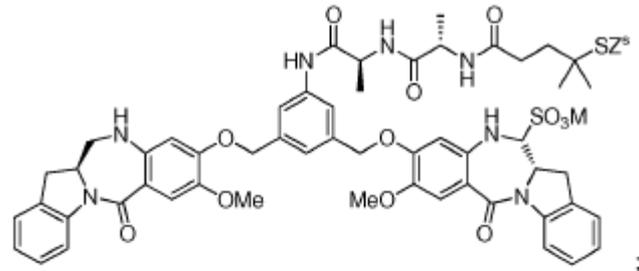
;

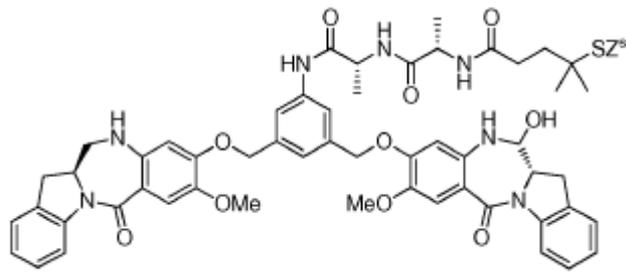
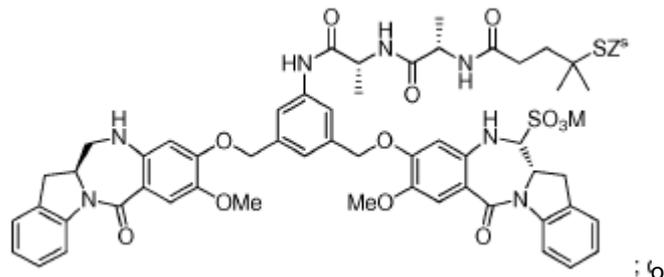
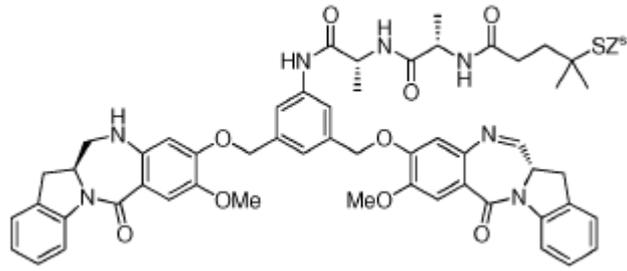


;

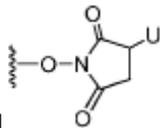






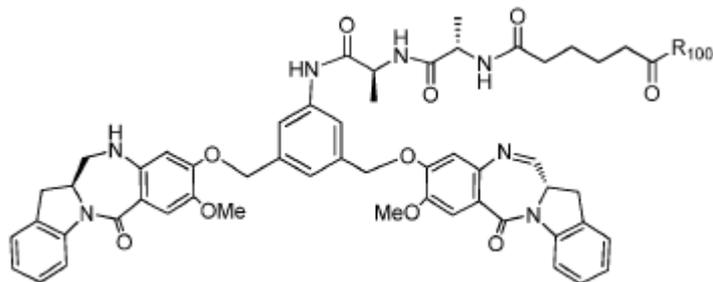


o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, donde:

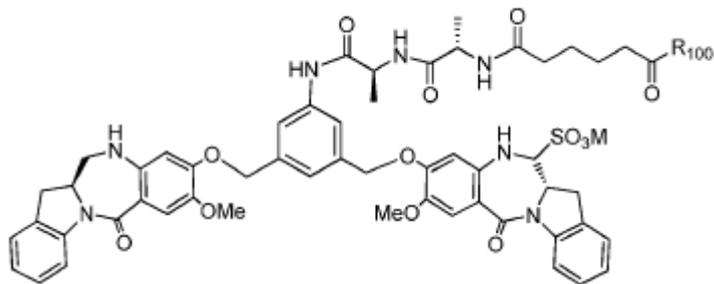


5 R₁₀₀ es -OH

8. El compuesto de la reivindicación 7 donde el compuesto está representado por las siguientes formulas:

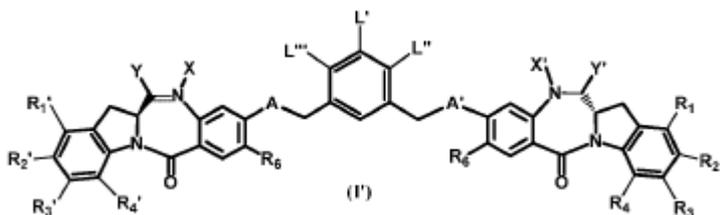


9



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

9. Un conjugado que comprende un compuesto citotóxico y un agente de unión celular (CBA), en donde el compuesto citotóxico está unido de forma covalente al CBA, y en donde dicho compuesto citotóxico está representado por la siguiente fórmula:



10 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, donde:

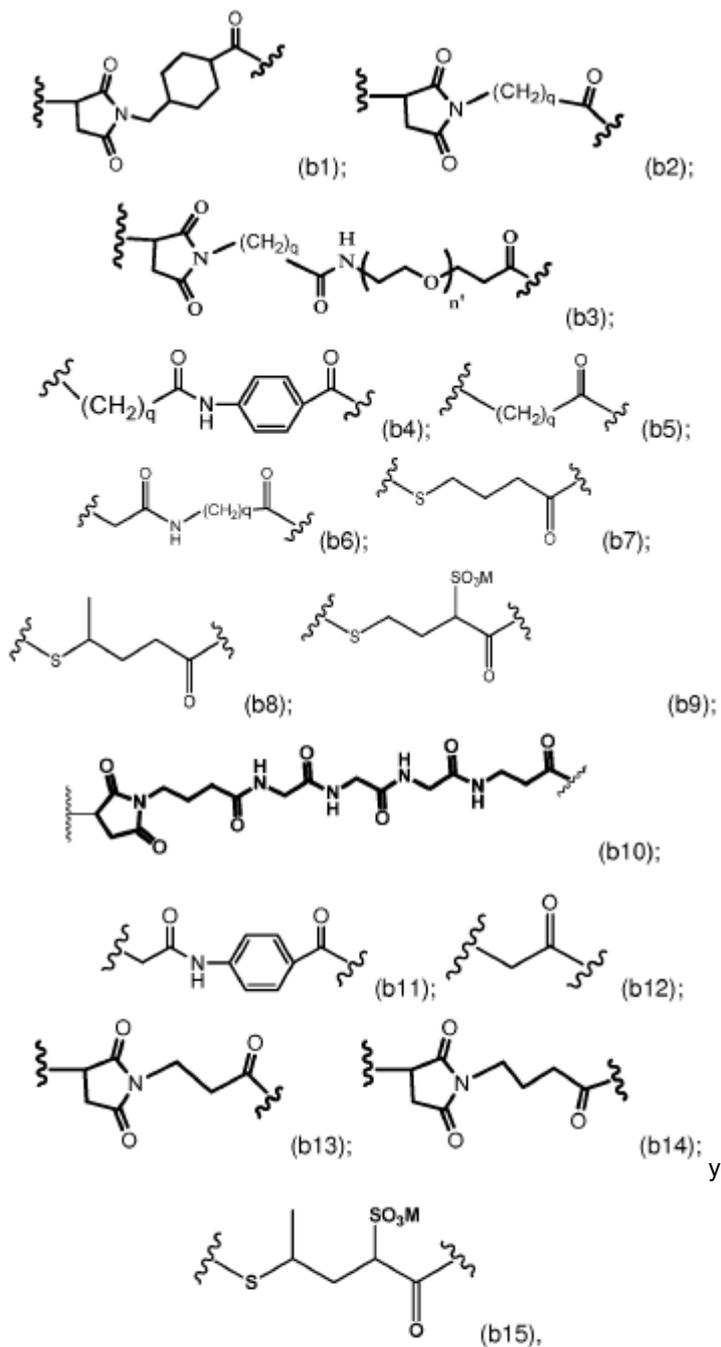
el agente de unión celular es un anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la célula diana, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se une específicamente a una célula diana, un anticuerpo quimérico, un fragmento de anticuerpo quimérico que se une específicamente a la célula objetivo, un anticuerpo de dominio, un fragmento de anticuerpo de dominio que se une específicamente a la célula objetivo, una lincocina, una hormona, una vitamina, un factor de crecimiento, un factor estimulante de colonias o un molécula de transporte de nutrientes;

L' se representa por la siguiente fórmula:

- NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-J' (B1');
- NR₅-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_m-J' (B2');
- NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{S1} (B3'); o

donde

- P es un residuo de aminoácido o un péptido que contiene entre 2 y 20 residuos de aminoácidos;
- J' es -C(=O)- que está unido por enlace covalente al agente de unión celular;
- R_a y R_b, para cada aparición, son cada uno independientemente -H, (C₁-C₃)alquilo o un sustituyente cargado o un grupo ionizable Q; , donde Q es SO₃H o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;
- m es un entero entre 1 y 6;
- m' es 0 o un entero entre 1 y 6;
- Cy es un alquilo cíclico que tiene 5 o 6 átomos de carbono de anillo opcionalmente sustituidos con halógeno, -OH, (C₁-C₃)alquilo, (C₁-C₃)alcoxi o halo(C₁-C₃)alquilo,
- Z^{S1} se selecciona de cualquiera de las siguientes fórmulas:



5 donde:

q es un entero entre 1 y 5;

n' es un entero de 2 a 6;

U es -H o SO₃M; y

10 M es H⁺, Na⁺ o K⁺,

L" y L'" son ambos -H;

la línea doble ~ entre N y C representa un enlace simple o un enlace doble, siempre que cuando sea un enlace doble, X esté ausente e Y sea -H, o un alquilo lineal o ramificado que tenga de 1 a 4 átomos de carbono, y cuando sea un

enlace sencillo, X sea -H, Y sea -OH o -SO₃M;

R₁, R₂, R₃, R₄, R₁', R₂', R₃' y R₄' son todos -H;

R₆ es -OMe;

X' e Y' son ambos -H;

A y A' son -O-; y

M es H, Na⁺ o K⁺; y

R₅ para cada aparición es independientemente -H o un alquilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que tiene de 1 a 10 átomos de carbono.

10. El conjugado de la reivindicación 9, donde L' está representado por las siguientes fórmulas:

-NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-J' (B1'); o

-NR₅-P-C(=O)-Cy-(CR_aR_b)_m'-J' (B2'),

opcionalmente donde R_a y R_b son ambos H; Cy para la fórmula B2' es ciclohexano; R₅ es H o Me; y m' es 0 o 1.

11. El conjugado de la reivindicación 10, donde L' está representado por la fórmula B1.

12. El conjugado de la reivindicación 9, donde L' está representado por la siguiente fórmula:

-NR₅-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1} (B3'),

opcionalmente donde:

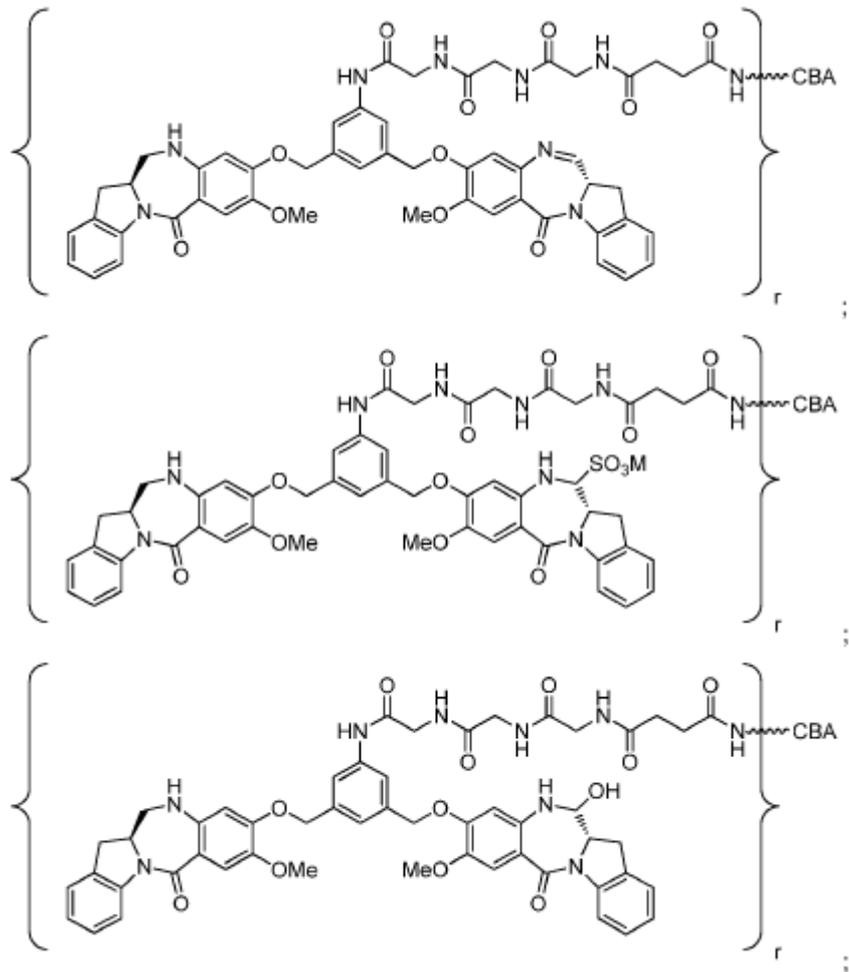
(i) ambos R_a y R_b son -H y R₅ es H o Me; o

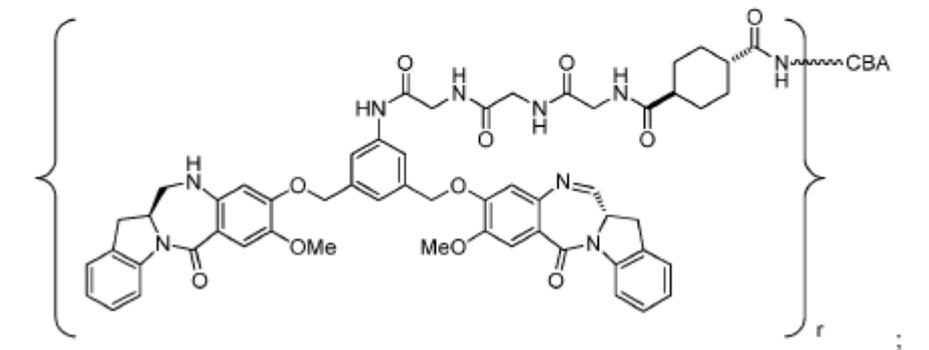
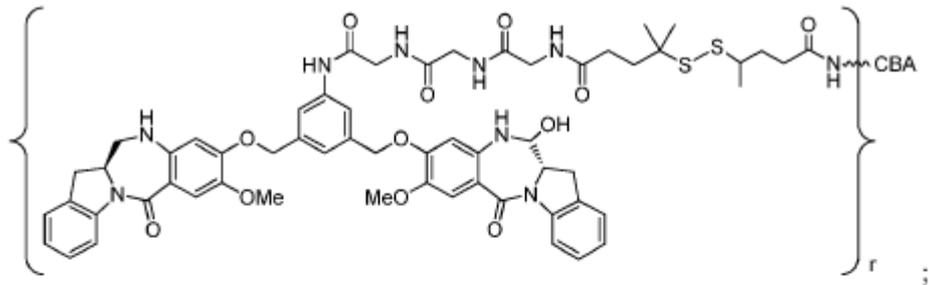
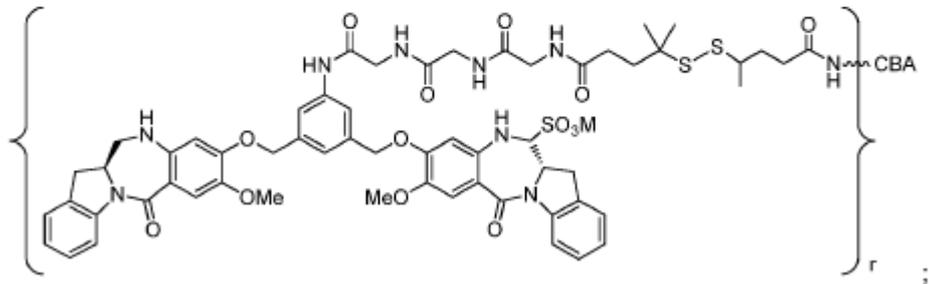
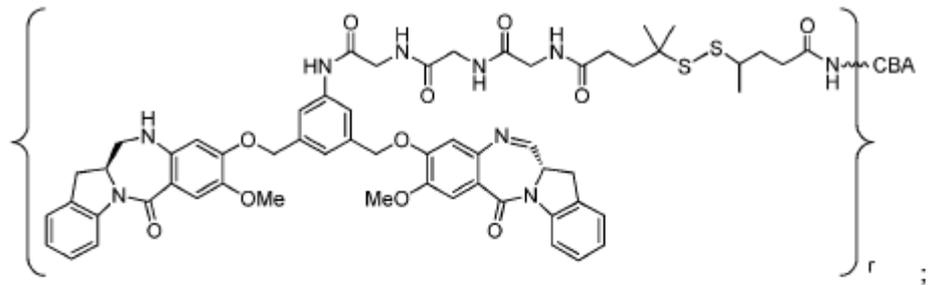
(ii)-(CR_aR_b)_m- es -(CH₂)_m-C(Me₂)- y mⁿ es un entero entre 1 y 5.

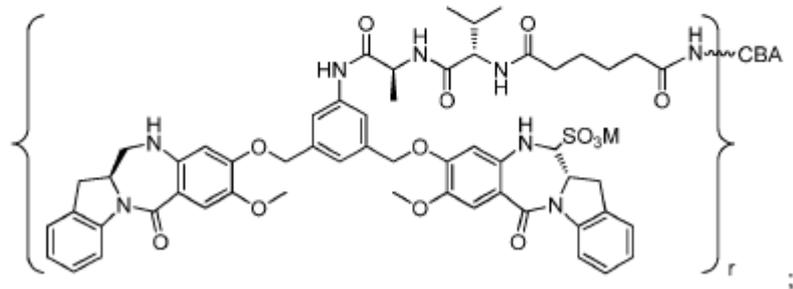
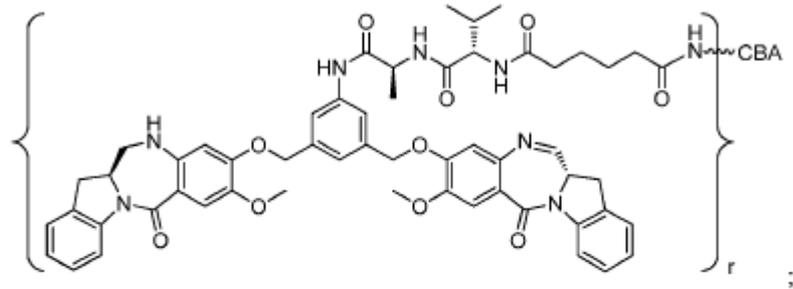
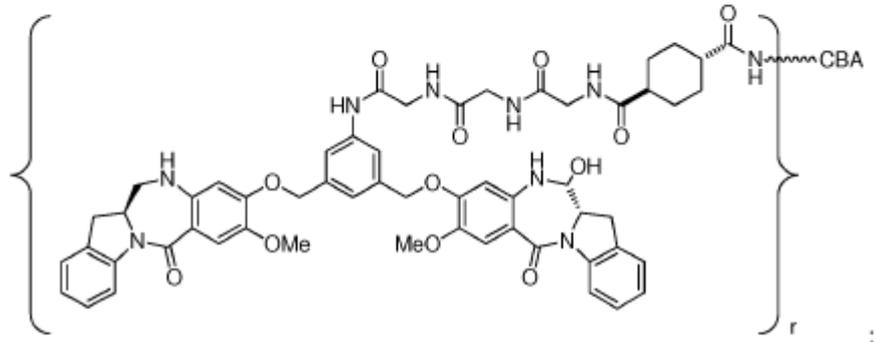
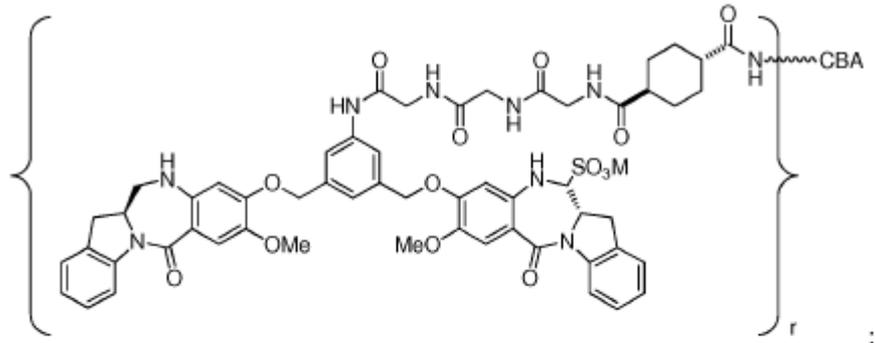
13. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 9-12, donde P es un péptido que contiene de 2 a 5 residuos de aminoácidos.

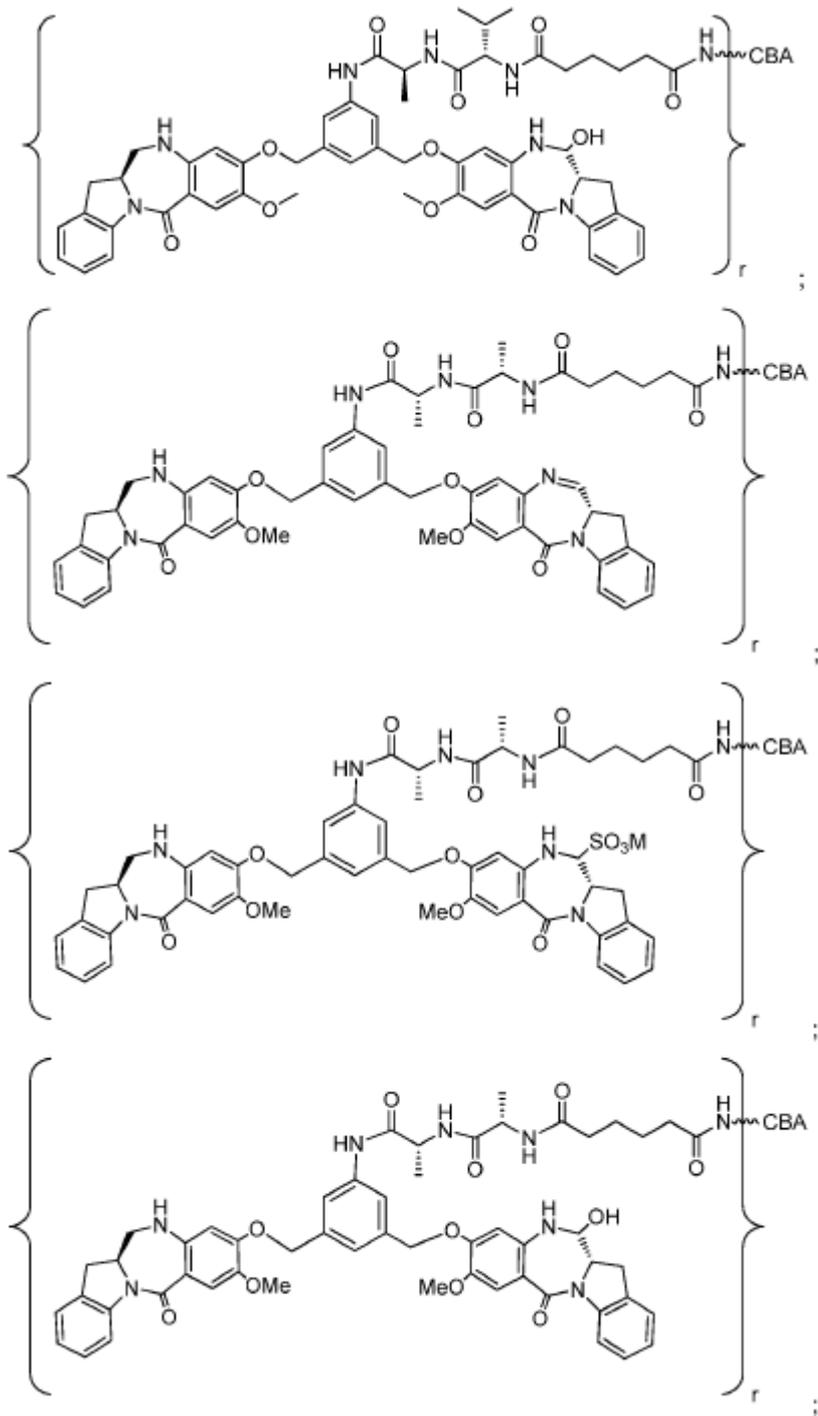
14. El conjugado de la reivindicación 13 caracterizado por que P se selecciona de Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-tosil-Arg, Phe-N⁹-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met y Met-Ala.

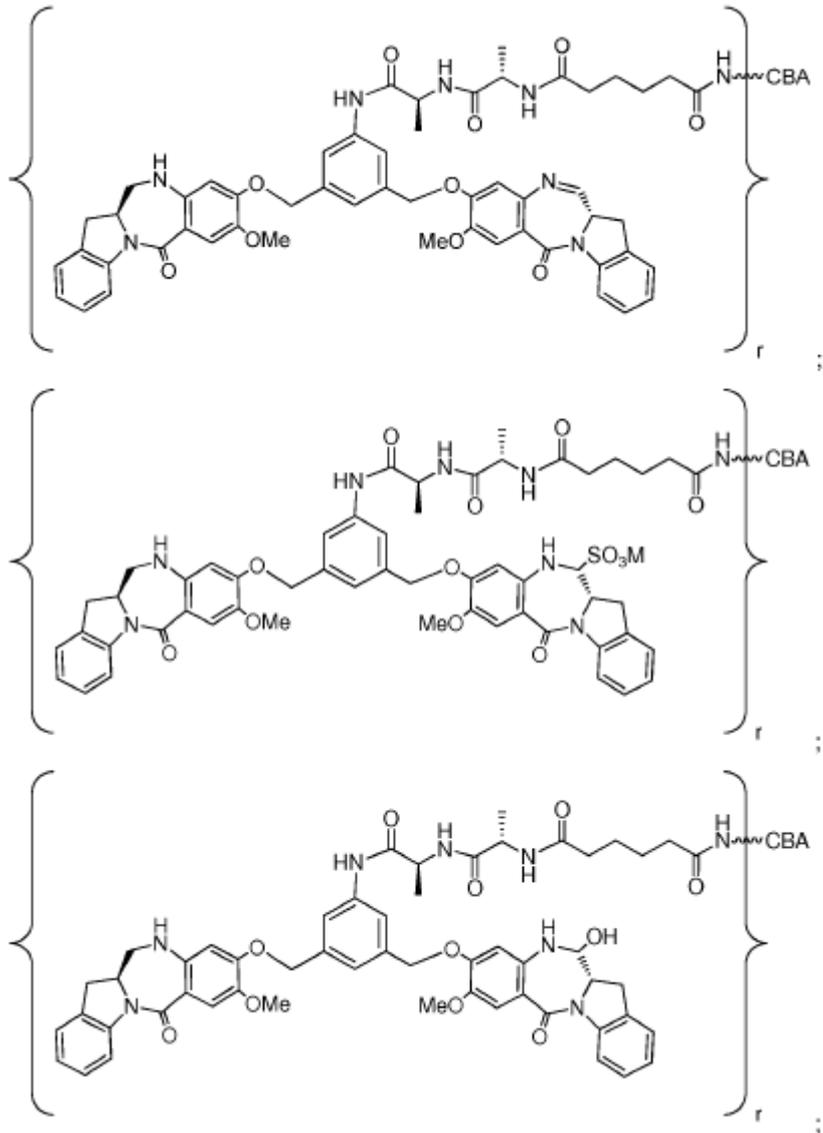
15. El conjugado de la reivindicación 9, donde el compuesto se selecciona de una cualquiera de las siguientes fórmulas:

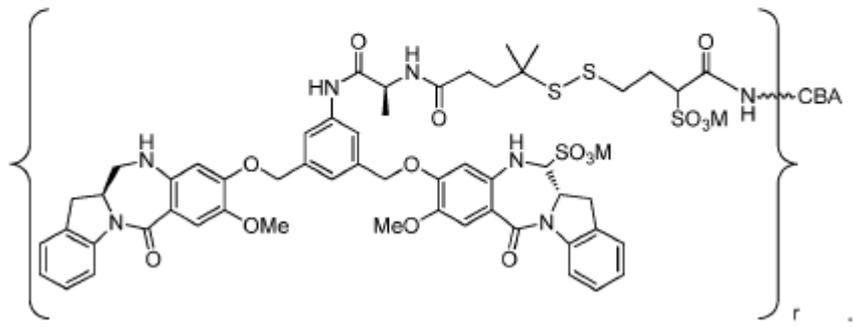
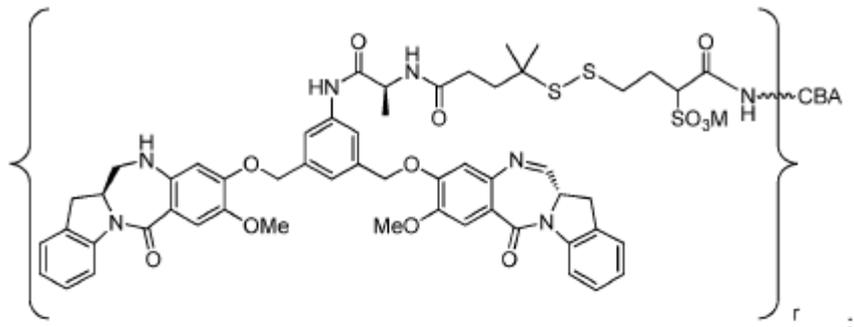
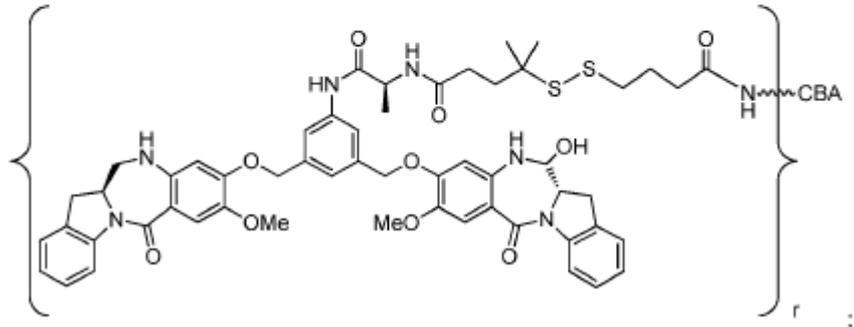
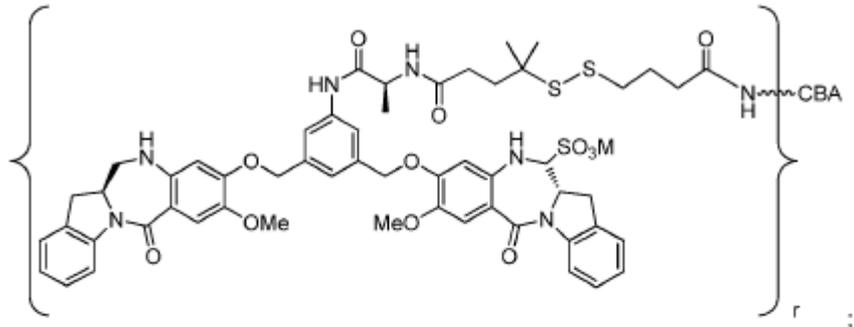


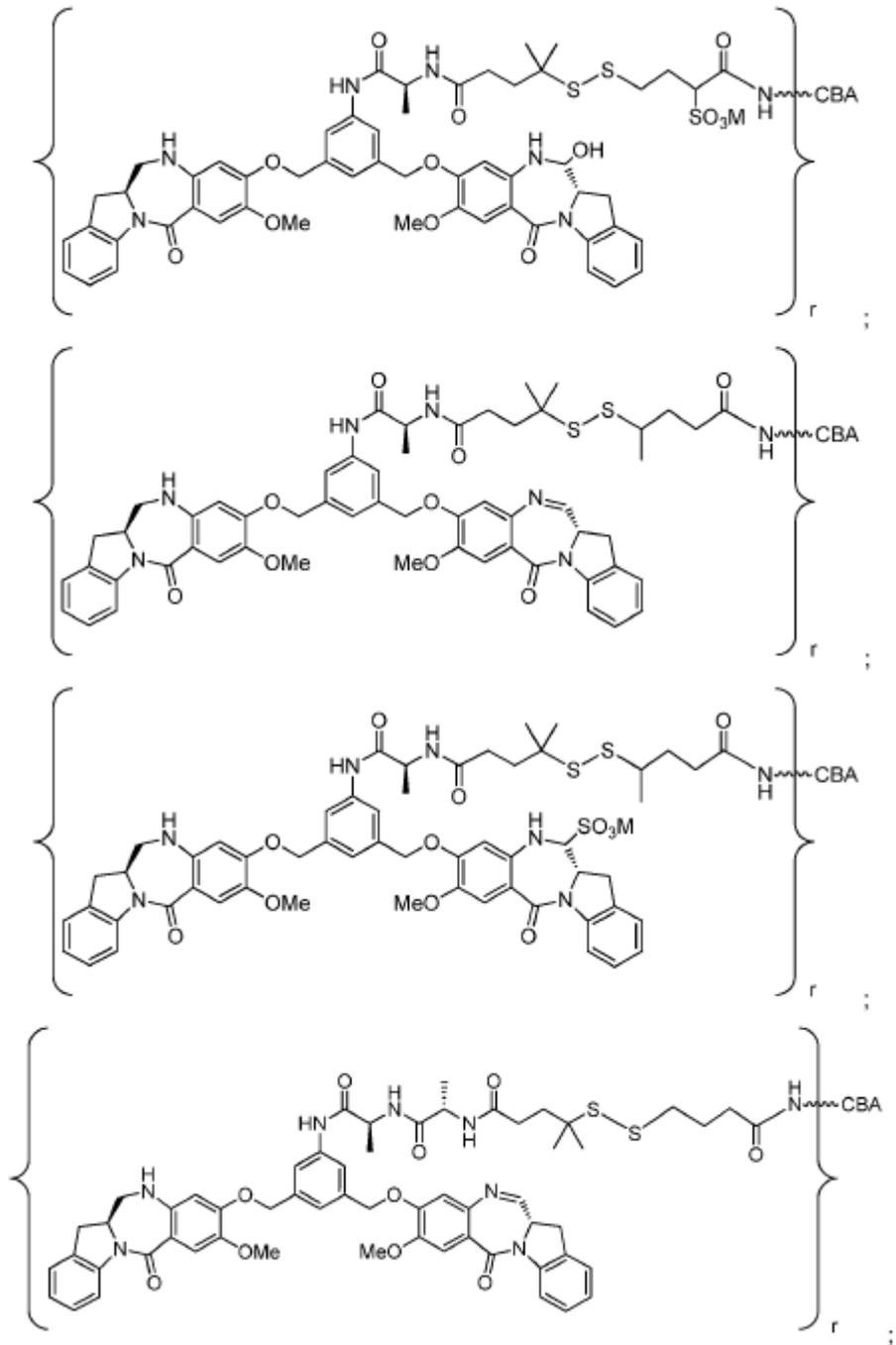


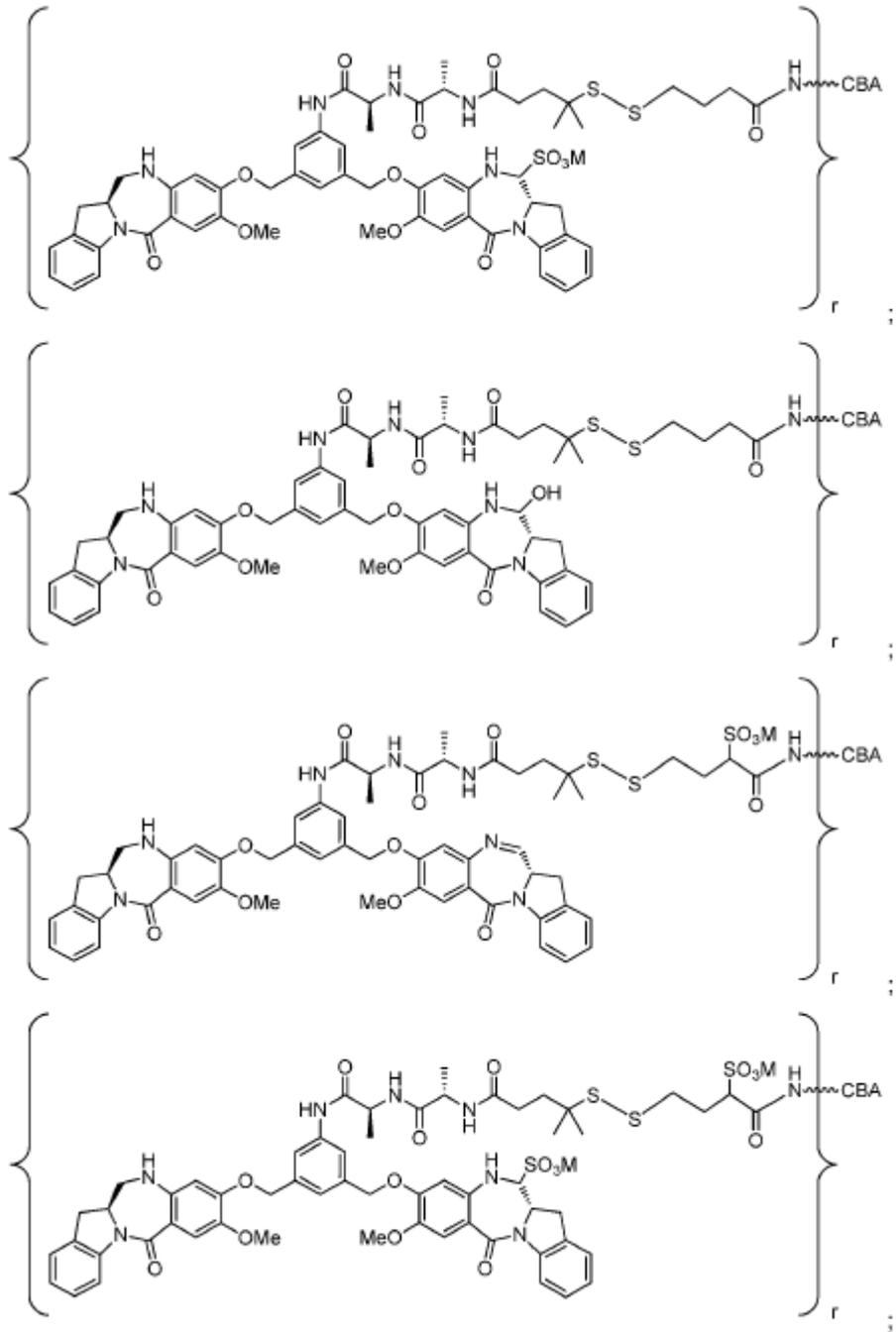


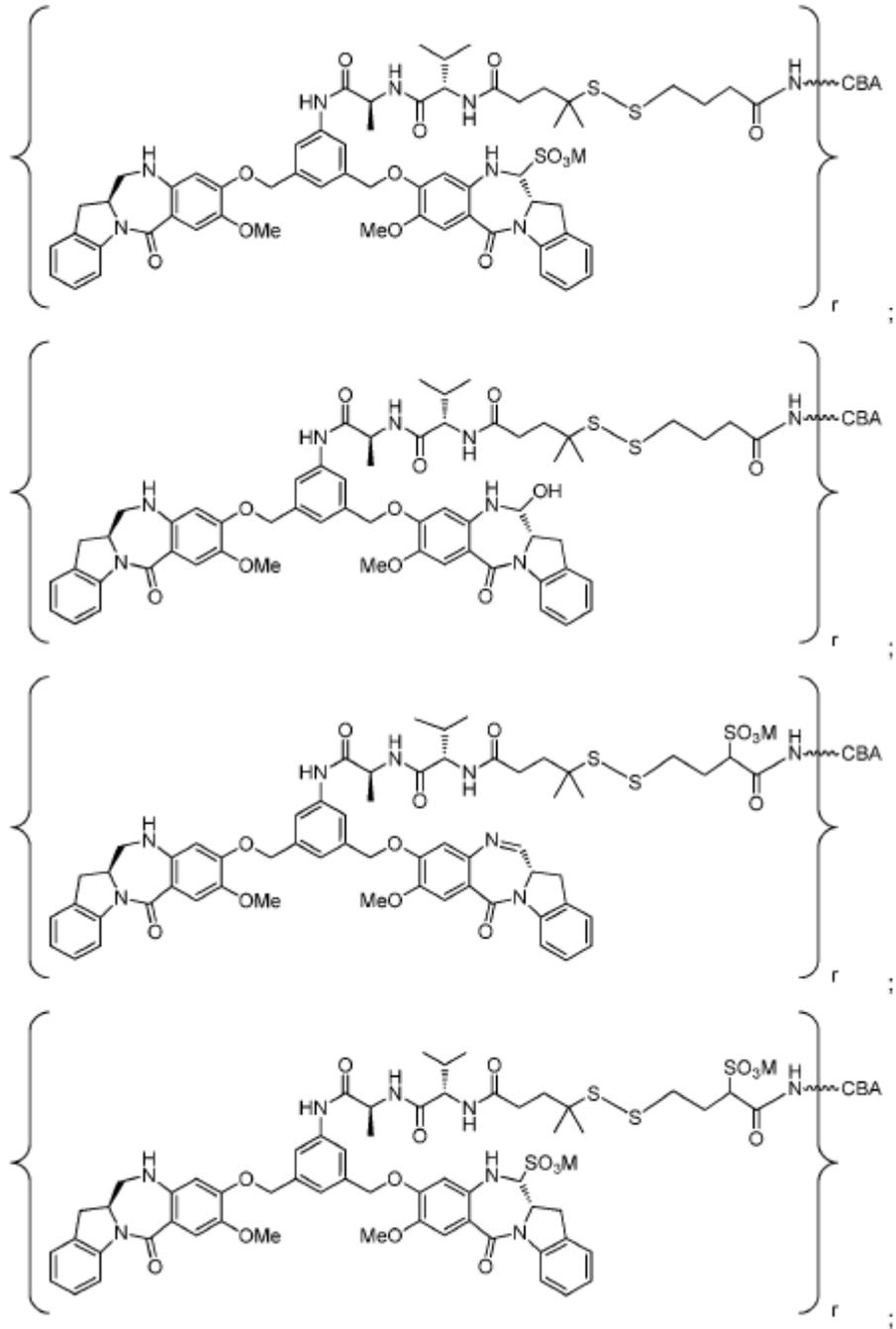


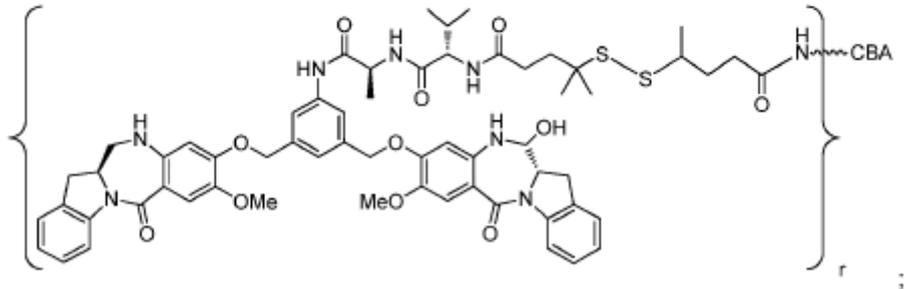
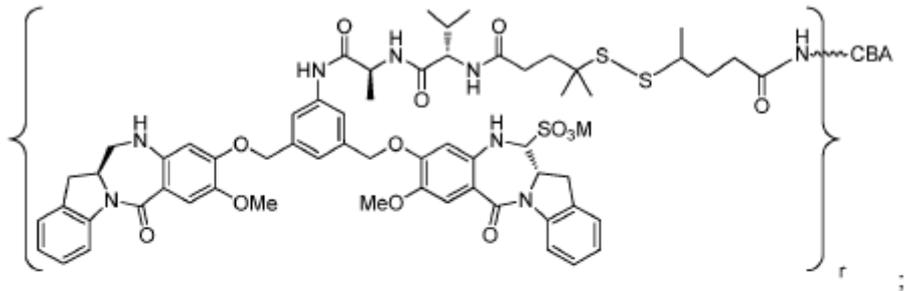
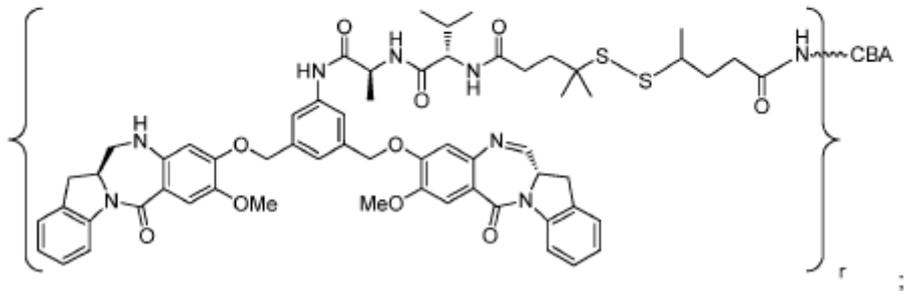
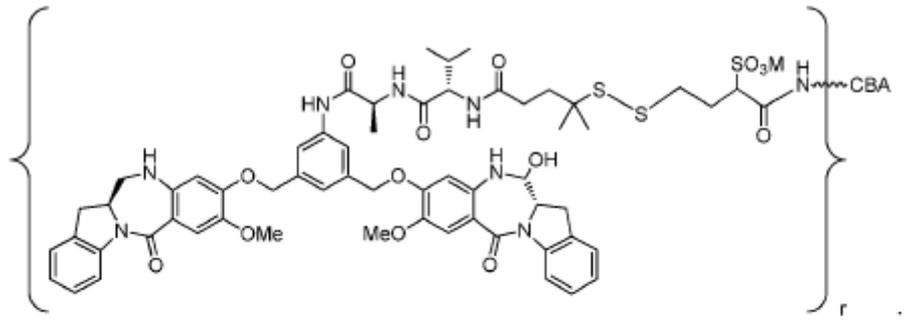


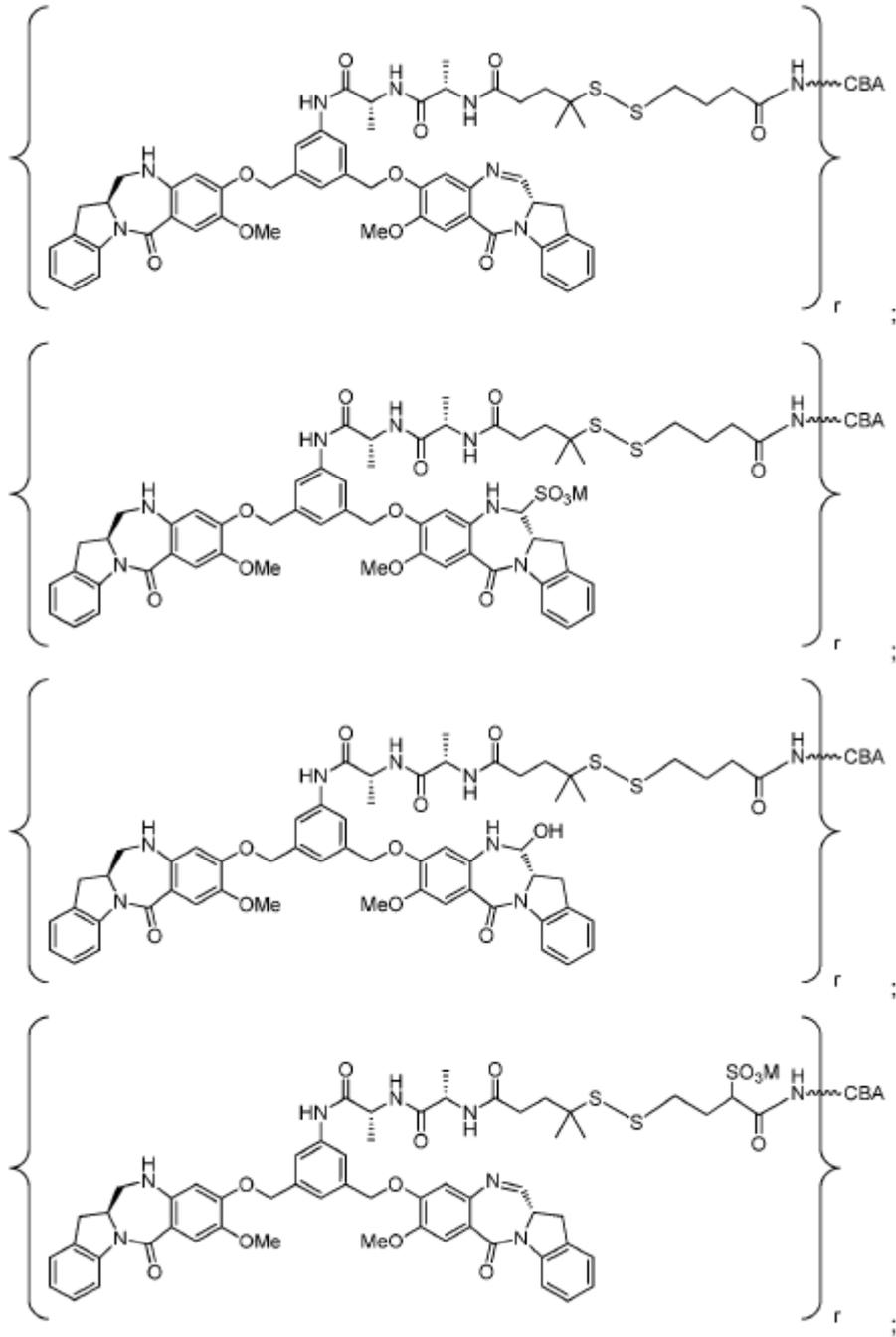


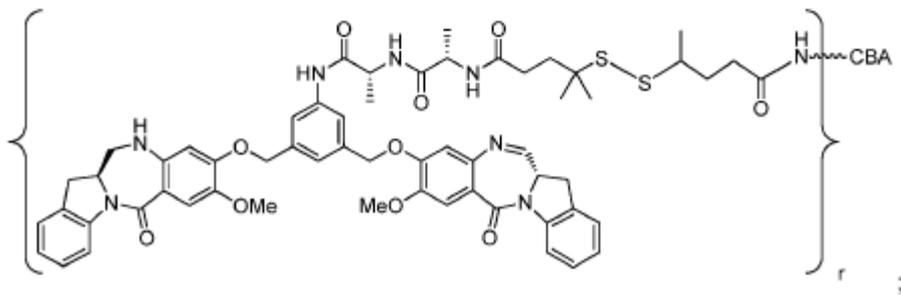
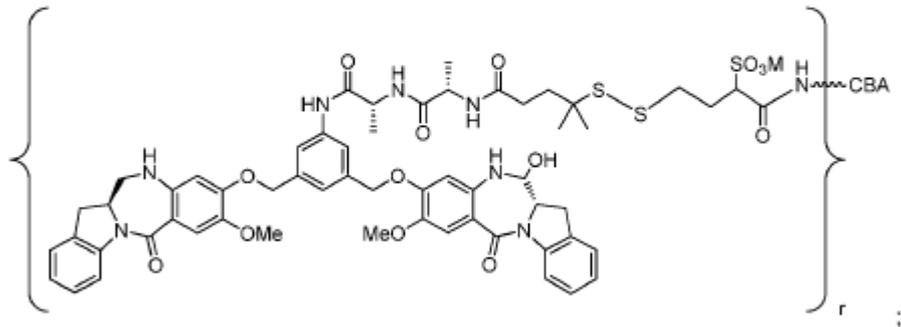
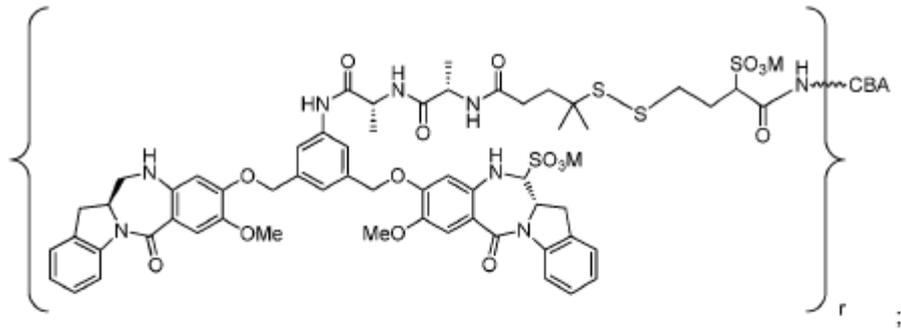




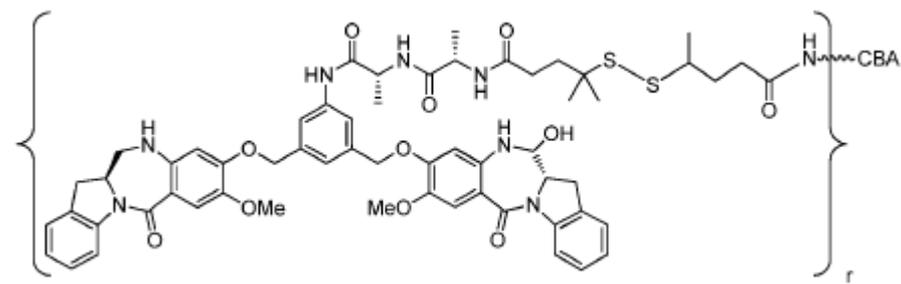
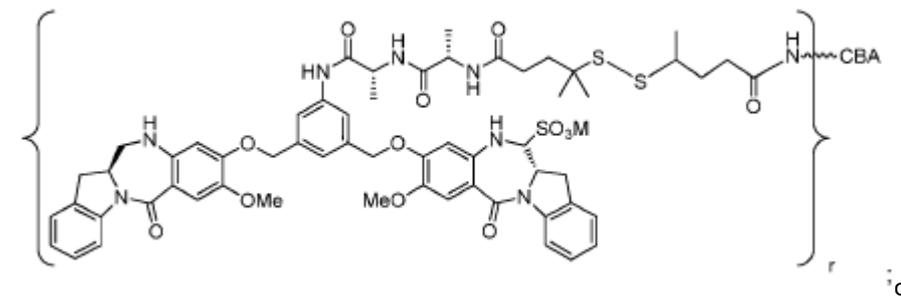








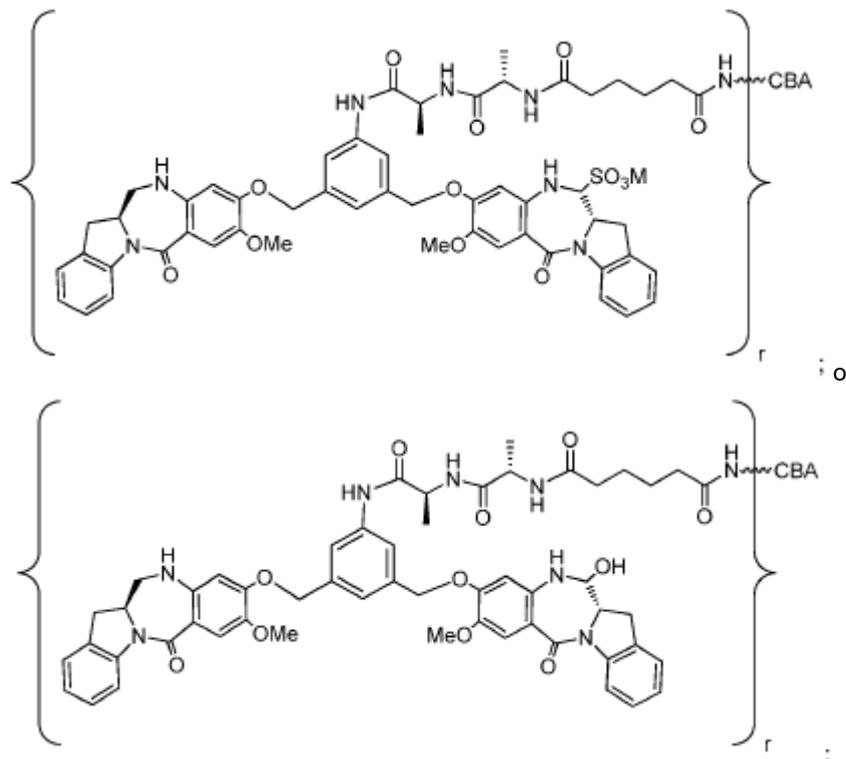
o



o una sal farmacéuticamente aceptable de estas, donde:
r es un entero entre 1 y 10.

5

16. El conjugado de la reivindicación 15, donde el conjugado está representado por las siguientes fórmulas:



10

o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

17. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 9-16 caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo revestido, un anticuerpo de cadena simple revestido o un fragmento de anticuerpo revestido; un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal de cadena simple o un fragmento de anticuerpo monoclonal de este; o el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena simple humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado; y/o el agente de unión celular es:

- (i) un anticuerpo del receptor anti-folato o un fragmento de anticuerpo del mismo;
- (ii) un anticuerpo anti-EGFR o un fragmento de anticuerpo del mismo;
- (iii) un anticuerpo anti-CD33 o un fragmento de anticuerpo del mismo;
- (iv) un anticuerpo anti-CD19 o un fragmento de anticuerpo del mismo;
- (v) un anticuerpo anti-Mucl o un fragmento de anticuerpo del mismo; o es
- (vi) un anticuerpo anti-CD37 o un fragmento de anticuerpo del mismo.

25

18. El conjugado de la reivindicación 17, donde:

(i) el anticuerpo del receptor anti-folato;

30

- (1) es el anticuerpo huMOVI 9;
- (2) comprende:

a) una CDR1 de cadena pesada de SEQ ID NO:1; una CDR2 de cadena pesada de SEQ ID NO:7 y una CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO:3; y

b) una CDR1 de cadena ligera de SEQ ID NO:4; una CDR2 de cadena ligera de SEQ ID NO:5; y una CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO:6; o

(3) comprende:

5

a) una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO:11; y

b) una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 100 % idéntica a SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13;

10

(4) comprende:

a) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11; y

b) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13; o

15

(5) comprende:

a) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8; y

b) una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10;

20

(ii) el anticuerpo anti-EGFR:

(1) es anticuerpo huML66;

(2) comprende:

a) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14; y

b) una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15;

30

(3) es huEGFR-7R; o

(4) comprende:

a) una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; y

b) una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:18;

35

(iii) el anticuerpo anti-CD33:

(1) es anticuerpo huMy9-6; o

(2) comprende:

a) una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:23; y

b) una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:24;

45

(iv) el anticuerpo anti-CD19:

(1) es anticuerpo huB4; o

(2) comprende

a) una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19; y

b) una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:20;

50

(v) el anticuerpo anti-Muc1:

(1) es anticuerpo huDS6; o

(2) comprende:

a) una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:21; y

b) una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:22;

60

(vi) el anticuerpo anti-CD37:

- (1) es anticuerpo huCD37-3;
- (2) comprende:

5

- a) una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:26 o SEQ ID NO:27; y
- b) una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:25;

10

- (3) es anticuerpo huCD37-50; o
- (4) comprende:

15

- a) una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29; y
- b) una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:28.

19. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 9-18 y un portador farmacéuticamente aceptable.

20

20. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-18 para su uso como un medicamento.

25

21. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-18 para su uso en un procedimiento para inhibir el crecimiento celular anormal o tratar un trastorno proliferativo, un trastorno autoinmunitario, un trastorno óseo destructivo, una enfermedad infecciosa, una enfermedad viral, una enfermedad fibrótica, un trastorno neurodegenerativo, pancreatitis o una enfermedad renal en un mamífero, que comprende administrarle a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o el conjugado y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico, opcionalmente donde:

30

(i) el procedimiento es para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en: cáncer, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), rechazo de trasplante, lupus, miositis, infección y deficiencia inmunitaria;

(ii) el procedimiento es para tratar un cáncer;

35

(iii) el procedimiento es para tratar un cáncer seleccionado de cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cuello uterino, melanoma, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer de próstata, cáncer endometrial, linfoma (p. ej., linfoma no Hodgkin), síndrome mielodisplásico (MDS), cáncer peritoneal o leucemia (p. ej., leucemia mieloide aguda (AML), leucemia monocítica aguda, leucemia promielocítica, leucemia eosinofílica, leucemia linfoblástica aguda (p. ej., B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL) y leucemia mieloide crónica (CML)).

40

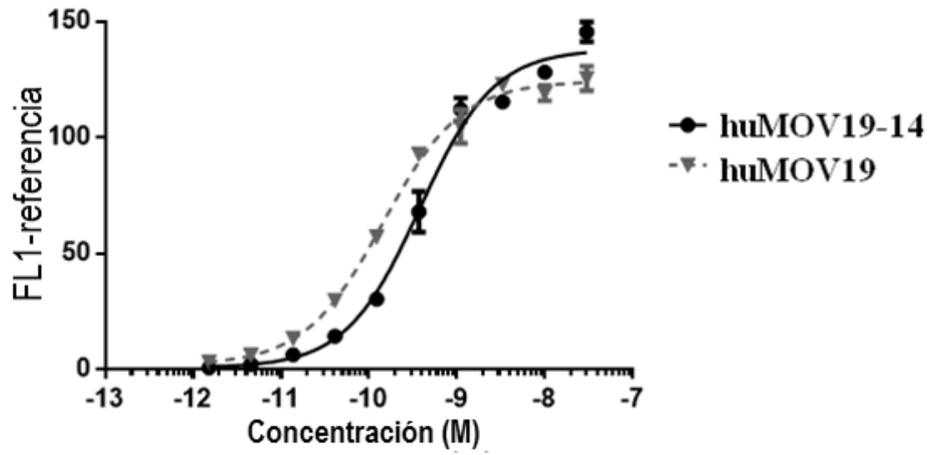
(iv) el procedimiento es para tratar el cáncer de leucemia mieloide aguda (AML);

(v) el procedimiento es para tratar el cáncer de ovario

(vi) el procedimiento es para tratar el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

FIG. 1

Afinidad de unión de huMOV19-14 contra el anticuerpo huMOV19 en células T47D



	huMOV19-14	huMOV19
EC50	3.793e-010	1.438e-010

FIG. 2

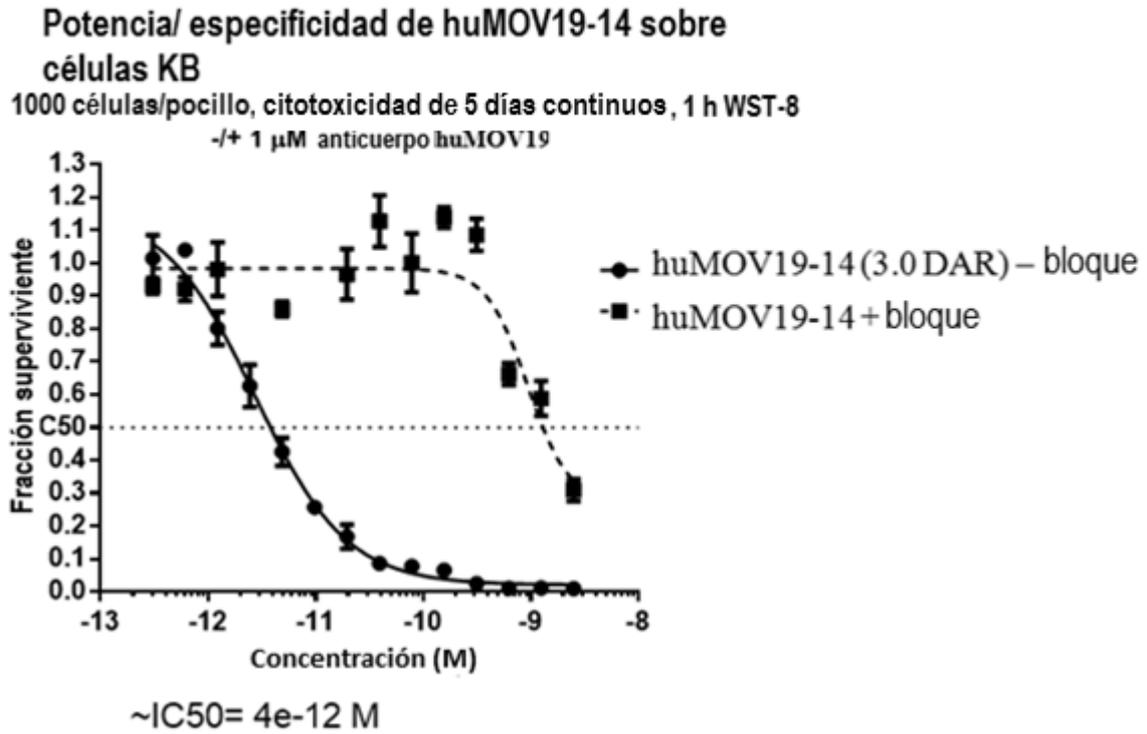


FIG. 3

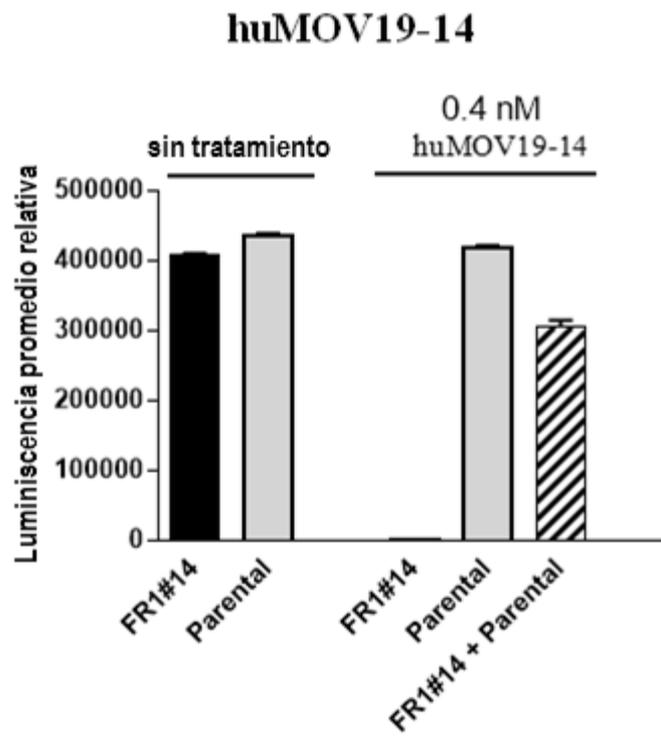


FIG. 4A

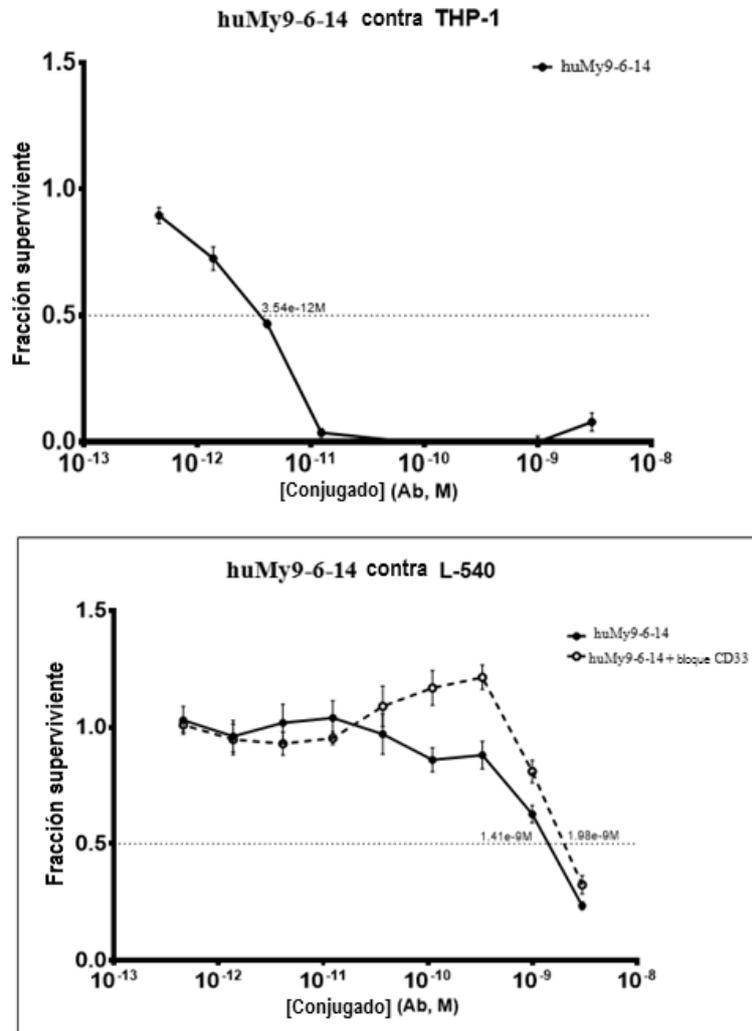


FIG. 4B

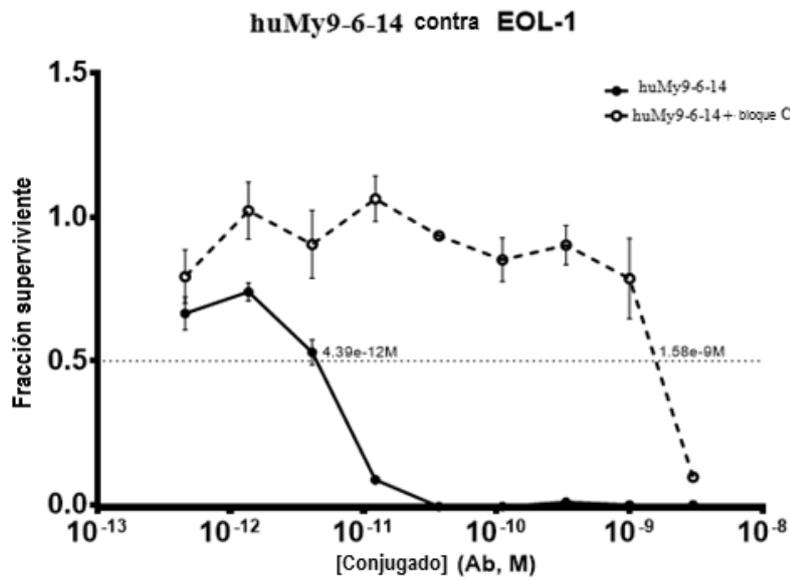
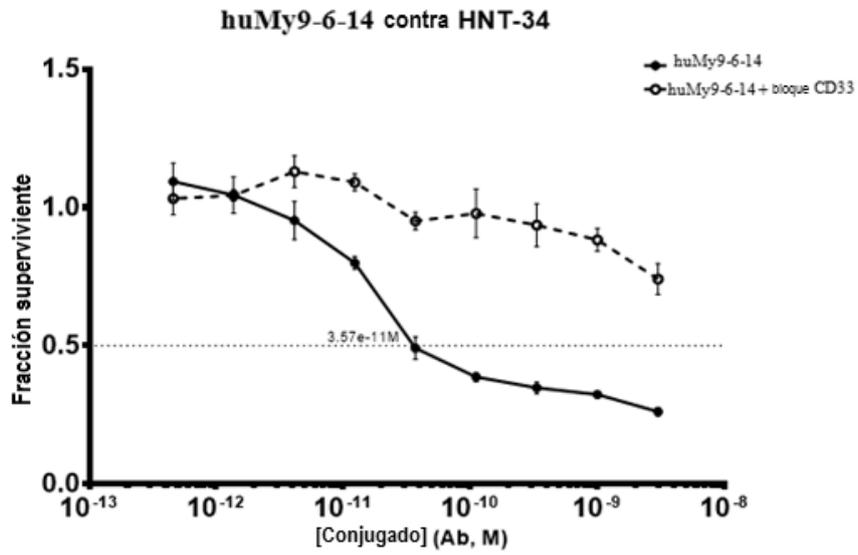


FIG. 4C

huMy9-6-14 contra HL60-QC

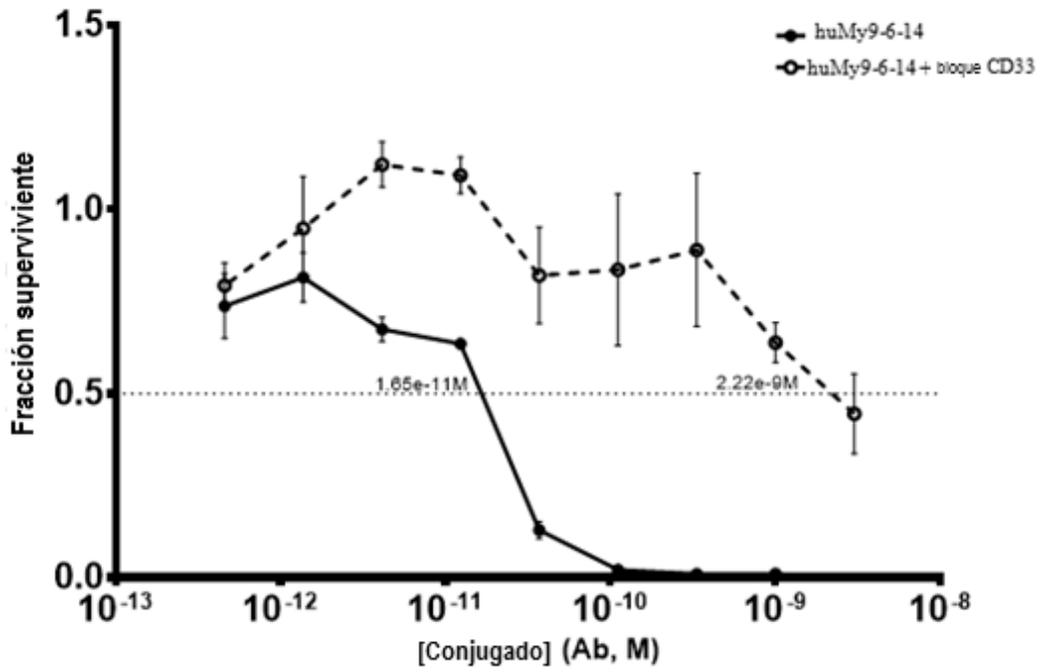


FIG. 5A

Efecto de 0, 500, 1000, 2000 y 4000 células kara (CD33+) sobre 500 células RADA-1 (CD33-) en presencia de conjugado de $1.0 \times 10^{-9} \text{M}$ huMy9-6-14

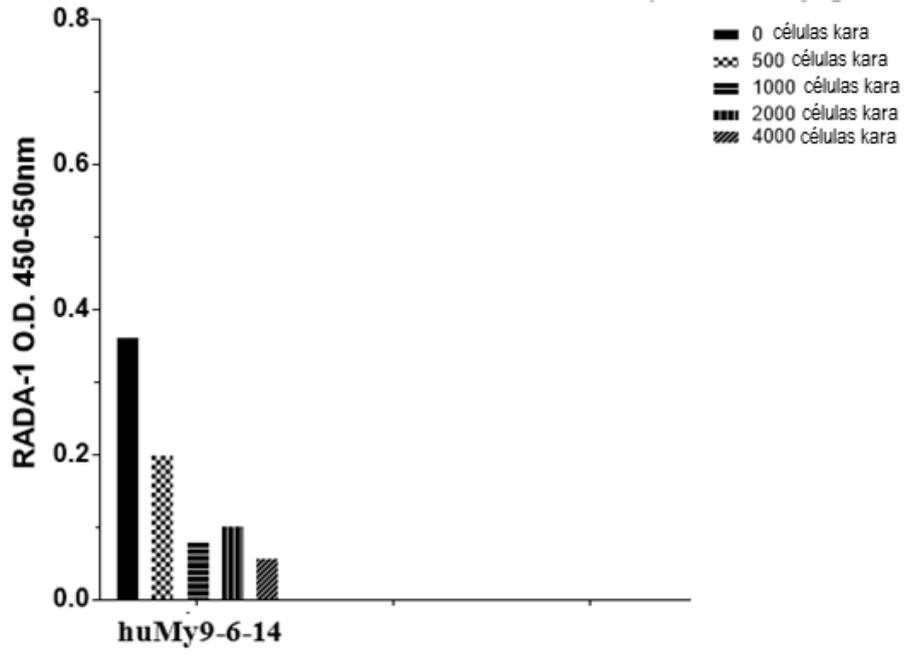


FIG. 5B

Efecto de 0, 500, 1000, 2000 y 4000 células kara (CD33+) sobre 500 células RADA-1 (CD33-) en presencia de conjugado de 5.0×10^{-10} M huMy9-6-14

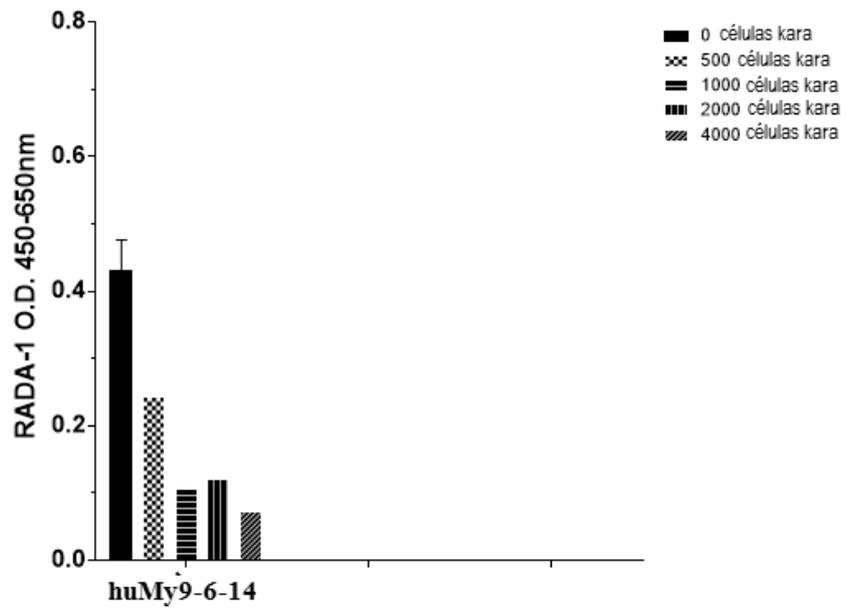
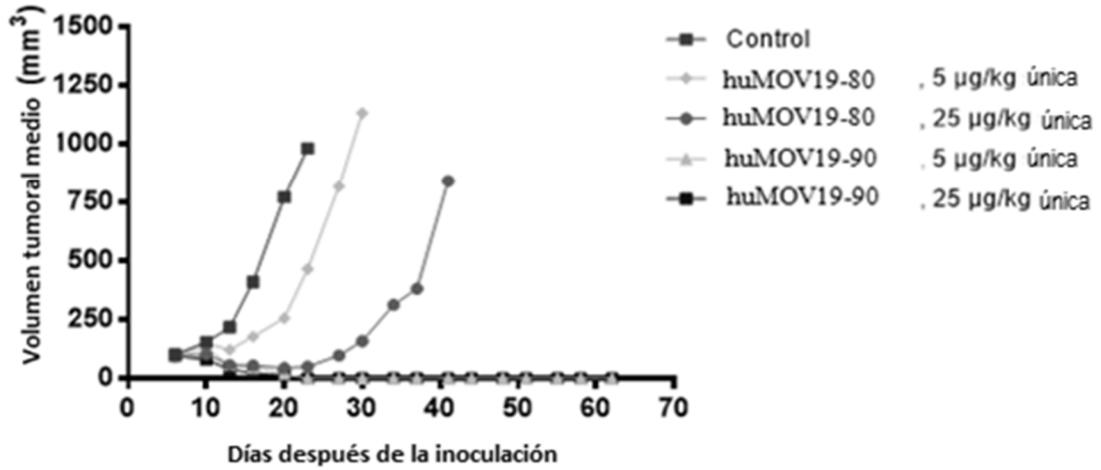


FIG. 6

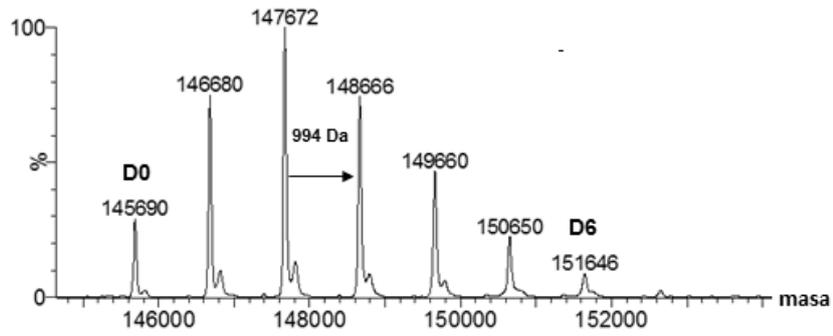
Actividad antitumoral (volumen tumoral medio, mm³) de huMOV19-80 y huMOV19-90 en ratones SCID que poseen xenoinjertos de NCI-H2110



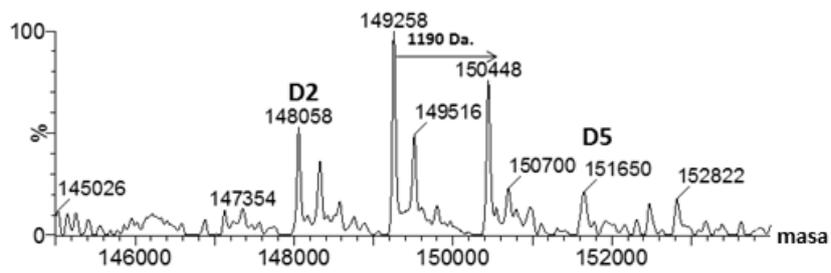
Grupo de tratamiento		Dosis (ug/kg)	T/C (Dia 23)	Regresiones		Resultado
				PR	CR	
A	Control	-	-	-	-	-
B	huMOV19-80	5	47%	0/6	0/6	Inactivo
C	huMOV19-80	25	5%	5/6	1/6	Altamente activo
D	huMOV19-90	5	0%	6/6	6/6	Altamente activo
E	huMOV19-90	25	0%	6/6	6/6	Altamente activo

FIG. 7A

MS para conjugado de huMov19-14 desglucosilado



MS para conjugado de huMov19-sulfo-SPDB-98 desglucosilado



MS para conjugado de huMov19-35 desglucosilado

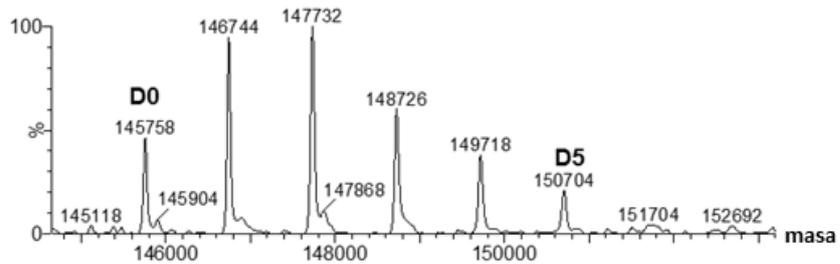
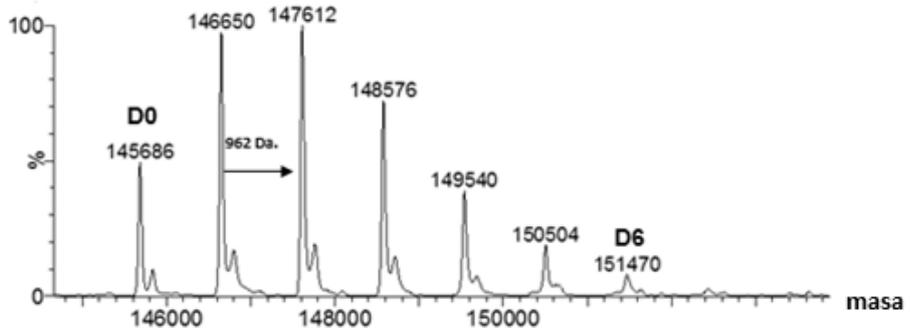
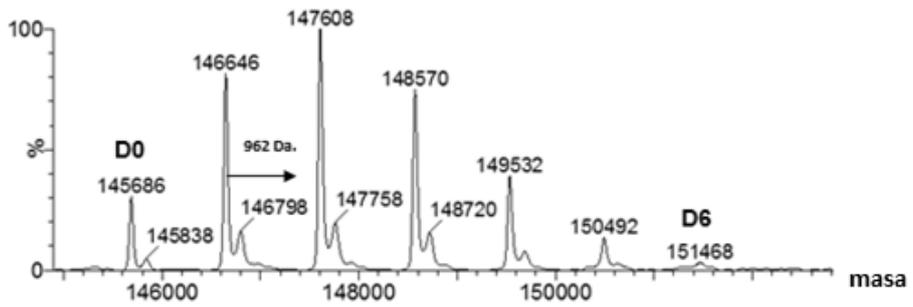


FIG. 7B

MS para conjugado de huMov19-63 desglucosilado



MS para conjugado de huMov19-80 desglucosilado



MS para conjugado de huMOV19-90 desglucosilado

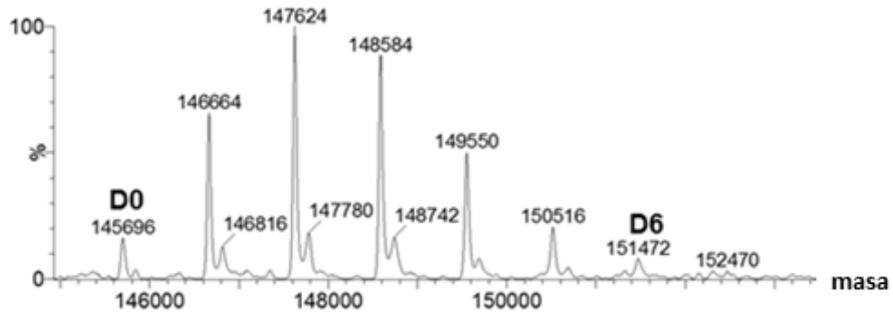
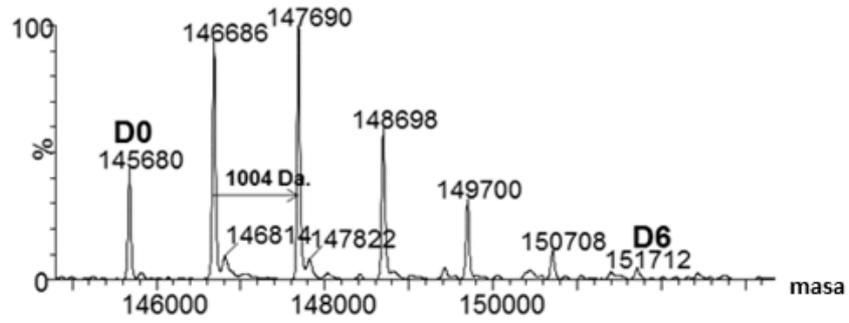
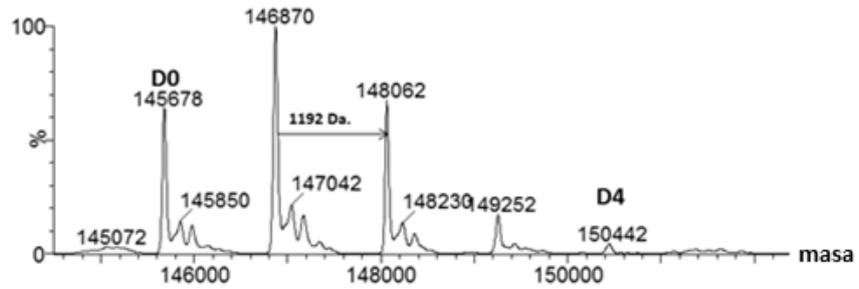


FIG. 7C

MS para conjugado de huMov19-49 desglucosilado



MS para conjugado de huMov19-sulfo-SPDB-99 desglucosilado



MS para conjugado de huMov19-70 desglucosilado

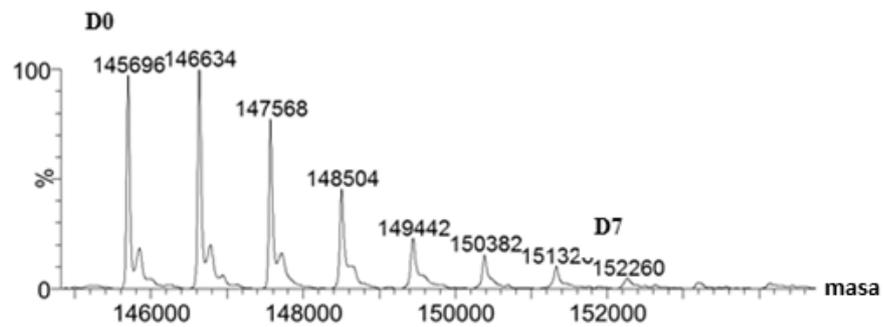


FIG. 7D

MS para conjugado de huMov19-23 desglucosilado

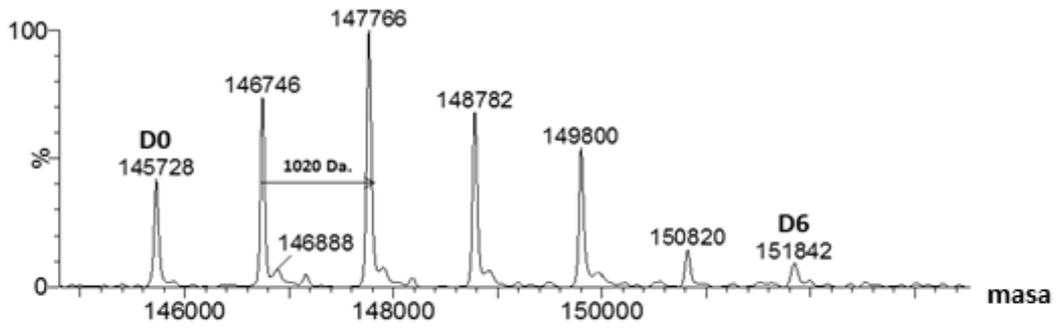


FIG. 8

MS para conjugado de huML66-90 desglucosilado

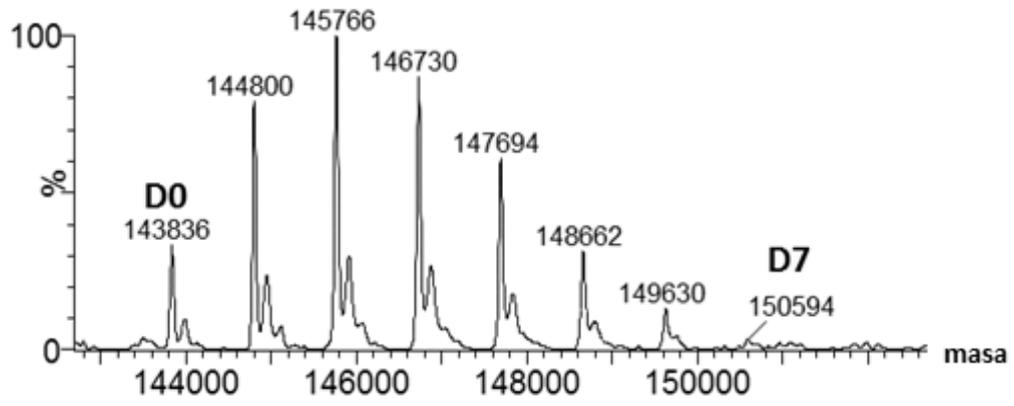


FIG. 9

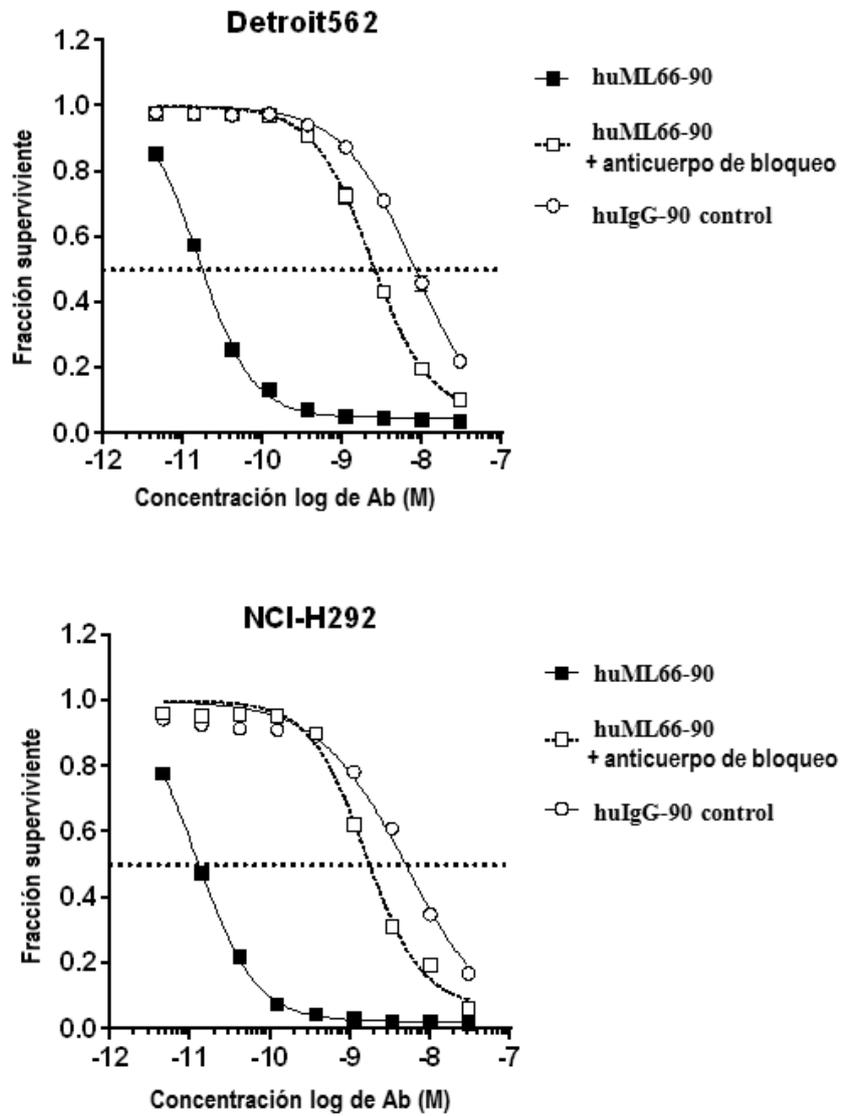


FIG. 10

Potencia de conjugado de huMOV19-90 sobre células KB

-/+ 1 μ M anticuerpo de bloqueo huMOV19
 1000 células/pocillo, 5 día continuo, 2h WST-8

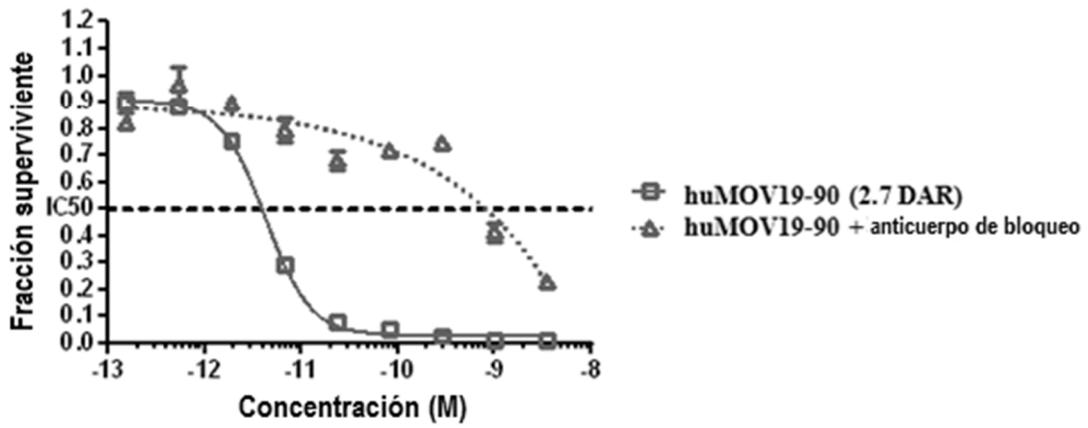


FIG. 11

Potencia de huMOV19-90 sobre células NCI-H2110

-/+ 1 μ M anticuerpo de bloqueo huMOV19
 2000 células/pocillo, 5 día continuo, 3h WST-8

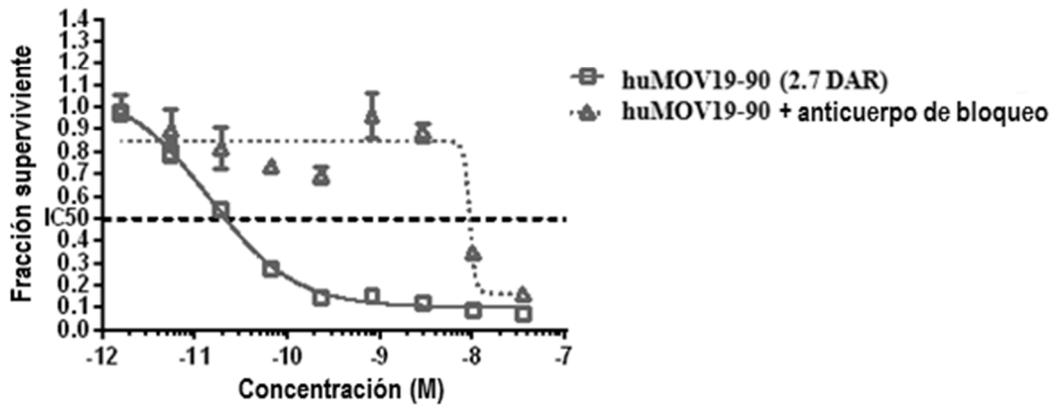


FIG. 12

Potencia de huMOV19-90 sobre células T47D

-/+ 1 μ M anticuerpo de bloqueo huMOV19
 2000 células/pocillo, 6 día incubación continua, A lamar Blue O/N

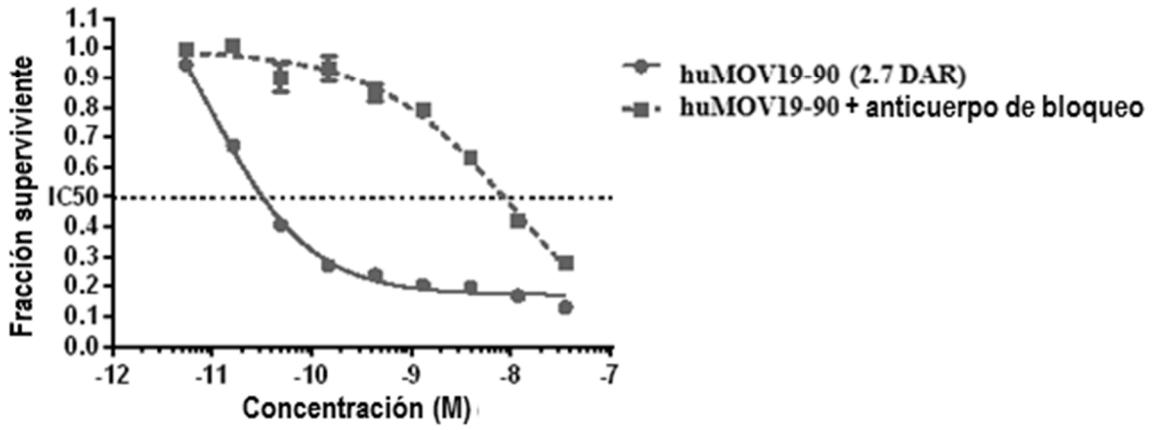


FIG. 13

huMOV19-90

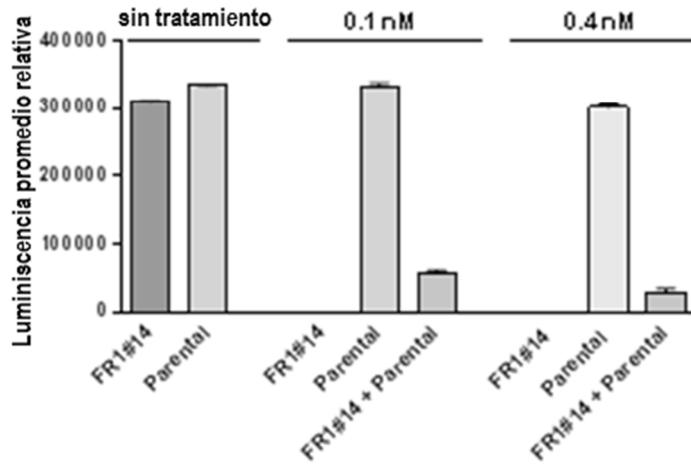
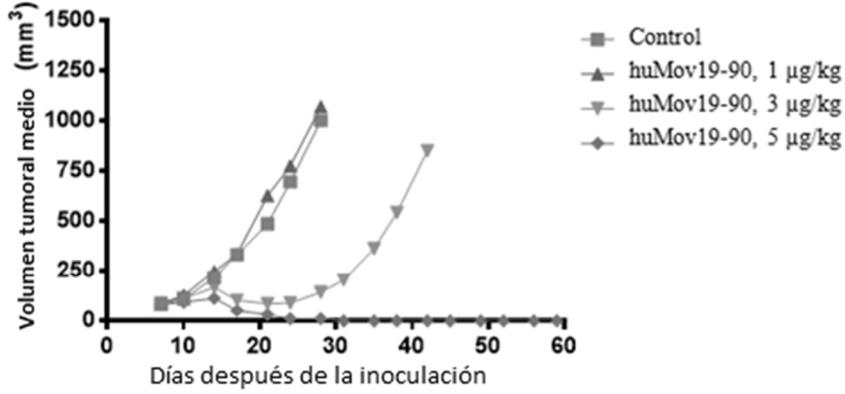


FIG. 14

Actividad antitumoral (volumen tumoral medio, mm³) de huMOV19-90 en ratones SCID que poseen xenoinjertos de NCI-H2110

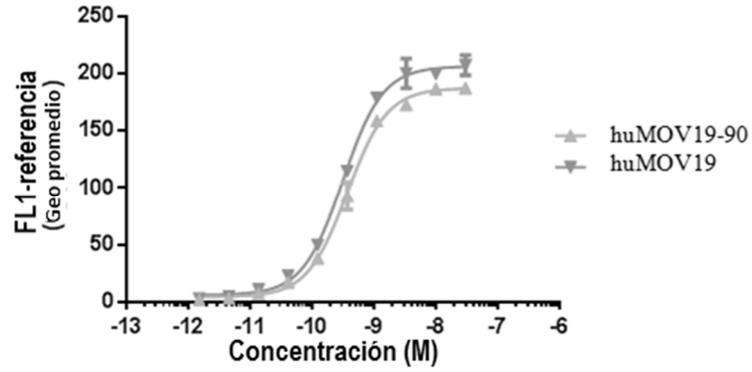


Grupo de tratamiento	Dosis del compuesto (µg/kg)	T/C (Día 28)	Regresiones		Resultado
			PR	CR	
A Control	-	-	-	-	-
B huMov19-90	1	107%	0/6	0/6	Inactivo
C huMov19-90	3	14%	1/6	0/6	Activo
D huMov19-90	5	1%	6/6	3/6	Altamente activo

FIG. 15

FIG. 15A

Unión de conjugado de huMOV19-90 sobre células T47D



	huMOV19-90	huMOV19
EC50	3.708e-010	3.136e-010

FIG. 15B

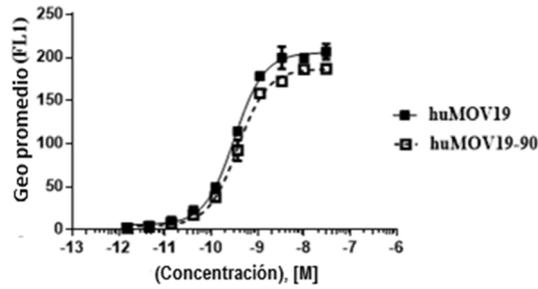


FIG. 16

MS para conjugado de huMov19-sulfo-SPDB-107 desglucosilado

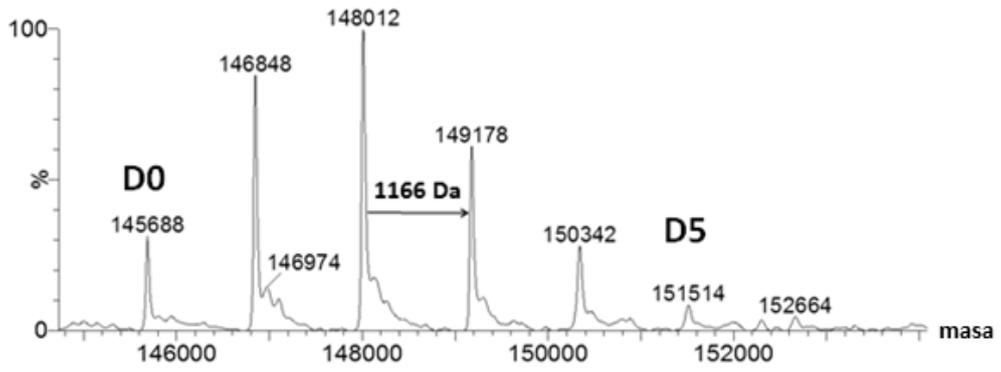
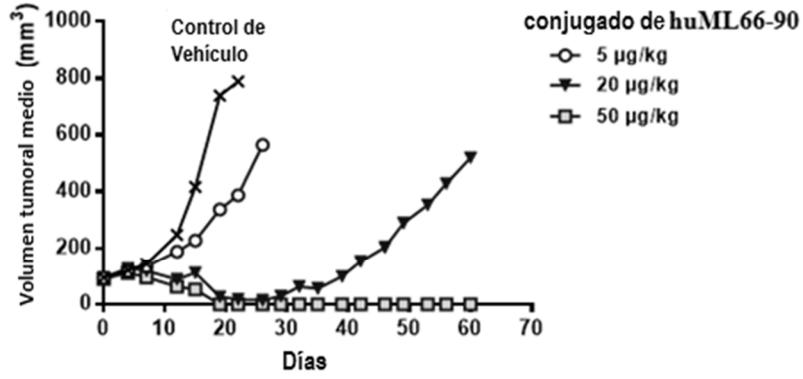


FIG. 17

Actividad antitumoral (volumen tumoral medio, mm³) de conjugado de huML66-90 en ratones SCID que poseen xenoinjertos de NCI-H1703



Agente	Dosis de compuesto 90 (µg/kg)	Dosis de Ab (mg/kg)	T/C (%)	CR	Resultado
conjugado de huML66-90	5	0.3	46	0/6	Inactivo
	20	1.1	4	3/6	Altamente activo
	50	2.8	0	6/6	Altamente activo

FIG. 18

Farmacocinética de huMov19-90 en ratones CD-1

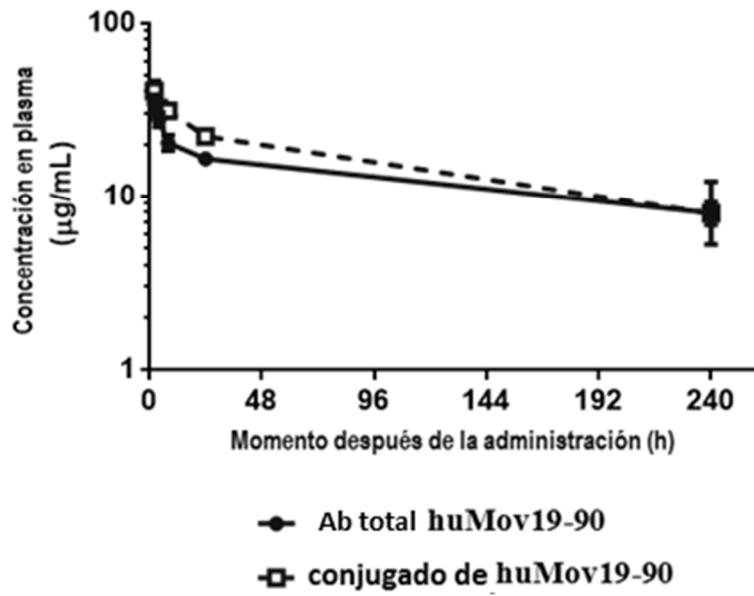


FIG. 19A

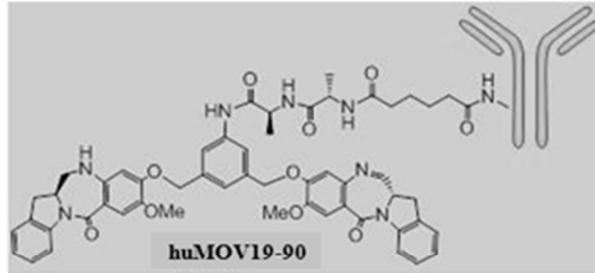


FIG. 19B

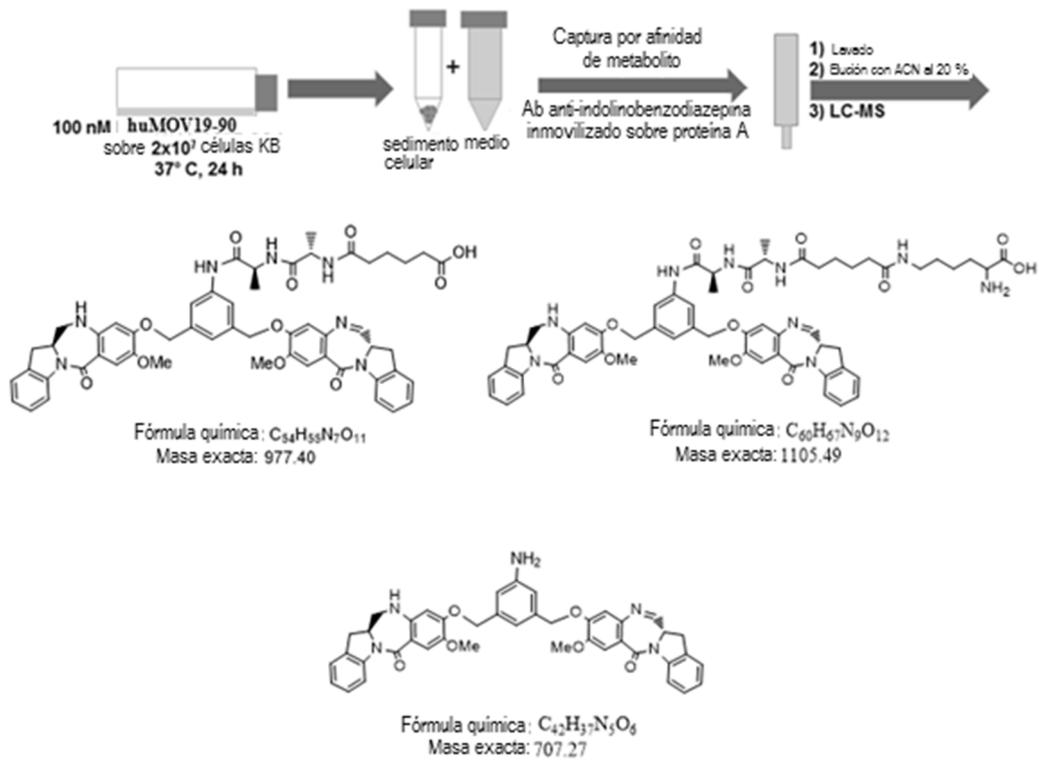


FIG. 20

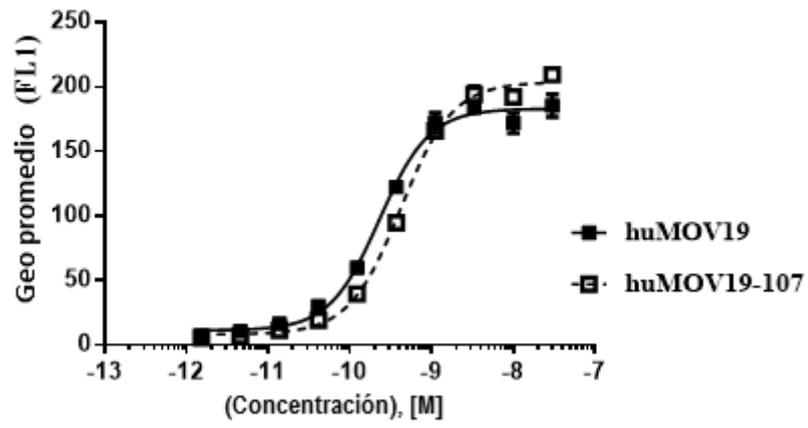


FIG. 21

FIG. 21A Células Ishikawa

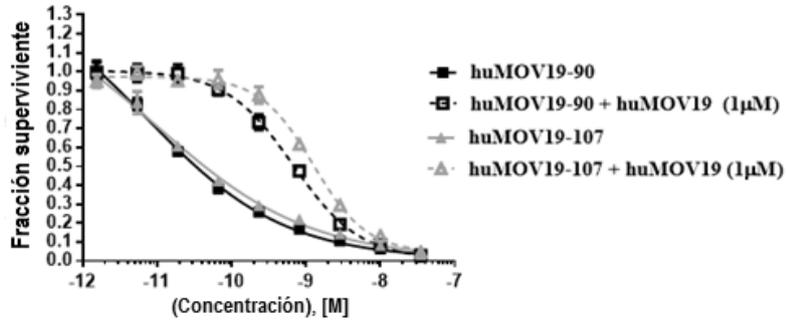


FIG. 21B Células KB

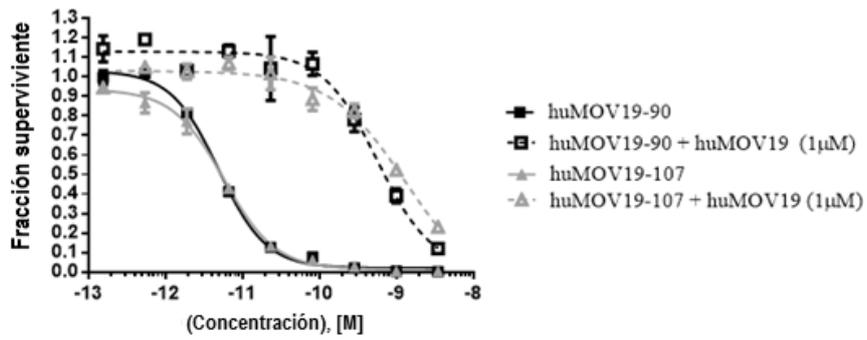


FIG. 21C células NC1-H21

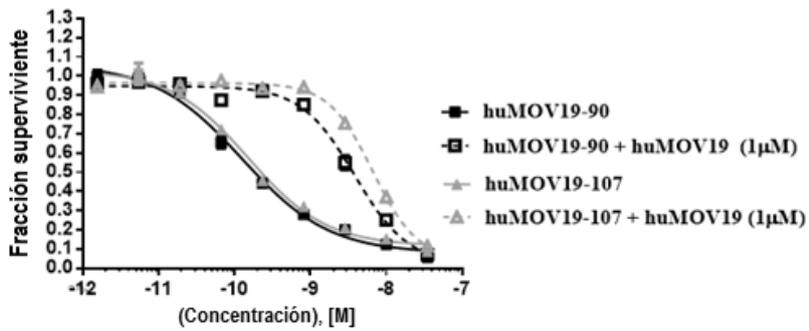
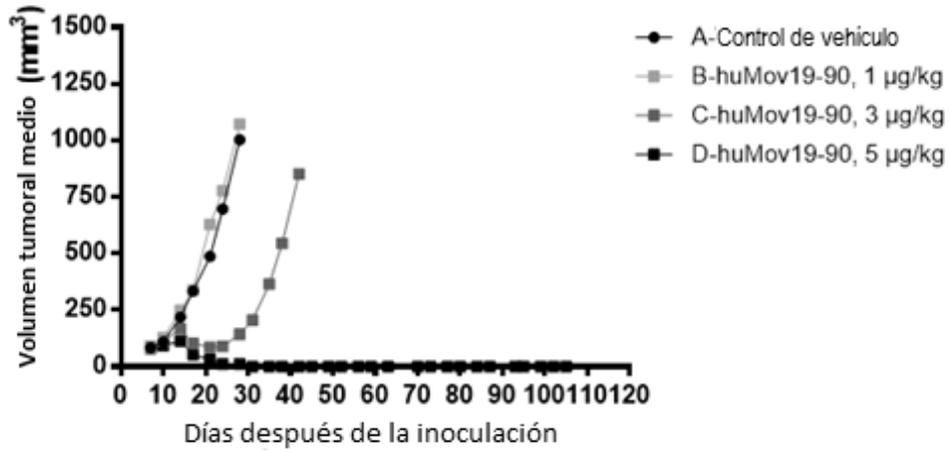
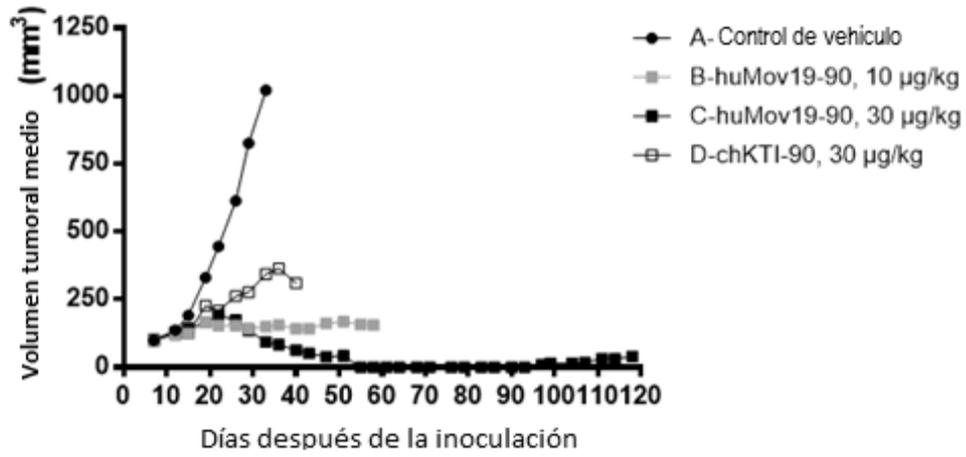


FIG. 22



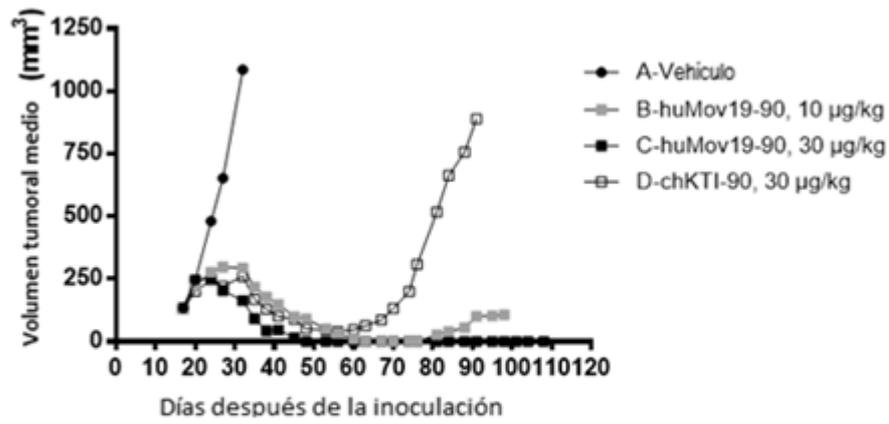
Grupo de tratamiento		Dosis (µg/kg)	T/C (Día 24)	Regresiones		Resultado
				PR	CR	
A	Control de vehiculo	—	—	—	—	—
B	huMov19-90	1	117%	0/6	0/6	Inactivo
C	huMov19-90	3	13%	1/6	0/6	Activo
D	huMov19-90	5	2%	6/6	4/6	Altamente activo

FIG. 23



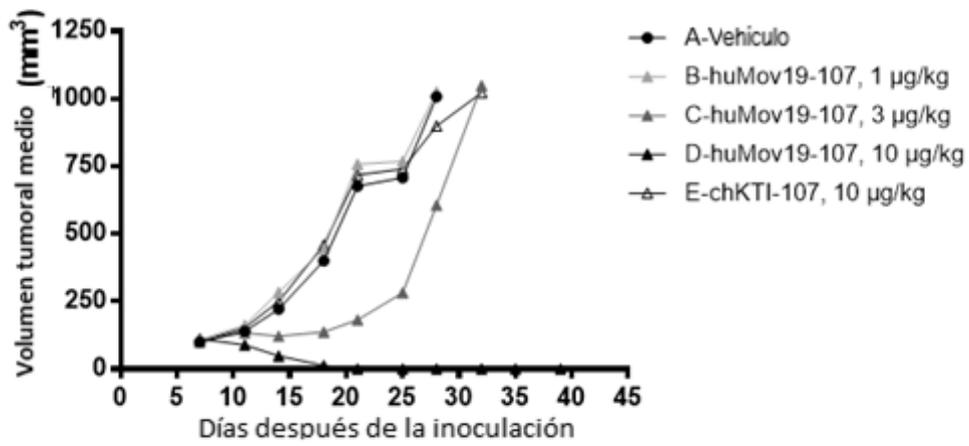
Grupo de tratamiento		Dosis (µg/kg)	T/C (Dia 33)	Regresiones		Resultado
				PR	CR	
A	Control de vehiculo	-	-	-	-	-
B	huMov19-90	10	15%	1/6	0/6	Activo
C	huMov19-90	30	9%	6/6	6/6	Altamente activo
D	chKTI-90	30	34%	0/6	0/6	Activo

FIG. 24



Treatment Group		Dosis (µg/kg)	T/C (Día 32)	Regresiones :		Resultado
				PR	CR	
A	Control de vehiculo	-	-	-	-	-
E	huMov19-90	10	27%	6/6	6/6	Activo
F	huMov19-90	30	15%	6/6	6/6	Activo
G	chKTI-90	30	24%	4/6	0/6	Activo

FIG. 25



Grupo de tratamiento		Dosis (µg/kg)	T/C (Día 28)	Regresiones		Resultado
				PR	CR	
A	Control de vehiculo	-	-	-	-	-
B	huMov19-107	1	102%	0/6	0/6	Inactivo
C	huMov19-107	3	60%	1/6	1/6	Inactivo
D	huMov19-107	10	0%	6/6	6/6	Altamente activo
E	chKTI-107	10	89%	0/6	0/6	Inactivo

FIG. 26

