

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 678**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/437** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

**C07D 471/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2011 E 16176625 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3108886**

54 Título: **Conjugados de análogos de CC-1065 y conectores bifuncionales**

30 Prioridad:

**21.04.2010 US 326437 P**

**10.12.2010 US 421824 P**

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

**30.03.2021**

73 Titular/es:

**SYNTARGA B.V. (100.0%)**

**Microweg 22**

**6545 CM Nijmegen, NL**

72 Inventor/es:

**BEUSKER, PATRICK HENRY;**

**COUMANS, RUDY GERARDUS ELISABETH;**

**ELGERSMA, RONALD CHRISTIAAN;**

**MENGE, WIRO MICHAEL PETRUS BERNARDUS;**

**JOOSTEN, JOHANNES ALBERTUS**

**FREDERIKUS;**

**SPIJKER, HENRI JOHANNES y**

**GROOT DE, FRANCISCUS MARINUS HENDRIKUS**

74 Agente/Representante:

**PONTI GRAU, Ignacio**

**ES 2 815 678 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

Conjugados de análogos de CC-1065 y conectores bifuncionales

## CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] Esta invención se refiere a conjugados novedosos del agente alquilante de ADN CC-1065. Los conjugados se diseñan para liberar sus (múltiples) cargas útiles después de uno o más pasos de activación y/o con una velocidad y un intervalo temporal controlados por el conjugado para administrar selectivamente y/o liberar de forma controlada uno o más de dichos agentes alquilantes de ADN. Los conjugados se pueden usar para tratar una enfermedad que se caracteriza por una proliferación (celular) no deseada. Como ejemplo, los conjugados de esta invención se pueden usar para tratar un tumor.

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las duocarmicinas, aisladas por primera vez a partir de un caldo de cultivo de la especie *Streptomyces*, son miembros de una familia de antibióticos antitumorales que incluye también a CC-1065. Estos agentes extremadamente potentes obtienen presuntamente su actividad biológica de una capacidad para alquilar ADN selectivamente en función de la secuencia en el N3 de una adenina en el surco menor, lo que inicia una cascada de eventos que termina en un mecanismo de muerte celular apoptótica.<sup>1</sup>

15 Aunque CC-1065 ha mostrado una citotoxicidad muy potente, no pudo usarse en la clínica debido a una hepatotoxicidad retardada grave.<sup>2</sup> Esta observación llevó al desarrollo de análogos sintéticos de CC-1065 (véase, para derivados de CC-1065, por ejemplo, Aristoff et al., J. Org. Chem. 1992, 57, 6234; Boger et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 2207; Boger et al., Chem. Rev. 1997, 97, 787; Milbank et al., J. Med. Chem. 1999, 42, 649; Amishiro et al., J. Med. Chem. 1999, 42, 669; Atwell et al., J. Med. Chem. 1999, 42, 3400; Wang et al., J. Med. Chem. 2000, 43, 1541; Boger et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001, 11, 2021; Boger et al., J. Org. Chem. 2001, 66, 5163; Wang et al., J. Med. Chem. 2003, 46, 634; Parrish et al., Bioorg. Med. Chem. 2003, 11, 3815; Parrish et al., Bioorg. Med. Chem. 2004, 12, 5845; Daniell et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005, 15, 177; Tichenor et al., J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 15683; Purnell et al., Bioorg. Med. Chem. 2006, 16, 5677; Bando y Sugiyama, Acc. Chem. Res. 2006, 39, 935; Tichenor et al., Nat. Prod. Rep. 2008, 25, 220; MacMillan et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 1187; Tietze et al., Anti-Cancer Agents Med. Chem. 2009, 9, 304; Gauss et al., Tetrahedron 2009, 65, 6591; Robertson et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010, 20, 2722; Boyle et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010, 20, 1854; Chavda et al., Bioorg. Med. Chem. 2010, 18, 5016; EP 0154445; WO 88/04659; WO 90/02746; WO 97/12862; WO 97/32850; WO 97/45411; WO 98/52925; WO 99/19298; WO 01/83482; WO 02/067937; WO 02/067930; WO 02/068412; WO 02/096910; WO 03/022806; WO 03/097635; WO 2004/069201; WO 2004/101767; WO 2006/043839; WO 2007/051081; y WO 2010/062171), que mostraron en general tener una citotoxicidad similar, pero una hepatotoxicidad reducida. Amishiro et al., Bioorg. Med. Chem. 2000, 8, 1637 divulga una serie de derivados pirrólicos del anillo A de la duocarmicina, que mostraron una toxicidad en la sangre periférica más débil que los derivados con el Seg-B del tipo natural, mientras que la mayor parte de estos derivados mostraron una actividad antitumoral potente contra modelos de tumores murinos *in vivo*. Sin embargo, estos derivados todavía carecen de una selectividad suficiente por las células tumorales, ya que la selectividad de estos agentes -y de los agentes citotóxicos en general- se basa, en cierta parte, en la diferencia en la tasa de proliferación de las células tumorales y las células normales, y, por lo tanto, afectan también a las células sanas que muestran una tasa de proliferación relativamente alta. Esto lleva típicamente a efectos secundarios graves. Las concentraciones farmacológicas que erradicarían completamente el tumor no se pueden alcanzar debido a efectos secundarios que limitan la dosis, tal como la toxicidad en el tracto gastrointestinal y en la médula ósea. Además, los tumores pueden desarrollar resistencia contra los agentes anticancerosos después de un tratamiento prolongado. En el desarrollo farmacológico moderno, la dirección de los fármacos citotóxicos al sitio tumoral puede, por lo tanto, considerarse uno de los principales objetivos.

[0003] Un enfoque prometedor para obtener una selectividad aumentada para las células tumorales o el tejido tumoral es explotar la existencia de antígenos, receptores y otras fracciones receptoras asociados a tumores que pueden servir como una diana. Tal diana puede estar regulada por aumento o, en cierto grado, estar específicamente presente en el tejido tumoral o en el tejido estrechamente asociado, tal como el tejido neovascular, con respecto a otros tejidos para conseguir una dirección eficiente. Se han identificado y validado muchas dianas y se han desarrollado varios métodos para identificar y validar dianas.<sup>3</sup> Mediante el acoplamiento de un ligando, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para tal antígeno, receptor u otra fracción receptiva asociados a tumores, a un agente terapéutico, este agente se puede dirigir selectivamente al tejido tumoral.

[0004] Otro enfoque prometedor para obtener una selectividad por las células tumorales o el tejido tumoral es explotar la existencia de enzimas asociadas a tumores. Una enzima que esté principalmente localizada en el sitio tumoral puede convertir un profármaco farmacológicamente inactivo, que consiste en un sustrato enzimático directa o indirectamente enlazado al fármaco tóxico, en el fármaco correspondiente en la proximidad o dentro del tumor. Mediante este concepto, una alta concentración de agente anticanceroso tóxico puede generarse selectivamente en el sitio tumoral. Se pueden matar todas las células tumorales si la dosis es suficientemente alta, lo que puede reducir el desarrollo de células tumorales resistentes al fármaco.

[0005] Las enzimas también pueden ser transportadas a la proximidad o dentro de las células diana o el tejido diana mediante, por ejemplo, terapia con profármaco y enzima dirigida por anticuerpos (ADEPT)<sup>4</sup>, terapia con profármaco y enzima dirigida por polímeros (PDEPT) o terapia con profármaco y enzima dirigida por macromoléculas (MDEPT)<sup>5</sup>, terapia con profármaco y enzima dirigida por virus (VDEPT)<sup>6</sup> o terapia con profármaco y enzima dirigida por genes (GDEPT)<sup>7</sup>. Con la ADEPT, por ejemplo, un profármaco no tóxico se convierte selectivamente en un compuesto citotóxico en la superficie de células diana por un conjugado anticuerpo-enzima que se ha dirigido previamente a la superficie de esas células.

[0006] Otro enfoque prometedor para obtener una selectividad por las células tumorales o el tejido tumoral es explotar el efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR). A través de este efecto EPR, las macromoléculas se acumulan pasivamente en los tumores sólidos a consecuencia de la patología desorganizada de la vasculatura tumoral angiogénica con su endotelio discontinuo, que lleva a la hiperpermeabilidad a macromoléculas grandes, y la falta de un drenaje linfático tumoral eficaz.<sup>8</sup> Mediante el acoplamiento de un agente terapéutico directa o indirectamente a una macromolécula, dicho agente se puede dirigir selectivamente a un tejido tumoral.

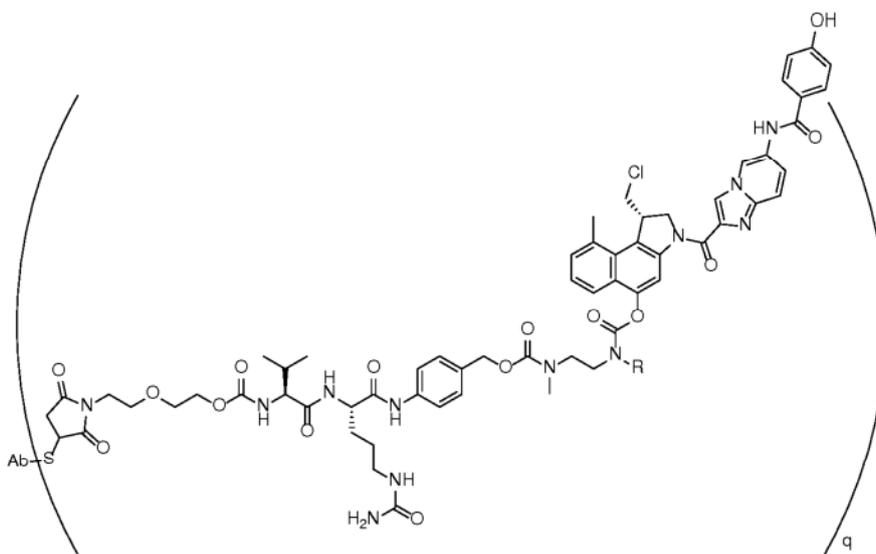
[0007] Además de una dirección eficiente, otro criterio importante para la aplicación exitosa de conjugados dirigidos de agentes citotóxicos en la terapia tumoral son que el uno o más agentes se liberen eficazmente del conjugado en el sitio tumoral y que el conjugado no sea citotóxico o lo sea solo muy débilmente, mientras que el propio agente citotóxico presenta una citotoxicidad altamente potente. Idealmente, esto lleva a la generación de moléculas citotóxicas solo en el sitio tumoral, lo que da como resultado un índice terapéutico muy aumentado con respecto al agente citotóxico no dirigido. Otro criterio importante para un conjugado dirigido exitoso es que el conjugado debe tener propiedades farmacológicas adecuadas, tales como una estabilidad suficiente en la circulación, una baja tendencia a la agregación y una buena solubilidad en agua. La hidrosolubilidad y la hidrofiliidad apropiadas del fármaco y/o el conector pueden contribuir a unas propiedades farmacológicas mejoradas.

[0008] Se han descrito varios conjugados de CC-1065 y derivados (véase, para conjugados de derivados de CC-1065, por ejemplo, Suzawa et al., *Bioorg. Med. Chem.* 2000, 8, 2175; Jeffrey et al., *J. Med. Chem.* 2005, 48, 1344; Wang et al., *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 7854; Tietze et al., *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 4396; Tietze et al., *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 2811; Tietze et al., *ChemMedChem* 2008, 3, 1946; Li et al., *Tetrahedron Lett.* 2009, 50, 2932; Tietze et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 7336; Schuster et al., *Org. Biomol. Chem.* 2010, 8, 1833; WO 91/16324; WO 94/04535; WO 95/31971; US 5,475,092; US 5,585,499; US 5,646,298; WO 97/07097; WO 97/44000; US 5,739,350; WO 98/11101; WO 98/25898; US 5,843,937; US 5,846,545; WO 02/059122; WO 02/30894; WO 03/086318; WO 2005/103040; WO 2005/112919; WO 2006/002895; WO 2006/110476; WO 2007/038658; WO 2007/059404; WO 2008/083312; WO 2008/103693; WO 2009/026274; WO 2009/064908; WO 2009/073533; WO 2009/073524; WO 2009/073546; WO 2009/134977; US 2009/0162372; y WO 2010/062171). En estos conjugados, una o más de las propiedades favorables mencionadas anteriormente pueden no ser óptimas.

[0009] Por consiguiente, hay todavía una clara necesidad de conjugados de derivados de CC-1065 que muestren una alta ventana terapéutica, contengan derivados de CC-1065 que tengan una citotoxicidad potente y propiedades farmacológicas favorables, y liberen los derivados de CC-1065 eficazmente.

## RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0010] La presente invención satisface la necesidad anteriormente mencionada con un compuesto con la siguiente fórmula:



donde R es  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{H}$ ,  $(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ ,  $(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ,  $(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ,  $(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$  o  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{H}$ ; q varía de 1 a 4; y **Ab** es trastuzumab.

5 [0011] La invención se refiere además a un proceso para la preparación de dichos compuestos, una composición farmacéutica que comprende dichos compuestos y a compuestos para el uso como medicamento, en particular para el tratamiento o la prevención de un tumor en un mamífero.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE DIBUJOS

[0012]

- 10 Figura 1. Reordenamiento de un compuesto seco a un compuesto que contiene ciclopropilo.  
 Figura 2. Ilustración gráfica de las velocidades de ciclación para una serie de compuestos de separador de ciclación-duocarmicina a 25°C y pH 7,4 (línea superior) y a 37°C y pH 5 (línea inferior).  
 Figura 3. Estabilidad en el plasma humano para una serie de conjugados conector-agente conjugados con HSA.  
 Figura 4. Estudio de la eficacia de una dosis individual con conjugados anticuerpo basado en trastuzumab-fármaco (ADC) en ratones *nu/nu* hembra con un xenoinjerto de N87.  
 15 Figura 5. Escisión de conjugados conector-agente desactivados con N-acetilcisteína por la catepsina B.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 [0013] La siguiente descripción detallada se proporciona de modo que la invención se pueda entender más completamente. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para usar en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

#### Definiciones

[0014] A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona experta en la materia.

25 [0015] El término "anticuerpo", como se utiliza en este caso, se refiere a una molécula de inmunoglobulina en toda su longitud, una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina en toda su longitud o un derivado de una molécula de inmunoglobulina en toda su longitud o una porción activa de la misma, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte

de la misma, donde tales dianas incluyen, pero de manera no limitativa, células tumorales. Un fragmento o derivado de una molécula de inmunoglobulina en toda su longitud, por lo tanto, se une inmunoespecíficamente al mismo antígeno que dicha molécula de inmunoglobulina en toda su longitud. La inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2) o subclase. La inmunoglobulina, o un derivado o porción activa de la misma, puede derivar de cualquier especie, por ejemplo, ser humano, roedor (por ejemplo, ratón, rata o hámster), asno, oveja, conejo, cabra, cobaya, camélido, caballo, vaca o pollo, pero, preferiblemente, es de origen humano, murino o de conejo, o deriva de más de una especie. Los anticuerpos útiles en la invención incluyen, pero de forma no limitativa, anticuerpos monoclonales, policlonales, biespecíficos, multiespecíficos, humanos, humanizados, quiméricos y diseñados, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fv, fragmentos Fd, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos dAb, fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos, CDR aislados y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno de interés. El término "grupo saliente" se refiere a un grupo que se puede sustituir por otro grupo en una reacción de sustitución. Tales grupos salientes son bien conocidos en la técnica, y los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, un haluro (fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro), azida, un sulfonato (por ejemplo, un alcanosulfonato C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido, tal como metanosulfonato, trifluorometanosulfonato y trifluoroetanosulfonato, o un bencenosulfonato opcionalmente sustituido, tal como *p*-toluenosulfonato y nosilato), imidazol, una imidazolidina cíclica, succinimida-*N*-óxido, ftalimida-*N*-óxido, *p*-nitrofenóxido, *o*-nitrofenóxido, pentafluorofenóxido, tetrafluorofenóxido, 1,3,5-triclorofenóxido, 1,3,5-trifluorofenóxido, un carboxilato, un aminocarboxilato (carbamato) y un alcoxicarboxilato (carbonato). Para las sustituciones en un carbono saturado, los haluros y los sulfonatos son grupos salientes preferidos. Para las sustituciones en el carbono de un carbonilo pueden usarse como grupo saliente, por ejemplo, un haluro, succinimida-*N*-óxido, *p*-nitrofenóxido, pentafluorofenóxido, tetrafluorofenóxido, un carboxilato o un alcoxicarboxilato (carbonato). El término "grupo saliente" también se refiere a un grupo que se elimina a consecuencia de una reacción de eliminación, por ejemplo, una reacción en cascada de electrones o una reacción de espiriociclación. En este caso pueden usarse como grupo saliente, por ejemplo, un haluro, un sulfonato, una azida, un aminocarboxilato (carbamato) o un alcoxicarboxilato (carbonato). Por lo tanto, un agente o un derivado del mismo liberado a partir de un conjugado a través de una autoeliminación (múltiple) se define como un grupo saliente según esta definición.

El término "éster activo" se refiere a un grupo funcional donde el grupo alcoxi de la fracción éster es un buen grupo saliente. Los ejemplos de tales grupos alcoxi incluyen, pero de forma no limitativa, succinimida-*N*-óxido, *p*-nitrofenóxido, pentafluorofenóxido, tetrafluorofenóxido, 1-hidroxibenzotriazol y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, y grupos con una capacidad saliente comparable. Los grupos alcoxi basados en alquilo no sustituidos tales como metoxi, etoxi, isopropoxi y *t*-butoxi no cumplen como buenos grupos salientes y los ésteres de metilo, etilo, isopropilo y *t*-butilo, por lo tanto, no son considerados ésteres activos.

El término "fracción reactiva" en este caso se refiere a un grupo funcional que puede reaccionar con un segundo grupo funcional bajo condiciones relativamente suaves y sin la necesidad de una funcionalización previa de la fracción reactiva. La reacción entre la fracción reactiva y dicho segundo grupo funcional solo requerirá la aplicación de algo de calor, presión, un catalizador, un ácido y/o una base. Los ejemplos de fracciones reactivas incluyen, pero de forma no limitativa, haluro de carbamilo, haluro de acilo, éster activo, anhídrido,  $\alpha$ -haloacetilo,  $\alpha$ -haloacetamida, maleimida, isocianato, isotiocianato, disulfuro, tiol, hidrazina, hidrazida, cloruro de sulfonilo, aldehído, metilcetona, vinilulfona, halometilo y sulfonato de metilo.

El término "fracción moduladora" se refiere a una fracción que se acopla a un compuesto con la fórmula (I) para modificar sus propiedades y que va a ser eliminada (parcialmente) *in vivo* de dicho compuesto con la fórmula (I).

El término "grupo hidrosoluble" se refiere a un grupo funcional que se disuelve bien en ambientes acuosos y que imparte una solubilidad en agua mejorada al compuesto al que se une. Los ejemplos de grupos hidrosolubles incluyen, pero de forma no limitativa, polialcoholes, sacáridos de cadena lineal o cíclicos, aminas y poliaminas primarias, secundarias, terciarias o cuaternarias, grupos sulfato, grupos sulfonato, grupos sulfinato, grupos carboxilato, grupos fosfato, grupos fosfonato, grupos fosfinato, grupos ascorbato, glicoles, incluidos polietilenglicoles, y poliéteres. Grupos hidrosolubles preferidos son aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias, carboxilatos, fosfonatos, fosfatos, sulfonatos, sulfatos,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{yy}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}^{17}\text{R}^{yy}$ ,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{yy}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}^{17-}$ ,  $-\text{X}^{17}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{yy}\text{CH}_2\text{CH}_2-$ , glicol, oligoetilenglicol y polietilenglicol, donde *yy* se selecciona de 1 a 1000,  $\text{X}^{17}$  se selecciona de O, S y NR<sup>zz</sup>, y R<sup>zz</sup> y R<sup>yy</sup> se seleccionan independientemente de H y alquilo C<sub>1-3</sub>.

El término "sustituido", cuando se usa como un adjetivo de "alquilo", "heteroalquilo", "cicloalquilo", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo" o similares, indica que dicho "alquilo", "heteroalquilo", "cicloalquilo", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo" o grupo similar contiene uno o más sustituyentes (introducidos por sustitución de hidrógeno). Los sustituyentes ejemplares incluyen, pero de forma no limitativa, OH, =O, =S, =NR<sup>k</sup>, =N-OR<sup>k</sup>, SH, NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, NO, N<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, CN, OCN, SCN, NCO, NCS, C(O)NH<sub>2</sub>, C(O)H, C(O)OH, halógeno, R<sup>k</sup>, SR<sup>k</sup>, S(O)R<sup>k</sup>, S(O)OR<sup>k</sup>, S(O)<sub>2</sub>R<sup>k</sup>, S(O)<sub>2</sub>OR<sup>k</sup>, OS(O)R<sup>k</sup>, OS(O)OR<sup>k</sup>, OS(O)<sub>2</sub>R<sup>k</sup>, OS(O)<sub>2</sub>OR<sup>k</sup>, S(O)N(R<sup>k</sup>)R<sup>1</sup>, OS(O)N(R<sup>k</sup>)R<sup>1</sup>, S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>k</sup>)R<sup>1</sup>, OS(O)<sub>2</sub>N(R<sup>k</sup>)R<sup>1</sup>, OP(O)(OR<sup>k</sup>)(OR<sup>1</sup>), P(O)(OR<sup>k</sup>)(OR<sup>1</sup>), OR<sup>k</sup>, NHR<sup>k</sup>, N(R<sup>k</sup>)R<sup>1</sup>, +N(R<sup>k</sup>)(R<sup>1</sup>)R<sup>m</sup>, Si(R<sup>k</sup>)(R<sup>1</sup>)(R<sup>m</sup>), C(O)R<sup>k</sup>, C(O)OR<sup>k</sup>, C(O)N(R<sup>k</sup>)R<sup>1</sup>, OC(O)R<sup>k</sup>, OC(O)OR<sup>k</sup>, OC(O)N(R<sup>k</sup>)R<sup>1</sup>, N(R<sup>k</sup>)C(O)R<sup>1</sup>, N(R<sup>k</sup>)C(O)OR<sup>1</sup>, N(R<sup>k</sup>)C(O)N(R<sup>1</sup>)R<sup>m</sup>, un grupo hidrosoluble y los derivados tio de estos sustituyentes, y formas protonadas, cargadas y desprotonadas de cualquiera de estos sustituyentes, donde R<sup>k</sup>, R<sup>1</sup> y R<sup>m</sup> se seleccionan independientemente de H y  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{yy}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}^{17}\text{R}^{yy}$ ,

alquilo C<sub>1-15</sub>, heteroalquilo C<sub>1-15</sub>, cicloalquilo C<sub>3-15</sub>, heterocicloalquilo C<sub>1-15</sub>, arilo C<sub>5-15</sub> o heteroarilo C<sub>1-15</sub> opcionalmente sustituidos, o una combinación de los mismos, donde yy se selecciona de 1 a 1000, X<sup>17</sup> se selecciona independientemente de O, S y NR<sup>zz</sup>, y R<sup>zz</sup> y R<sup>yy</sup> se seleccionan independientemente de H y alquilo C<sub>1-3</sub>, dos o más de R<sup>k</sup>, R<sup>1</sup> y R<sup>m</sup> están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos

5 Cuando hay más de un sustituyente, cada sustituyente se selecciona independientemente. Dos o más sustituyentes se pueden conectar entre sí por sustitución de uno o más átomos de hidrógeno en cada uno de los sustituyentes por uno o más enlaces conectores, que pueden ser enlaces simples, dobles o triples, o, si son posibles estructuras de resonancia, el orden de enlace de dichos enlaces puede ser diferente en dos o más de estas estructuras de resonancia. Dos sustituyentes pueden así unirse con la formación de uno o más anillos.

10 Cuando los sustituyentes pueden estar "unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos", esto significa que los sustituyentes se pueden conectar entre sí a través de la sustitución de uno o más átomos de hidrógeno en cada uno de los sustituyentes por uno o más enlaces conectores. El término "arilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente aromático carbocíclico que comprende de 5 a 24 átomos de carbono de anillo, que puede ser cargado o no cargado y que puede consistir en un anillo o dos o más

15 anillos fusionados. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, pero de forma no limitativa, fenilo, naftilo y antraceno. El término "heteroarilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente aromático heterocíclico que comprende de 1 a 24 átomos de carbono de anillo y al menos un heteroátomo de anillo, por ejemplo, oxígeno, nitrógeno, azufre, silicio o fósforo, donde el nitrógeno y el azufre pueden opcionalmente oxidarse y el nitrógeno puede opcionalmente cuaternizarse, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados. Los heteroátomos se pueden conectar directamente entre sí. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, pero de forma no limitativa, piridinilo, pirimidilo, furanilo, pirrolilo, triazolilo, pirazolilo, pirazinilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, tienilo, indolilo, benzofuranilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, indazolilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, quinoxalinilo, isoquinolilo y quinolilo. En una forma de realización, un grupo heteroarilo comprende de 1 a 4 heteroátomos. Debe observarse que "grupo heteroarilo C<sub>1</sub>" denota que hay solo un carbono presente en el sistema de anillos del grupo heteroaromático (por tanto, los átomos de carbono en sustituyentes opcionales no se cuentan). Un ejemplo de tal grupo heteroaromático es un grupo tetrazolilo.

20 Los grupos "arilo" y "heteroarilo" abarcan también sistemas de anillos donde uno o más anillos no aromáticos están fusionados en un anillo o sistema de anillos arilo o heteroarilo. El término "alquilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero de forma no limitativa, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, octilo, decilo, isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *tert*-butilo, isopentilo, 2-metilbutilo, vinilo, alilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo y 1-butileno.

30 El término "heteroalquilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado, donde al menos un átomo de carbono se sustituye por un heteroátomo, por ejemplo, por oxígeno, nitrógeno, azufre, silicio o fósforo, donde el nitrógeno y el azufre pueden opcionalmente oxidarse y el nitrógeno puede opcionalmente cuaternizarse. Los heteroátomos se pueden conectar directamente entre sí. Los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, *n*-butiloxi, *tert*-butiloxi, metiloximetilo, etiloximetilo, metiloxietilo, etiloxietilo, metilaminometilo, dimetilaminometilo, metilaminoetilo, dimetilaminoetilo, metiltiometo, etiltiometo, etiltioetilo y metiltioetilo.

35 El término "cicloalquilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente hidrocarbilo cíclico no aromático saturado o insaturado, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados. Los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexano, ciclohexeno, 1,3-ciclohexadieno, decalinilo y 1,4-ciclohexadieno. El término "heterocicloalquilo" como se utiliza en este caso se refiere a un sustituyente hidrocarbilo cíclico no aromático saturado o insaturado, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados, donde al menos un carbono en uno de los anillos se sustituye por un heteroátomo, por ejemplo, por oxígeno, nitrógeno, azufre, silicio o fósforo, donde el nitrógeno y el azufre pueden opcionalmente oxidarse y el nitrógeno puede opcionalmente cuaternizarse. Los heteroátomos se pueden conectar directamente entre sí. Los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, tetrahydrofuranilo, pirrolidinilo, piperidinilo, 1,4-dioxano, decahydroquinolinilo, piperazinilo, oxazolidinilo y morfolinilo. Debe observarse que "grupo heterocicloalquilo C<sub>1</sub>" denota que hay solo un carbono presente en el sistema de anillos del heterocicloalcano (por tanto, los átomos de carbono en sustituyentes opcionales no se cuentan). Un ejemplo de tal grupo es un grupo dioxiranilo.

40 El número de átomos de carbono que pueden contener un "alquilo", "heteroalquilo", "cicloalquilo", "heterocicloalquilo", "arilo", "heteroarilo" y similares, se indica mediante una designación que sigue a dichos términos, es decir, alquilo C<sub>1-10</sub> significa que dicho alquilo puede contener de uno a diez carbonos (los átomos de carbono en sustituyentes opcionales unidos a este alquilo no se cuentan).

45 El término "carbociclo" en este caso se refiere a una fracción cicloalcano o areno saturada o insaturada, donde los términos "cicloalcano" y "areno" se definen como fracciones precursoras de los sustituyentes "cicloalquilo" y "arilo", respectivamente, tal y como se ha definido anteriormente.

50

55

El término "heterociclo" en este caso se refiere a una fracción heterocicloalcano o heteroareno saturada o insaturada, donde los términos "heterocicloalcano" y "heteroareno" se definen como fracciones precursoras de los sustituyentes "heterocicloalquilo" y "heteroarilo", respectivamente, tal y como se ha definido anteriormente.

5 La extensión "-ileno" a diferencia de "-il", por ejemplo, en "alquileo" a diferencia de "alquilo", indica que dicho, por ejemplo, "alquileo" es una fracción bivalente (o multivalente) conectada a una o más fracciones distintas mediante al menos uno o más enlaces dobles o dos o más enlaces simples, a diferencia de un grupo monovalente conectado a una fracción mediante un enlace simple en dicho, por ejemplo, "alquilo". El término "alquileo", por lo tanto, se refiere a una fracción hidrocarbilenio de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada; el término "heteroalquileo" como se usa en este caso se refiere a una fracción hidrocarbilenio de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada, donde al menos un carbono se sustituye por un heteroátomo; el término "arileno" como se utiliza en este caso se refiere a una fracción aromática carbocíclica, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados; el término "heteroarileno" como se utiliza en este caso se refiere a una fracción aromática carbocíclica, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados, donde al menos un carbono en uno de los anillos se sustituye por un heteroátomo; el término "cicloalquileo" como se utiliza en este caso se refiere a una fracción hidrocarbilenio cíclica no aromática saturada o insaturada, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados; el término "heterocicloalquileo" como se utiliza en este caso se refiere a una fracción hidrocarbilenio cíclica no aromática saturada o insaturada, que puede consistir en un anillo o dos o más anillos fusionados, donde al menos un carbono en uno de los anillos se sustituye por un heteroátomo. Las fracciones bivalentes ejemplares incluyen aquellos ejemplos dados para los grupos monovalentes anteriormente donde se elimina un átomo de hidrógeno. El prefijo "poli" en "polialquileo", "poliheteroalquileo", "poliarileno", "poliheteroarileno", "policicloalquileo", "poliheterocicloalquileo" y similares indica que dos o más de tales fracciones "-ileno", por ejemplo, fracciones alquileo, se unen para formar una fracción multivalente ramificada o no ramificada que contiene dos o más sitios de unión para fracciones adyacentes. De forma similar, el prefijo "oligo", por ejemplo, en oligoetilenglicol, indica que dos o más fracciones etilenglicol se unen para formar una fracción multivalente ramificada o no ramificada. La diferencia entre los prefijos "oligo" y "poli" es que el prefijo "oligo" se usa más frecuentemente para indicar un número relativamente pequeño de unidades de repetición, mientras que el prefijo "poli" normalmente se refiere a un número relativamente grande de unidades de repetición.

[0016] Ciertos compuestos de la invención poseen centros quirales y/o enlaces dobles, y/o pueden tener tautómeros o atropisómeros; las mezclas tautoméricas, enantioméricas, diastereoméricas, atropisoméricas y geométricas de dos o más isómeros, en cualquier composición, al igual que los isómeros individuales (incluidos tautómeros y atropisómeros) están abarcados en el alcance de la presente invención. Siempre que se usa el término "isómero", se refiere a un isómero atropisomérico, tautomérico, enantiomérico, diastereomérico y/o geométrico o a una mezcla de dos o más de estos isómeros, a menos que el contexto dicte lo contrario.

El término "peptidomimético" se refiere a un grupo o fracción que tiene una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido o péptido, pero funciona de modo similar a un aminoácido o péptido de origen natural. Por lo tanto, un peptidomimético es un imitador de un aminoácido o un imitador de un péptido.

El término "aminoácido no natural" se destina a representar el estereoisómero D de un aminoácido de origen natural.

El término "enlace" en este caso se refiere a una conexión covalente entre dos átomos y puede referirse a un enlace simple, un enlace doble o un enlace triple, o, si son posibles estructuras de resonancia, el orden de enlace de dicho enlace puede ser diferente en dos o más de estas estructuras de resonancia. Por ejemplo, si el enlace es parte de un anillo aromático, el enlace puede ser un enlace simple en una estructura de resonancia y un enlace doble en otra estructura de resonancia. Si se declara que un "enlace doble" o un "enlace triple" está presente entre dos átomos, este enlace doble o triple puede estar localizado, pero también puede ser que este enlace doble o triple esté deslocalizado, lo que significa que solo en una o algunas estructuras de resonancia un enlace doble o triple está de hecho presente entre los dos átomos, mientras que el orden de enlace puede ser diferente en una o más estructuras de resonancia distintas. Al mismo tiempo, los enlaces marcados como enlace simple en una estructura de resonancia pueden ser enlaces dobles en otra estructura de resonancia.

Los compuestos de la invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más átomos que constituyen tales compuestos. Se pretende que todas las variaciones isotópicas de los compuestos de esta invención, ya sean o no radiactivas, estén abarcadas en el alcance de esta invención.

50 La expresión "sal farmacéuticamente activa" como se utiliza en este caso se refiere a una sal orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la invención. Para los compuestos que contienen uno o más grupos básicos, por ejemplo, un grupo amina, se pueden formar sales de adición de ácido. Para los compuestos que contienen uno o más grupos ácidos, por ejemplo, un grupo ácido carboxílico, se pueden formar sales de adición de base. Para los compuestos que contienen tanto grupos ácidos como básicos, los zwitteriones pueden además obtenerse como sales. Cuando el compuesto de la invención comprende más de un átomo o grupo cargado, puede haber múltiples (distintos) contraiones.

La expresión "solvato farmacéuticamente aceptable" se refiere a una asociación de una o más moléculas de solvente con un compuesto de la invención. Los ejemplos de solventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero de forma no limitativa, agua, alcohol isopropílico, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo y ácido acético. Cuando se hace referencia a agua como solvato, se puede usar el término "hidrato".

- El término "conjugado" a continuación se refiere a un compuesto con la fórmula (III) o a un conjugado de un compuesto con la fórmula (I) o un derivado de los mismos, a menos que el contexto dicte lo contrario. El término "conjugado conector-agente" a continuación se refiere a un compuesto con la fórmula (IV), a menos que el contexto dicte lo contrario. El término "agente" a continuación se refiere a un compuesto con la fórmula (I) o (I'), a menos que el contexto dicte lo contrario.
- 5 El término "conector bifuncional" a continuación se refiere a un compuesto con la fórmula (VIII), a menos que el contexto dicte lo contrario.
- El término "conector" generalmente se refiere a la fracción que une  $V^2$  a  $Z$  en un compuesto con la fórmula (III) o la fracción moduladora conectada a  $Z$  en un compuesto con la fórmula (IV).
- 10 El término "fracción de dirección" se refiere a cualquier fracción que específicamente se une o se asocia reactivamente o forma complejos con una fracción específicamente o en relativo exceso presente en o cerca del sitio diana, sobre, en o cerca de la célula diana, o en (la proximidad de) el tejido u órgano diana, por ejemplo, un receptor, un complejo receptor, sustrato, determinante antigénico u otra fracción receptiva, o que puede dirigir el conjugado al sitio diana mediante otros mecanismos en virtud de su naturaleza, por ejemplo, a través del efecto EPR. Los ejemplos de una
- 15 fracción de dirección incluyen, pero de forma no limitativa, un aptámero, un anticuerpo o fragmento o derivado de un anticuerpo, un polímero, un dendrímero, una lectina, un modificador de la respuesta biológica, una enzima, una vitamina, un factor de crecimiento, un esteroide, un residuo de azúcar, un residuo de oligosacárido, una proteína portadora y una hormona, o cualquier combinación de los mismos.
- La expresión "fracción que mejora las propiedades farmacológicas del compuesto" se refiere a una fracción que cambia las propiedades farmacológicas (por ejemplo, las propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas, fisicoquímicas y biofarmacéuticas) de un compuesto de esta invención de manera que se puede obtener un mejor efecto terapéutico. La fracción puede, por ejemplo, aumentar la solubilidad en agua, aumentar el tiempo de circulación, aumentar el índice terapéutico o reducir la inmunogenicidad.
- 20 El término "grupo de enlace" se refiere a un elemento estructural de un compuesto que enlaza un elemento estructural de dicho compuesto con uno o más elementos estructurales diferentes de dicho mismo compuesto.
- La expresión "un número que representa el grado de ramificación" se utiliza para indicar que el número en subíndice junto a un paréntesis de cierre representa cuántas unidades de la fracción incluida en los paréntesis están unidas cada una directamente a la fracción inmediatamente a la izquierda del paréntesis de apertura correspondiente. Por ejemplo, A-(B) $b$ , donde  $b$  es un número que representa un grado de ramificación, significa que  $b$  unidades B están todas unidas
- 30 directamente a A. Esto significa que cuando  $b$  es 2, la fórmula se reduce a B-A-B.
- La expresión "un número que representa el grado de polimerización" se utiliza para indicar que el número en subíndice junto a un paréntesis de cierre representa cuántas unidades de la fracción incluida en los paréntesis están conectadas entre sí. Por ejemplo, A-(B) $b$ , donde  $b$  es un número que representa un grado de polimerización, significa que, cuando  $b$  es 2, la fórmula se reduce a A-B-B.
- 35 El término "separador de liberación única" se refiere a un separador de autoeliminación que puede liberar una fracción tras una autoinmolación.
- El término "separador de liberación múltiple" se refiere a un separador de autoeliminación que puede liberar dos o más fracciones tras una autoinmolación (repetitiva).
- 40 El término "separador de cascada de electrones" se refiere a un separador de autoeliminación, ramificado o no ramificado, que puede autoeliminarse a través de una o más eliminaciones de cascada de electrones  $1,2+2n$  ( $n \geq 1$ ).
- El término "separador de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil" se refiere a un separador de autoeliminación que puede eliminarse a través de un proceso de ciclación con la formación de un derivado de urea cíclico.
- El término "sistema separador" se refiere a una única fracción separadora de autoeliminación o a dos o más de la misma o de diferentes fracciones separadoras de autoeliminación acopladas. Un sistema separador puede ser ramificado o no
- 45 ramificado y contener uno o más sitios de unión para  $Z$  al igual que  $V^1$  y opcionalmente  $L$ .
- En este documento y en sus reivindicaciones, los verbos "comprender", "tener", "contener" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para referirse a que los artículos que están "comprendidos", "tenidos" o "contenidos" están incluidos, pero los artículos no específicamente mencionados no están excluidos. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "una" o "un" no excluye la posibilidad de que más de una unidad del elemento esté presente,
- 50 a menos que el contexto requiera claramente que haya una y solo una unidad de los elementos. Por lo tanto, el artículo indefinido "una" o "un" significa normalmente "al menos uno/a".
- Esta especificación incluye muchas formas de realización. Cabe señalar que las formas de realización que no se mencionan específicamente y que son el resultado de la combinación de dos o más de dichas formas de realización mencionadas están abarcadas también por esta invención. En las estructuras genéricas en toda esta descripción y en las reivindicaciones se utilizan letras para definir elementos estructurales. Algunas de estas letras pueden confundirse con letras que representan un átomo, tales como C, N, O, P, K, B, F, S, U, V, W, I e Y. Para evitar confusiones, siempre que estas letras no representen un átomo, se dan en tipografía negra.
- 55 Cuando hay uno o más adjetivos y/o sintagmas adjetivales para un sustantivo que está a) el primero en una lista de sustantivos o b) en cualquier sitio en medio de una lista de sustantivos y dicho sustantivo y adjetivos juntos están precedidos por la palabra "y" u "o", los adjetivos no solo se refieren a dicho sustantivo, sino a todos los sustantivos siguientes por separado, a menos que el contexto dicte lo contrario. Esto, por ejemplo, significa que la expresión "alquiler
- 60

C<sub>1-4</sub>, heteroalquilo C<sub>1-4</sub>, cicloalquilo C<sub>3-7</sub> o heterocicloalquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituidos" debe leerse como "alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, heteroalquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido, cicloalquilo C<sub>3-7</sub> opcionalmente sustituido o heterocicloalquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido" y que la expresión "alquilo C<sub>1-4</sub>, heteroalquilo C<sub>1-4</sub>, y cicloalquilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>5-8</sub> o heterocicloalquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituidos" debe leerse como "alquilo C<sub>1-4</sub>, heteroalquilo C<sub>1-4</sub> y cicloalquilo C<sub>3-7</sub> opcionalmente sustituido, arilo C<sub>5-8</sub> opcionalmente sustituido o heterocicloalquilo C<sub>1-7</sub> opcionalmente sustituido". En toda esta descripción y en las reivindicaciones, las estructuras moleculares o partes de las mismas están dibujadas. Como de costumbre en tales dibujos, los enlaces entre átomos están representados por líneas, en algunos casos, para indicar la estereoquímica, mediante líneas onduladas, en negrita o discontinuas o con forma de cuña. Un enlace representado por una línea ondulada indica una estereoquímica no especificada en el centro quiral al que está conectada; una estructura o subestructura con uno o más de tales enlaces ondulados representa de hecho un conjunto de (sub)estructuras en las que cada centro quiral puede tener o la configuración *R* o la *S*. Normalmente, una línea que finaliza en el espacio (un extremo "suelto"), es decir, en un extremo que no tiene otra línea o átomo específico conectado, representa un grupo CH<sub>3</sub>. Esto es correcto para los dibujos que representan los compuestos de esta invención. Para aquellas estructuras que representan un elemento estructural de los compuestos de esta invención, una línea que finaliza en el espacio puede indicar la posición de unión de otro elemento estructural del compuesto. Esto se ha indicado con una línea ondulada perpendicular y que cruza la línea "suelta".

Además, las estructuras o partes de las mismas han sido dibujadas, bajo la suposición de que las estructuras se leen de izquierda a derecha, lo que significa que, por ejemplo, en los dibujos de los compuestos con la fórmula (III), **V**<sup>2</sup> se localiza en el lado izquierdo y **Z** se localiza en el lado derecho de tales estructuras o partes de las mismas, a menos que el contexto implique lo contrario.

Las abreviaturas siguientes se usan en este caso y tienen las definiciones indicadas: Ac: acetilo; Bn: bencilo; Boc: *tert*-butiloxicarbonilo; CBI: 1,2,9,9a-tetrahidrociclopropa[c]benc[e]indol-4-ona; Cbz: carbobenciloxi; Cit: citrulina; DCC: *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida; DCE: 1,2-dicloroetano; DCM: diclorometano; DMAP: 4-dimetilaminopiridina; DMF: *N,N*-dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; DiPEA: *N,N*-diisopropiletilamina; EEDQ: 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina; ESI: ionización por electrospray; Fmoc: fluorenilmetiloxicarbonilo; HOBt: 1-hidroxibenzotriazol; HOSu: hidroxisuccinimida; HSA: seroalbúmina humana; LC/MS: cromatografía de líquidos-espectrometría de masas; MOM-Cl: metil clorometil éter; PABA: alcohol *p*-aminobencílico; PNPCl: *p*-nitrofenil cloroformiato; RT: temperatura ambiente; SEC: cromatografía de exclusión por tamaño; TCEP: tris(2-carboxietil)fosfina; TFA: ácido trifluoroacético; THF: tetrahidrofurano; Val: valina.

### 30 Agentes, conjugados conector-agente, conjugados y conectores bifuncionales

[0017] Esta invención se refiere a conjugados de anticuerpos con la fórmula (III) de análogos novedosos del agente alquilante de ADN CC-1065 como se especifica en las reivindicaciones. Se considera que los agentes con la fórmula (I) se van a usar para tratar una enfermedad que se caracteriza por una proliferación (celular) no deseada. Por ejemplo, tal agente se puede usar para tratar un tumor, cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

35 [0018] Se considera, en un aspecto, que los conjugados de la presente invención son aplicables para dirigir agentes con la fórmula (I) a un sitio diana específico donde el conjugado puede ser convertido en uno o más agentes o ser inducido para ser convertido en uno o más de dichos agentes. Esta invención puede además hallar aplicación en la liberación controlada (no específica) de uno o más de dichos agentes a partir de un conjugado, con el objetivo de, por ejemplo, mejorar las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas, farmacodinámicas y/o farmacocinéticas.

40 Los compuestos con la fórmula (I) representan derivados de duocarmicina que tienen preferiblemente heteroátomos o grupos polares en posiciones seleccionadas en la fracción de unión a ADN o en sustituyentes sobre la fracción de unión a ADN o alquilante de ADN. Se descubrió de forma imprevista que los compuestos con la fórmula (III), que son conjugados de los compuestos con la fórmula (I), son más eficaces *in vivo* y tienen propiedades mejoradas, tal como una polaridad aumentada y una liberación de fármaco optimizada, en comparación con compuestos similares del estado de la técnica.

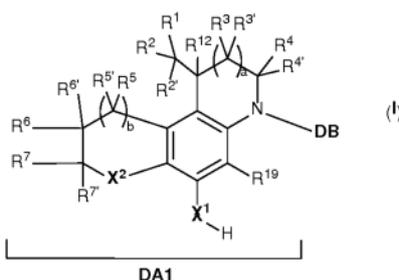
50 [0019] La presente solicitud se refiere a un conjugado de un compuesto con la fórmula (I) según una de las formas de realización anteriores y a derivados del mismo. Tal conjugado contiene una o más fracciones moduladoras. En una forma de realización más específica, tal conjugado tiene una estabilidad suficiente en la circulación, pero se activa de manera eficaz y selectiva para liberar el compuesto con la fórmula (I) en el sitio diana, lo que lleva a una ventana terapéutica adecuada. La longitud y la naturaleza del conector entre la fracción funcional y el compuesto con la fórmula (I) demostraron ser un colaborador importante. En un aspecto de esta invención, el conector tiene una longitud de conector reducida con respecto a las longitudes de conector en conjugados similares del estado de la técnica, lo que lleva a una eficacia mejorada. En otro aspecto, el conector contiene un sistema separador de autoeliminación con propiedades mejoradas, lo que lleva, por ejemplo, a una tasa de autoeliminación optimizada, una liberación de fármaco optimizada y/o una polaridad aumentada. En otro aspecto más, el conector entre la fracción funcional y el compuesto con la fórmula (I) contiene uno o más grupos diseñados para mejorar las propiedades farmacocinéticas del conjugado.

Estos grupos pueden estar presentes en **L** y/o **Y** y/o en cualquiera de las otras fracciones que componen un compuesto con la fórmula (III). Las propiedades farmacocinéticas afectadas pueden, por ejemplo, incluir la solubilidad en agua, la resistencia a múltiples fármacos, la estabilidad en el plasma, la labilidad proteolítica, la absorción, la distribución, el metabolismo, la excreción y la internalización. Algunas de estas propiedades pueden no solo afectar al comportamiento *in vivo*, sino también al comportamiento *in vitro* y al comportamiento durante la preparación de un compuesto con la fórmula (III). Por ejemplo, la solubilidad en agua aumentada de un compuesto con la fórmula (IV) puede afectar favorablemente a la conjugación de tal compuesto con una fracción funcional en medio acuoso. La liberación prematura del agente precursor, es decir, el compuesto con la fórmula (I), en la circulación puede no ser deseable, pero una desactivación relativamente rápida del compuesto liberado puede reducir los efectos secundarios tóxicos en este caso. La desactivación se puede ajustar eligiendo la fracción alquilante de ADN y de unión a ADN apropiadas. La desactivación puede ocurrir por varios mecanismos, incluida la escisión enzimática o hidrolítica de la unidad alquilante de ADN de la unidad de unión a ADN.

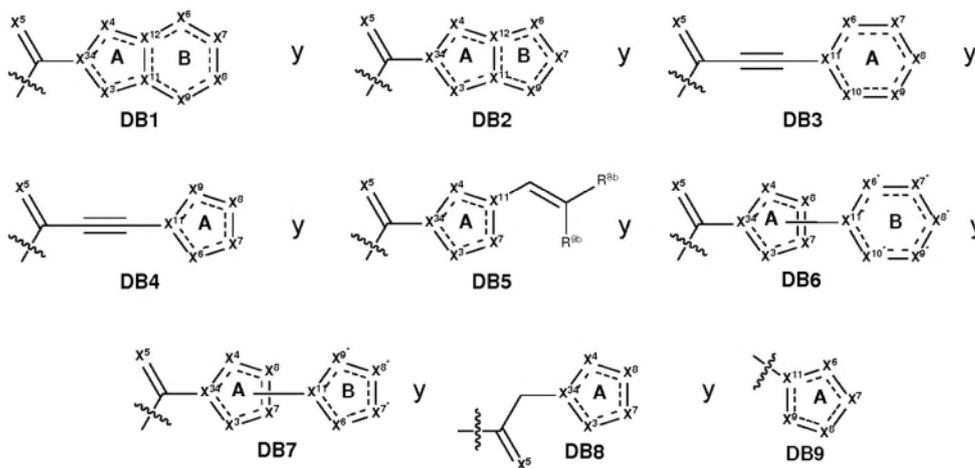
[0020] Los compuestos con la fórmula (I) son adecuados para la aplicación en fines de administración de fármacos, incluidas las aplicaciones de dirección de fármacos y de liberación controlada, usando compuestos con las fórmulas (III) y (IV).

### Agentes

[0021] En un aspecto, la presente descripción proporciona un conjugado de anticuerpo con la fórmula (III) de un compuesto con la fórmula (I):



o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde DB es una fracción de unión a ADN y se selecciona del grupo que consiste en



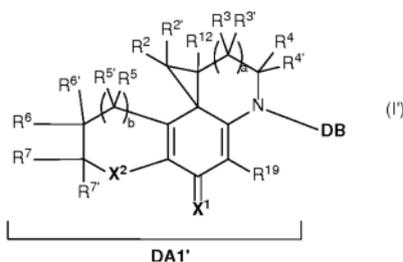
R<sup>1</sup> es un grupo de salida;

- $R^2, R^2, R^3, R^3, R^4, R^4, R^{12}$  y  $R^{19}$  se seleccionan independientemente de H, OH, SH,  $NH_2$ ,  $N_3$ ,  $NO_2$ , NO,  $CF_3$ , CN,  $C(O)NH_2$ ,  $C(O)H$ ,  $C(O)OH$ , halógeno,  $R^a$ ,  $SR^a$ ,  $S(O)R^a$ ,  $S(O)_2R^a$ ,  $S(O)OR^a$ ,  $S(O)_2OR^a$ ,  $OS(O)R^a$ ,  $OS(O)_2R^a$ ,  $OS(O)OR^a$ ,  $OS(O)_2OR^a$ ,  $OR^a$ ,  $NHR^a$ ,  $N(R^a)R^b$ ,  $+N(R^a)(R^b)R^c$ ,  $P(O)(OR^a)(OR^b)$ ,  $OP(O)(OR^a)(OR^b)$ ,  $SiR^aR^bR^c$ ,  $C(O)R^a$ ,  $C(O)OR^a$ ,  $C(O)N(R^a)R^b$ ,  $OC(O)R^a$ ,  $OC(O)OR^a$ ,  $OC(O)N(R^a)R^b$ ,  $N(R^a)C(O)R^b$ ,  $N(R^a)C(O)OR^b$  y  $N(R^a)C(O)N(R^b)R^c$ , donde
- $R^a, R^b$  y  $R^c$  se seleccionan independientemente de H y alquilo  $C_{1-3}$  o heteroalquilo  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituidos, o  $R^3 + R^3$  y/o  $R^4 + R^4$  se seleccionan independientemente de =O, =S, =NOR<sup>18</sup>, =C(R<sup>18</sup>)R<sup>18'</sup>, y =NR<sup>18</sup>, R<sup>18</sup> y R<sup>18'</sup> se seleccionan independientemente de H y alquilo  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituido, dos o más de  $R^2, R^2, R^3, R^3, R^4, R^4$  y  $R^{12}$  están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos;
- $X^2$  se selecciona de O,  $C(R^{14})(R^{14})$  y  $NR^{14}$ , donde  $R^{14}$  y  $R^{14}$  tienen el mismo significado que el definido para  $R^7$  y se seleccionan independientemente, o  $R^{14}$  y  $R^7$  están ausentes, dando como resultado un enlace doble entre los átomos designados para llevar a  $R^7$  y  $R^{14}$ ;
- $R^5, R^5, R^6, R^6, R^7$  y  $R^7$  se seleccionan independientemente de H, OH, SH,  $NH_2$ ,  $N_3$ ,  $NO_2$ , NO,  $CF_3$ , CN,  $C(O)NH_2$ ,  $C(O)H$ ,  $C(O)OH$ , halógeno,  $R^e$ ,  $SR^e$ ,  $S(O)R^e$ ,  $S(O)_2R^e$ ,  $S(O)OR^e$ ,  $S(O)_2OR^e$ ,  $OS(O)R^e$ ,  $OS(O)_2R^e$ ,  $OS(O)OR^e$ ,  $OS(O)_2OR^e$ ,  $OR^e$ ,  $NHR^e$ ,  $N(R^e)R^f$ ,  $+N(R^e)(R^f)R^g$ ,  $P(O)(OR^e)(OR^f)$ ,  $OP(O)(OR^e)(OR^f)$ ,  $SiR^eR^fR^g$ ,  $C(O)R^e$ ,  $C(O)OR^e$ ,  $C(O)N(R^e)R^f$ ,  $OC(O)R^e$ ,  $OC(O)OR^e$ ,  $OC(O)N(R^e)R^f$ ,  $N(R^e)C(O)R^f$ ,  $N(R^e)C(O)OR^f$ ,  $N(R^e)C(O)N(R^f)R^g$  y un grupo hidrosoluble, donde
- $R^e, R^f$  y  $R^g$  se seleccionan independientemente de H y  $(CH_2CH_2O)_{ee}CH_2CH_2X^{13}R^{e1}$ , alquilo  $C_{1-15}$ , heteroalquilo  $C_{1-15}$ , cicloalquilo  $C_{3-15}$ , heterocicloalquilo  $C_{1-15}$ , arilo  $C_{5-15}$  o heteroarilo  $C_{1-15}$  opcionalmente sustituidos, donde ee se selecciona de 1 a 1000,  $X^{13}$  se selecciona de O, S y  $NR^{f1}$ , y  $R^{f1}$  y  $R^{e1}$  se seleccionan independientemente de H y alquilo  $C_{1-3}$ , uno o más de los sustituyentes opcionales en  $R^e, R^f$  y/o  $R^g$  son opcionalmente un grupo hidrosoluble, dos o más de  $R^e, R^f$  y  $R^g$  están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos, o  $R^5 + R^5$  y/o  $R^6 + R^6$  y/o  $R^7 + R^7$  se seleccionan independientemente de =O, =S, =NOR<sup>e3</sup>, =C(R<sup>e3</sup>)R<sup>e4</sup>, y =NR<sup>e3</sup>, R<sup>e3</sup> y R<sup>e4</sup> se seleccionan independientemente de H y alquilo  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituido, o  $R^5 + R^6$  y/o  $R^6 + R^7$  y/o  $R^7 + R^{14}$  están ausentes, dando como resultado un enlace doble entre los átomos designados para llevar  $R^5$  y  $R^6$ , y/o  $R^6$  y  $R^7$ , y/o  $R^7$  y  $R^{14}$ , respectivamente, dos o más de  $R^5, R^5, R^6, R^6, R^7, R^7, R^{14}$  y  $R^{14}$  están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos;
- $X^1$  es O;
- $X^3$  se selecciona de O, S,  $C(R^{15})R^{15}$ ,  $-C(R^{15})(R^{15})-C(R^{15})(R^{15})-$ ,  $-N(R^{15})-N(R^{15})-$ ,  $-C(R^{15})(R^{15})-N(R^{15})-$ ,  $-N(R^{15})-C(R^{15})(R^{15})-$ ,  $-C(R^{15})(R^{15})-O-$ ,  $-O-C(R^{15})(R^{15})-$ ,  $-C(R^{15})(R^{15})-S-$ ,  $-S-C(R^{15})(R^{15})-$ ,  $-C(R^{15})=C(R^{15})-$ ,  $=C(R^{15})-C(R^{15})-$ ,  $=N=C(R^{15})-$ ,  $=N-C(R^{15})-$ ,  $-C(R^{15})=N-$ ,  $=C(R^{15})-N-$ ,  $-N=N-$ ,  $=N=N-$ ,  $CR^{15}$ , N y  $NR^{15}$ , o en **DB1** y **DB2**  $-X^3$  representa  $-X^{3a}$  y  $X^{3b}$ , donde  $X^{3a}$  está conectado con  $X^{34}$ , un enlace doble está presente entre  $X^{34}$  y  $X^4$ , y  $X^{3b}$  está conectado con  $X^{11}$ , donde  $X^{3a}$  se selecciona independientemente de H y  $(CH_2CH_2O)_{ee}CH_2CH_2X^{13}R^{e1}$ , alquilo  $C_{1-3}$  o heteroalquilo  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituidos y no unidos a ningún otro sustituyente;  $X^4$  se selecciona de O, S,  $C(R^{16})R^{16}$ ,  $NR^{16}$ , N y  $CR^{16}$ ;
- $X^5$  se selecciona de O, S,  $C(R^{17})R^{17}$ ,  $NOR^{17}$  y  $NR^{17}$ , donde  $R^{17}$  y  $R^{17}$  se seleccionan independientemente de H y alquilo  $C_{1-3}$  o heteroalquilo  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituidos y no unidos a ningún otro sustituyente;
- $X^6$  se selecciona de  $CR^{11}$ ,  $CR^{11}(R^{11})$ , N,  $NR^{11}$ , O y S;
- $X^7$  se selecciona de  $CR^8$ ,  $CR^8(R^8)$ , N,  $NR^8$ , O y S;
- $X^8$  se selecciona de  $CR^9$ ,  $CR^9(R^9)$ , N,  $NR^9$ , O y S;
- $X^9$  se selecciona de  $CR^{10}$ ,  $CR^{10}(R^{10})$ , N,  $NR^{10}$ , O y S;
- $X^{10}$  se selecciona de  $CR^{20}$ ,  $CR^{20}(R^{20})$ , N,  $NR^{20}$ , O y S;
- $X^{11}$  se selecciona de C,  $CR^{21}$  y N, o  $X^{11}-X^{3b}$  se selecciona de  $CR^{21}$ ,  $CR^{21}(R^{21})$ , N,  $NR^{21}$ , O y S;  $X^{12}$  se selecciona de C,  $CR^{22}$  y N;
- $X^{6*}, X^{7*}, X^{8*}, X^{9*}, X^{10*}$  y  $X^{11*}$  tienen el mismo significado que el definido para  $X^6, X^7, X^8, X^9, X^{10}$  y  $X^{11}$ , respectivamente, y se seleccionan independientemente;
- $X^{34}$  se selecciona de C,  $CR^{23}$  y N;
- el átomo del anillo **B** de  $X^{11*}$  en **DB6** y **DB7** está conectado a un átomo de anillo del anillo **A** de manera que el anillo **A** y el anillo **B** en **DB6** y **DB7** están directamente conectados mediante un enlace simple;
- significa que el enlace indicado puede ser un enlace simple o un enlace doble no acumulado, opcionalmente deslocalizado;
- $R^8, R^8, R^9, R^9, R^{10}, R^{10}, R^{11}, R^{11}, R^{15}, R^{15}, R^{15}, R^{15}, R^{16}, R^{16}, R^{20}, R^{20}, R^{21}, R^{21}, R^{22}$  y  $R^{23}$  se seleccionan cada uno independientemente de H, OH, SH,  $NH_2$ ,  $N_3$ ,  $NO_2$ , NO,  $CF_3$ , CN,  $C(O)NH_2$ ,  $C(O)H$ ,  $C(O)OH$ , halógeno,  $R^h$ ,  $SR^h$ ,  $S(O)R^h$ ,  $S(O)_2R^h$ ,  $S(O)OR^h$ ,  $S(O)_2OR^h$ ,  $OS(O)R^h$ ,  $OS(O)_2R^h$ ,  $OS(O)OR^h$ ,  $OS(O)_2OR^h$ ,  $OR^h$ ,  $NHR^h$ ,  $N(R^h)R^i$ ,  $+N(R^h)(R^i)R^j$ ,  $P(O)(OR^h)(OR^i)$ ,  $OP(O)(OR^h)(OR^i)$ ,  $SiR^hR^iR^j$ ,  $C(O)R^h$ ,  $C(O)OR^h$ ,  $C(O)N(R^h)R^i$ ,  $OC(O)R^h$ ,  $OC(O)OR^h$ ,  $OC(O)N(R^h)R^i$ ,  $N(R^h)C(O)R^i$ ,  $N(R^h)C(O)OR^i$ ,  $N(R^h)C(O)N(R^i)R^j$  y un grupo hidrosoluble, donde
- $R^h, R^i$  y  $R^j$  se seleccionan independientemente de H y  $(CH_2CH_2O)_{ee}CH_2CH_2X^{13}R^{e1}$ , alquilo  $C_{1-15}$ , heteroalquilo  $C_{1-15}$ , cicloalquilo  $C_{3-15}$ , heterocicloalquilo  $C_{1-15}$ , arilo  $C_{5-15}$  o heteroarilo  $C_{1-15}$  opcionalmente sustituidos, uno o más de los sustituyentes opcionales en  $R^h, R^i$  y/o  $R^j$  son opcionalmente un grupo hidrosoluble, dos o más de  $R^h, R^i$  y  $R^j$  están

opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos,

- 5 o  $R^8 + R^8$  y/o  $R^9 + R^9$  y/o  $R^{10} + R^{10}$  y/o  $R^{11} + R^{11}$  y/o  $R^{15} + R^{15}$  y/o  $R^{15'} + R^{15'}$  y/o  $R^{16} + R^{16}$  y/o  $R^{20} + R^{20}$  y/o  $R^{21} + R^{21}$  se seleccionan independientemente de H y alquilo  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituido, dos o más de  $R^8, R^8, R^9, R^9, R^{10}, R^{10}, R^{11}, R^{11}, R^{15}, R^{15}, R^{15'}, R^{15'}, R^{16}, R^{16}, R^{20}, R^{20}, R^{21}, R^{21}, R^{22}$  y  $R^{23}$  están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos;
- 10  $R^{9b}$  y  $R^{9b}$  se seleccionan independientemente y tienen el mismo significado que  $R^8$ , excepto que pueden no estar unidos a cualquier otro sustituyente;
- uno de  $R^4$  y  $R^4$  y uno de  $R^{16}$  y  $R^{16}$  puede opcionalmente estar unido por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos;
- uno de  $R^2, R^2, R^3$  y  $R^3$  y uno de  $R^5$  y  $R^5$  pueden opcionalmente estar unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos; y a y b se seleccionan independientemente de 0 y 1.

[0022] En otro aspecto, esta divulgación se refiere a un compuesto con la fórmula (I'):



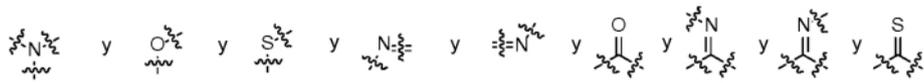
- 15 o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde todos los sustituyentes tienen el mismo significado que el descrito para los compuestos con la fórmula (I). Se alega que los compuestos con la fórmula (I) se convierten en (I') *in vivo* con la eliminación concomitante de  $H-R^1$ .

- 20 [0023] Por lo tanto, esta solicitud se refiere a un compuesto con la fórmula (I'), donde dicho compuesto comprende un grupo ciclopropilo, que se puede formar a través del reordenamiento y la eliminación concomitante de  $H-R^1$  a partir de un compuesto con la fórmula (I). Todas las formas de realización para un compuesto con la fórmula (I) o una fracción del mismo también son válidas para un compuesto con la fórmula (I') o una fracción del mismo, a menos que el contexto dicte lo contrario.

- 25 [0024] En una forma de realización más específica, esta divulgación se refiere a un compuesto con la fórmula (I) incorporado en un compuesto con la fórmula (III) como se ha descrito anteriormente, donde

- a) la fracción **DB** no comprende una fracción **DA1** o **DA1'**; y
- b) el anillo **B** en **DB1** es un heterociclo; y
- c) si  $X^3$  en **DB1** representa  $-X^{3a}$  y  $X^{3b}$ - y el anillo **B** es aromático, entonces dos sustituyentes vecinales en dicho anillo **B** se unen para formar un carbociclo o un heterociclo, opcionalmente sustituidos, fusionado a dicho anillo **B**; y
- 30 d) si  $X^3$  en **DB2** representa  $-X^{3a}$  y  $X^{3b}$ - y el anillo **B** es aromático, entonces dos sustituyentes vecinales en dicho anillo **B** se unen para formar un heterociclo opcionalmente sustituido fusionado a dicho anillo **B**, un carbociclo no aromático opcionalmente sustituido fusionado a dicho anillo **B** o un carbociclo aromático sustituido que se fusiona a dicho anillo **B** y al que se une al menos un sustituyente que contiene un grupo hidroxilo, un grupo amino primario o un grupo amino secundario, donde la amina primaria o secundaria no es un átomo de anillo en un sistema de anillos aromáticos ni es parte de una amida; y
- 35 e) si el anillo **A** en **DB2** es un anillo aromático de 6 miembros, entonces los sustituyentes del anillo **B** no se unen para formar un anillo fusionado al anillo **B**; y
- f) dos sustituyentes vecinales en el anillo **A** en **DB8** se unen para formar un carbociclo o un heterociclo, opcionalmente sustituidos, fusionado a dicho anillo **A** para formar una fracción bicíclica a la que no están fusionados más anillos; y
- 40 g) el anillo **A** en **DB9** junto con cualquier anillo fusionado a dicho anillo **A** contiene al menos dos heteroátomos de anillo.

[0025] En otra forma de realización más específica, esta divulgación se refiere a un compuesto con la fórmula (I) como se ha descrito anteriormente, donde al menos uno de los sustituyentes  $R^1, R^5, R^6, R^7, R^{14}, R^8, R^9, R^9, R^{10}, R^{11}, R^{11}, R^{15}, R^{15}, R^{15}, R^{15}, R^{16}, R^{16}, R^{20}, R^{20}, R^{21}, R^{21}, R^{22}$  y  $R^{23}$  contiene una fracción  $X^{14}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_f\text{CH}_2\text{CH}_2X^{14}$ , donde  $f$  se selecciona de 1 a 1000 y cada  $X^{14}$  se selecciona independientemente de



5

que está conectado con el sitio de unión de dicho sustituyente o mediante un enlace directo o mediante una fracción, que es parte de dicho mismo sustituyente, que no comprende un disulfuro, una hidrazona, una hidrazida, un éster, un aminoácido natural o un péptido que contiene al menos un aminoácido natural.

[0026] Esta aplicación abarca un conjugado de un compuesto con la fórmula (I) donde  $f$  es mayor a 1000.

10 [0027] En otra forma de realización más específica, esta divulgación se refiere a un compuesto con la fórmula (I) incorporado en un compuesto con la fórmula (III) como se ha descrito anteriormente, donde al menos uno de los sustituyentes  $R^1, R^5, R^6, R^6, R^7, R^7, R^{14}, R^{14}, R^8, R^8, R^9, R^9, R^{10}, R^{10}, R^{11}, R^{11}, R^{15}, R^{15}, R^{15}, R^{15}, R^{16}, R^{16}, R^{20}, R^{20}, R^{21}, R^{21}, R^{22}$  y  $R^{23}$  contiene una fracción triazol.

15 [0028] Debe entenderse que, en todo este documento, cuando se hace referencia a un compuesto con la fórmula (I), esto incluye la referencia a un compuesto con la fórmula (I'), a menos que se refiera a partes estructurales de (I) no presentes en (I') o el contexto dicte lo contrario. De forma similar, cuando se hace referencia a una parte (fragmento) estructural, conjugado conector-agente o conjugado derivado de un compuesto con la fórmula (I), esto incluye la referencia a una parte (fragmento) estructural, conjugado conector-agente o conjugado derivado de un compuesto con la fórmula (I') similares, a menos que se refiera a partes estructurales de (I) no presentes en (I') o el contexto dicte lo contrario.

20

[0029] Debería entenderse además que esta divulgación se refiere a compuestos enantioméricamente puros y/o diastereoméricamente puros con la fórmula (I) al igual que a mezclas enantioméricas y/o diastereoméricas de compuestos con la fórmula (I).

25 [0030] Las consideraciones acerca de los efectos de los sustituyentes y los efectos de los conectores, las unidades alquilantes de ADN y las unidades de unión a ADN en los compuestos con la fórmula (I), sus análogos que contienen ciclopropilo y sus conjugados y los conjugados conector-agente dados en este documento se presentan sin aceptar un mecanismo específico de acción para los compuestos con la fórmula (I), sus análogos que contienen ciclopropilo y sus conjugados conector-agente y conjugados.

30 [0031] Se puede considerar que los compuestos con la fórmula (I) están formados por una unidad de unión a ADN (**DB1-DB9**) y una unidad alquilante de ADN (**DA1** o **DA1'**), como se indica en las figuras anteriores.

[0032] Se considera que la unidad alquilante de ADN de los compuestos con la fórmula (I) contiene el sitio de alquilación. La alquilación de ADN puede ocurrir a través del ataque de ADN sobre el carbono que lleva el  $R^1$  en un compuesto con la fórmula (I) o sobre ese mismo carbono en el análogo que contiene ciclopropilo de dicho compuesto.

35 [0033] Se considera que la unidad de unión a ADN de los compuestos con la fórmula (I) asiste en la unión eficiente de estos compuestos a ADN. Puede acoplarse a la fracción alquilante del ADN mediante, por ejemplo, un enlace amida. Por lo tanto,  $X^5$  es O.

[0034] En una forma de realización, esta solicitud se refiere a un compuesto con la fórmula (I) incorporado en un compuesto con la fórmula (III).

[0035]  $R^1$  en un compuesto con la fórmula (I) es un grupo saliente.

[0036] Además, el grupo R<sup>1</sup> será eliminado cuando el compuesto con la fórmula (I) se reordene en un compuesto con la fórmula (I').

[0037] Conforme a la presente invención, R<sup>1</sup> es cloro (Cl).

5 [0038] Variando el grupo saliente R<sup>1</sup>, se puede ajustar la actividad alquilante de los agentes *seco* y afectar a la tasa de transformación de un agente *seco* en un agente que contiene ciclopropilo con la fórmula (I'). Si la capacidad saliente de R<sup>1</sup> es demasiado buena, esto puede causar que el agente *seco* se vuelva un agente alquilante inespecífico, lo que puede reducir el cociente de citotoxicidad y el índice terapéutico de los conjugados de compuestos con la fórmula (I), ya que el agente puede, por ejemplo, ser capaz de alquilar mientras todavía está unido en el conjugado. Por otro lado, si R<sup>1</sup> es un grupo saliente demasiado malo, el agente *seco* puede no cerrarse para formar un agente que contiene  
10 ciclopropilo, considerado la especie activa, lo que puede reducir su citotoxicidad y el cociente de citotoxicidad. Por lo tanto, en una forma de realización, el parámetro s de Swain-Scott del sitio alquilante es mayor a 0,3. En otras formas de realización, el parámetro s de Swain-Scott es mayor a 0,5 o 0,7 o 1,0.  
El tamaño de R<sup>1</sup> puede afectar a la tasa de alquilación de no ADN de un compuesto con la fórmula (I) o un conjugado del mismo. Si R<sup>1</sup> es un grupo relativamente voluminoso, la alquilación inespecífica se puede reducir, ya que el carbono  
15 que lleva el R<sup>1</sup> está algo protegido.

[0039] Otro medio para ajustar la actividad alquilante de los agentes *seco* y sus derivados que contienen ciclopropilo puede ser proteger algo el carbono al que está unido el grupo saliente R<sup>1</sup> o sobre el que puede ocurrir el ataque nucleofílico eligiendo que al menos uno de los R<sup>2</sup>, R<sup>2'</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>3'</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>5'</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>6'</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>16</sup> y R<sup>16'</sup> presentes sea  
20 distinto de hidrógeno. La protección de dicho carbono puede reducir la alquilación inespecífica por compuestos con la fórmula (I), sus análogos que contienen ciclopropilo y sus conjugados. Aunque la introducción de un impedimento estérico también puede afectar a la tasa de alquilación de ADN, puede ser razonable asumir que la alquilación inespecífica puede verse afectada relativamente más que la alquilación de ADN, ya que esta última ocurre supuestamente después de que el agente se posicione idealmente para el ataque nucleofílico unido al surco menor del ADN.

25 [0040] La actividad alquilante de un compuesto con la fórmula (I) o su análogo que contiene ciclopropilo también puede verse afectado por la naturaleza de X<sup>1</sup>. La naturaleza de X<sup>1</sup> puede afectar a la tasa a la cual y a las condiciones bajo las que los agentes *seco* se cierran en anillo para los análogos de ciclopropilo y/o a la tasa a la cual el anillo de ciclopropilo se abre por ataque nucleofílico (por ADN), y así afectan al comportamiento de alquilación. Conforme a la presente invención, X<sup>1</sup> es O.

30 [0041] Los sustituyentes R<sup>5</sup>, R<sup>5'</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>6'</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>7'</sup> y X<sup>2</sup>, al igual que el tamaño del anillo conectado al lado izquierdo del anillo que lleva el X<sup>1</sup> puede, por ejemplo, cada uno independientemente o dos o más en conjunto, afectar a las propiedades farmacológicas del agente, por ejemplo, afectar a la solubilidad en agua, afectar al comportamiento de agregación, afectar al proceso de alquilación de ADN y/o afectar a la fuerza de unión a ADN. Además, especialmente R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup>, y en cierto grado R<sup>6</sup> y R<sup>6'</sup> también, puede afectar también el grado de protección del carbono sobre el que  
35 debería ocurrir el ataque nucleofílico.

[0042] Los sustituyentes R<sup>16</sup> y R<sup>16'</sup> pueden afectar al grado de protección del carbono sobre el que el ataque nucleofílico puede ocurrir también.  
R<sup>14</sup> y R<sup>14'</sup> pueden afectar al grado de protección de X<sup>1</sup> o, cuando un compuesto con la fórmula (I) es parte de un conjugado o un conjugado conector-agente donde el compuesto con la fórmula (I) está conectado mediante X<sup>1</sup>, pueden  
40 afectar al grado de protección del enlace entre el compuesto con la fórmula (I) y la fracción moduladora. Para aumentar la estabilidad de este enlace, R<sup>14</sup> se puede seleccionar para que sea distinto de hidrógeno.

[0043] Aunque la tasa de alquilación y la eficiencia de los compuestos con la fórmula (I) pueden opcionalmente ajustarse de varias maneras, en un aspecto de esta invención, esto se puede conseguir mediante la introducción de una protección estérica eligiendo, para un compuesto con la fórmula (I), que uno o más de R<sup>2</sup>, R<sup>2'</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>3'</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>5'</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>6'</sup>, R<sup>12</sup>, R<sup>16</sup> y R<sup>16'</sup> presentes sean distintos de hidrógeno. Sin embargo, los sustituyentes no deberían causar demasiado impedimento estérico, especialmente cuando más de uno de estos sustituyentes es distinto de hidrógeno, ya que esto puede afectar negativamente la alquilación de ADN. Además, puede proporcionar una unión menos eficiente en el surco menor del ADN y puede plantear dificultades sintéticas.

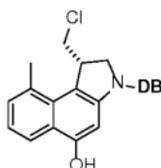
50 [0044] Los compuestos con la fórmula (I) pueden contener una o más fracciones de oligoetilenglicol o polietilenglicol o derivados de las mismas. Tal fracción puede mejorar la solubilidad en agua y el comportamiento de agregación de un

compuesto con la fórmula (I) y puede causar un aumento de la actividad contra las dianas resistentes a múltiples fármacos debido a un aumento de polaridad. Si un compuesto con la fórmula (I) con tal fracción se incorpora en un conjugado, puede ser que la fracción de oligoetilenglicol o polietilenglicol se localice entre la fracción moduladora y el resto del compuesto con la fórmula (I) o que se localice en una posición en cierto modo opuesta al sitio de unión de la fracción moduladora, colocando así el resto del compuesto con la fórmula (I) entre la fracción moduladora y la fracción de oligoetilenglicol o polietilenglicol. Esto último puede ser más beneficioso para la solubilidad en agua de los conjugados. Una mejor solubilidad en agua de los compuestos con la fórmula (I) y sus conjugados puede llevar a mejores rendimientos y pureza de los conjugados durante la síntesis, por ejemplo, debido a una formación de agregados reducida. Además, una tendencia a la agregación reducida y una mayor pureza del conjugado puede, por ejemplo, llevar a menos efectos secundarios después de la administración del conjugado. Además, la presencia de una o más fracciones de oligoetilenglicol y/o polietilenglicol en un conjugado puede reducir la excreción del conjugado a través de los riñones o el hígado, lo que aumenta el tiempo de circulación en el cuerpo.

En otro aspecto de esta solicitud, los compuestos con la fórmula (I) pueden contener uno o más anillos triazol. La incorporación de un anillo 1,2,3-triazol puede proporcionar una ventaja sintética, ya que las dos fracciones que finalmente se pueden unir al anillo 1,2,3-triazol se pueden unir entre sí a través de dicho anillo triazol usando una reacción de cicloadición suave y eficiente entre una fracción alquino y una azida. Debido a que las condiciones para esta reacción de cicloadición son muy suaves y son compatibles con casi todos los grupos funcionales, la reacción se puede realizar en uno de los últimos pasos de la vía sintética hacia un compuesto con la fórmula (I), su conjugado conector-agente, o conjugado, permitiendo así una generación fácil de series de compuestos con la fórmula (I) y sus conjugados para estudios de SAR (relación estructura-actividad).

Preferiblemente, la fracción triazol se localiza de tal manera en la unidad alquilante de ADN o la unidad de unión a ADN que puede contribuir a la unión del compuesto a ADN. Fracciones de unión a ADN adicionales, tales como fracciones de indol o benzofurano, que están conectadas a la unidad de unión a ADN o alquilante de ADN puede aumentar la potencia del compuesto, presuntamente a través de una unión a ADN mejorada. Sin embargo, estas fracciones aromáticas adicionales pueden tener un efecto perjudicial sobre las propiedades farmacológicas, tal como la solubilidad en agua. Un triazol, que es un grupo aromático, también puede mejorar la unión a ADN y, así, aumentar la potencia citotóxica del compuesto, pero como es más polar que otras fracciones aromáticas, tal como un anillo de fenilo, los efectos negativos sobre las propiedades farmacológicas pueden ser menos pronunciados.

[0045] Conforme a la invención, un compuesto con la fórmula (I) es



o un isómero de uno de estos o una mezcla de isómeros.

[0046] Una solubilidad en agua aumentada de un compuesto con la fórmula (I) puede conseguirse no solo a través de la introducción de grupos hidrosolubles o polares, tales como un grupo triazol o una fracción oligoetilenglicol o polietilenglicol o una combinación de los mismos, sino que también se puede conseguir a través de la sustitución de átomos de anillo de carbono por heteroátomos, por ejemplo, en la unidad de unión a ADN. Una solubilidad en agua mejorada de compuestos con la fórmula (I) y sus conjugados puede llevar a mejores rendimientos y pureza de los conjugados durante la síntesis, por ejemplo, debido a una formación de agregados reducida. Además, una tendencia reducida a la agregación y una mayor pureza del conjugado puede, por ejemplo, llevar a menos efectos secundarios después de la administración del conjugado.

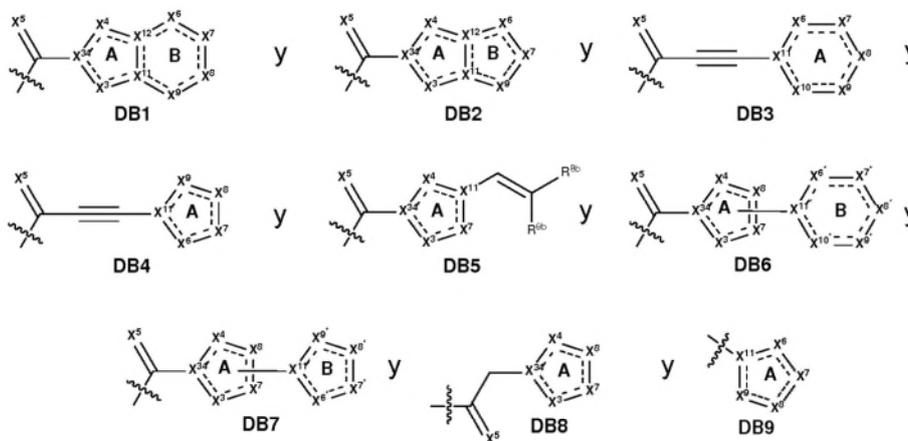
Una degradación metabólica aumentada, por ejemplo, en el hígado, puede, por ejemplo, conseguirse a través de la introducción de grupos en las unidades de unión a ADN que se pueden oxidar con relativa facilidad, por ejemplo, fracciones acetileno y alqueno. La oxidación de compuestos tóxicos es uno de los mecanismos por los que un mamífero puede desintoxicar tales compuestos. Si se absorben compuestos de esta invención en el hígado, una desintoxicación eficiente puede, por ejemplo, eludir la toxicidad hepática como efecto secundario.

La estabilidad del enlace entre la unidad de unión a ADN y la unidad alquilante de ADN, por ejemplo, en la circulación, se puede ajustar mediante modificaciones en la unidad de unión a ADN. Puede ser favorable tener la unidad alquilante de ADN y la unidad de unión a ADN enlazada mediante un enlace esencialmente no escindible. Especialmente cuando el compuesto con la fórmula (I) se administra como la sustancia activa, puede desearse estabilidad en la circulación. Sin embargo, cuando un compuesto con la fórmula (I) se administra como parte de un conjugado, puede ser favorable tener un enlace entre la unidad alquilante de ADN y la unidad de unión a ADN que se vuelva menos estable en la

5 circulación tan pronto como el compuesto con la fórmula (I) se libere prematuramente del conjugado. Esto puede reducir los efectos secundarios tóxicos a consecuencia de la liberación prematura del agente. Las unidades de unión a ADN de esta invención pueden causar que un compuesto con la fórmula (I) o su conjugado o conjugado conector-agente tenga un enlace más estable entre la unidad de unión a ADN y la alquilante de ADN en la circulación que un compuesto con la fórmula (I'), que puede formarse a partir de un compuesto con la fórmula (I) tan pronto como se desprotege X<sup>1</sup>.

[0047] La extensión del sistema conjugado π en la fracción de unión a ADN puede aumentar la afinidad de unión del ligante de ADN por el ADN. El sistema π se puede extender mediante la introducción de anillos aromáticos adicionales y/o enlaces dobles y/o triples conjugados.

[0048] La unidad de unión a ADN **DB** en un compuesto con la fórmula (I) se selecciona de las estructuras **DB1-DB9**:



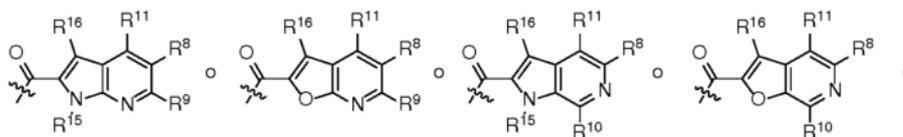
10 [0049] En un aspecto de esta divulgación, un compuesto con la fórmula (I) tiene una unidad de unión a ADN con la fórmula **DB1**.

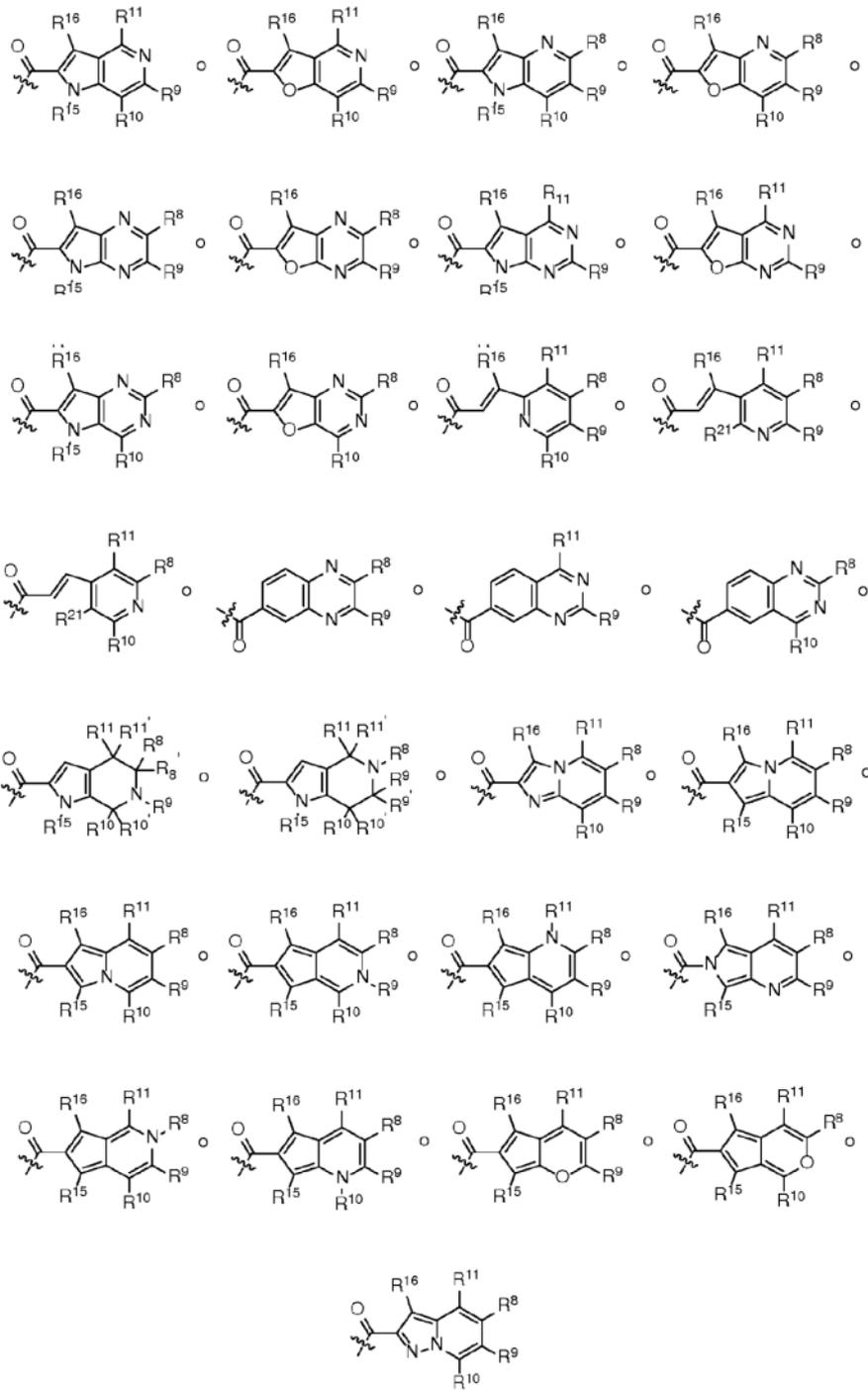
15 [0050] Esta fracción comprende estructuras que contienen al menos un anillo **B** de 6 miembros que está conectado con la unidad alquilante de ADN a través de un anillo **A** de 5- o 6 miembros fusionados o un grupo vinilo. El heteroátomo en dicho anillo **B** puede proporcionar una mejor solubilidad en agua con respecto a análogos de ligantes de ADN que tienen un anillo todo de carbono.

[0051] Preferiblemente, el anillo **B** es aromático. Puede, por ejemplo, ser una fracción piridina, pirimidina, piridazina, pirazina, 1,3,5-triazina, 1,2,3,5-tetrazina, 1,2,3,4-tetrazina, pentazina, fosfinina, 1,3-difosfinina o 1,3-azafosfinina. Alternativamente, este anillo puede ser no aromático y ser o insaturado o completamente saturado.

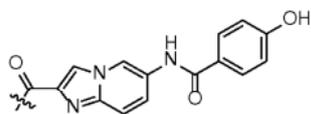
20 [0052] Un compuesto con la fórmula (I) donde el anillo **B** esté conectado con la unidad alquilante de ADN a través de un grupo vinilo puede contener un grupo conector que permita la desintoxicación por medio de, por ejemplo, la oxidación o la hidratación del enlace doble.

[0053] La fracción **DB1** puede, por ejemplo, ser





Conforme a la invención, la fracción **DB1** es

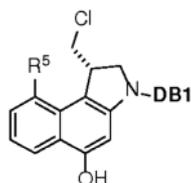


[0054] Los sustituyentes  $R^1$  a  $R^{23}$  pueden ayudar a mejorar las propiedades farmacológicas de un compuesto con la fórmula (I) o su conjugado, por ejemplo, su solubilidad en agua. Esto puede, por ejemplo, conseguirse mediante la selección de uno o más de los sustituyentes  $R^1$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $R^{15}$ ,  $R^{16}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  y  $R^{23}$  para comprender o ser una fracción oligoetilenglicol o polietilenglicol o una fracción triazol. Alternativa o simultáneamente, uno o más de los sustituyentes pueden comprender o ser un grupo hidrosoluble. La presencia de un grupo hidrosoluble puede no solo dar como resultado una solubilidad en agua mejorada, sino que también puede evitar que un compuesto con la fórmula (I) cruce una barrera biológica, especialmente cuando es una barrera apolar, tal como una membrana celular. Esto puede ser ventajoso, especialmente cuando un compuesto con la fórmula (I) se administra a una célula diana a través de la conjugación con una fracción de dirección antes de ser liberada del conjugado, ya que el compuesto con la fórmula (I) será incapaz de salir de la célula. Incluso el transporte activo a través de, por ejemplo, la bomba de P-glicoproteína puede verse (parcialmente) perjudicado. Cuando un compuesto con la fórmula (I) se libera prematuramente del conjugado, por ejemplo, en la circulación, puede ser incapaz o solo moderadamente capaz de introducirse en células (no diana) inespecíficamente, ya que sus capacidades de translocación de membrana pueden verse perjudicadas por el grupo hidrosoluble. Esto puede llevar a una selectividad aumentada y, por lo tanto, a menos efectos secundarios. Además, al menos en algunos casos, por ejemplo, cuando el grupo hidrosoluble está cargado positivamente en condiciones fisiológicas, el grupo hidrosoluble también puede mejorar la afinidad de unión por el ADN por medio de interacciones electroestáticas favorables con los grupos fosfato cargados negativamente.

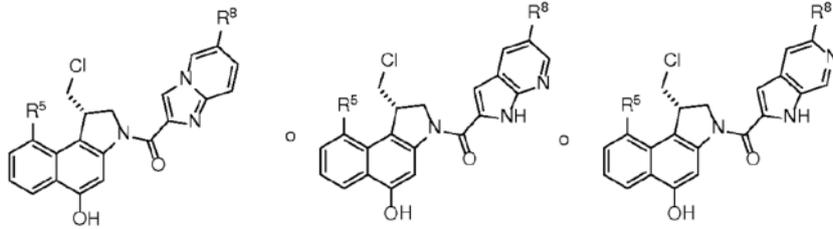
Un grupo hidrosoluble es un grupo que imparte una solubilidad aumentada a un compuesto con la fórmula (I) y/o un conjugado del mismo. En una forma de realización, la solubilidad en agua de un compuesto de esta invención que lleva un grupo hidrosoluble está aumentada más de un 100 % en comparación con el compuesto carente de dicho grupo hidrosoluble. En otras formas de realización, la solubilidad en agua de un compuesto de esta invención que lleva un grupo hidrosoluble está aumentada más de un 75 % o un 50 % o un 25 % o un 10% en comparación con el compuesto carente de dicho grupo hidrosoluble. El grupo hidrosoluble también puede contribuir a evitar o reducir la agregación de los compuestos de esta invención o a reducir los efectos secundarios. Los ejemplos de grupos hidrosolubles incluyen, pero de forma no limitativa,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}$ ,  $-\text{NHR}^s$ ,  $-\text{NR}^s$ ,  $-\text{N}(\text{R}^s)(\text{R}^t)$ ,  $-\text{N}(\text{R}^s)(\text{R}^t)$ ,  $-\text{N}(\text{R}^s)(\text{R}^t)(\text{R}^u)$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})\text{O}$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^s)\text{O}$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})\text{OR}^s$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^s)\text{OR}^t$ ,  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ,  $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{O}$ ,  $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^s)\text{OH}$ ,  $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^s)\text{O}$ ,  $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^s)(\text{OR}^t)$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{OH}$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{O}$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{OR}^s$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{O}$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{OR}^s$ ,  $-\text{OS}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{OS}(\text{O})\text{O}$ ,  $-\text{OS}(\text{O})\text{OR}^s$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{O}$ ,  $-\text{OS}(\text{O})$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{OR}^s$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^s$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^s$ ,  $-\text{OS}(\text{O})\text{R}^s$ ,  $-\text{S}(\text{O})$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}^s$ ,  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_v\text{OH}$ ,  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_v\text{O}$ ,  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_v\text{OR}^s$ , una fracción de azúcar, una fracción de mono-, di- u oligosacárido y una fracción oligopeptídica, o una forma protonada o desprotonada de los mismos y además cualquier combinación de los mismos, donde  $\text{R}^s$ ,  $\text{R}^t$  y  $\text{R}^u$  se seleccionan independientemente de H y alquilo  $\text{C}_{1-3}$  opcionalmente sustituido, dos o más de  $\text{R}^s$ ,  $\text{R}^t$  y  $\text{R}^u$  están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos, y  $v$  es un número entero seleccionado de 2 a 1000. El grupo hidrosoluble puede estar en cualquier posición dentro de un sustituyente o puede constituir el sustituyente entero. El grupo hidrosoluble puede, por ejemplo, estar localizado en cualquier posición interior, ser parte de la cadena principal, ser parte de una estructura anular, ser un grupo funcional colgante de la cadena principal o un anillo, o estar colocado en la posición en la cual el sustituyente está unido al resto del agente.

[0055] Un compuesto con la fórmula (I) puede no tener una fracción reactiva incorporada en su estructura. Por otro lado, como queda claro de lo anterior, puede estar presente en su estructura una fracción reactiva que permite la reacción de un compuesto con la fórmula (I) con otra fracción. Por ejemplo, un compuesto con la fórmula (I) puede hacerse reaccionar con una fracción de dirección o una construcción de conector-fracción de dirección, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, o una construcción de anticuerpo-conector o una construcción de fragmento de anticuerpo-conector, para preparar un conjugado fracción de dirección-agente en uno o más pasos, que puede o puede no ser un conjugado con la fórmula (III). Tal conjugado fracción de dirección-agente puede o ser escindible o no escindible. La formación de un conjugado fracción de dirección-agente puede realizarse no solo a través de síntesis química, sino que también puede ocurrir *in situ*, es decir, tras la administración de un compuesto con la fórmula (I) *in vivo*. El compuesto con la fórmula (I) puede, por ejemplo, unirse a proteínas endógenas, por ejemplo, albúmina, tras la administración.

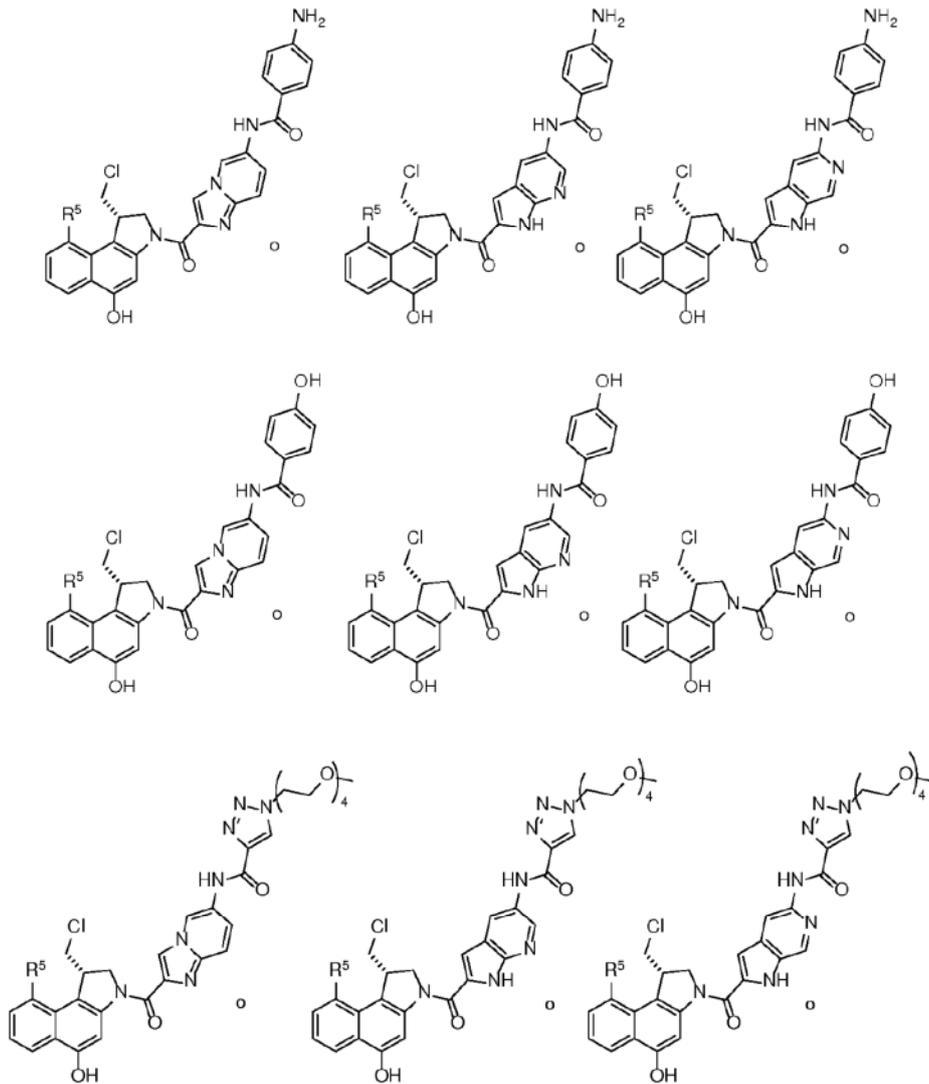
[0056] En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (I) es

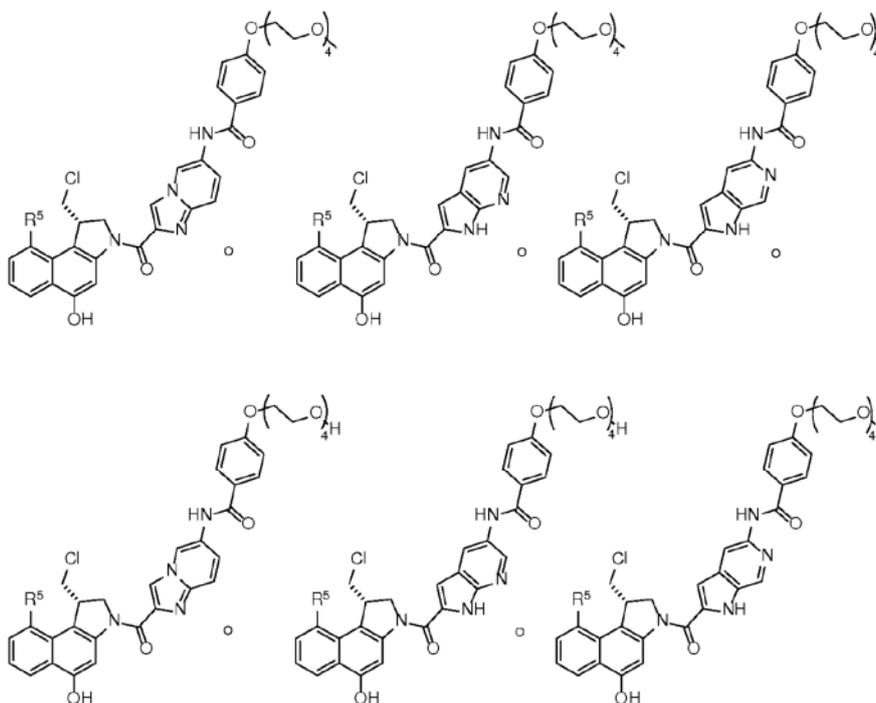


o un isómero del mismo o una mezcla de isómeros.  
 En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (I) es

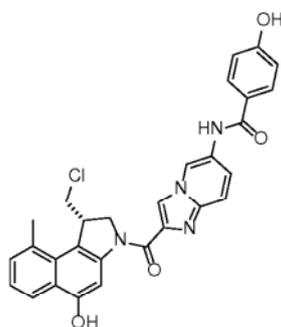


o un isómero de uno de estos o una mezcla de isómeros.  
 5 En una forma de realización adicional, un compuesto con la fórmula (I) es





o un isómero de uno de estos o una mezcla de isómeros.  
 Conforme a la invención, el compuesto con la fórmula (I) es



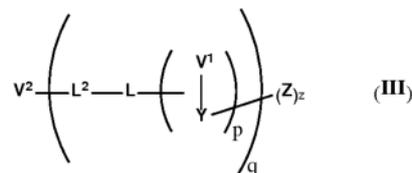
5 o un isómero de uno de estos o una mezcla de isómeros.

**Conjugados, conjugados conector-agente y conectores bifuncionales**

[0057] Esta invención se refiere a un conjugado según se especifica en las reivindicaciones de un compuesto con la fórmula (I) que se puede convertir *in vivo* en uno o más pasos en un compuesto con la fórmula (I). El conjugado también se puede convertir en un derivado de un compuesto con la fórmula (I) donde una parte de la fracción moduladora unida a un compuesto con la fórmula (I) en el conjugado permanece unida al compuesto con la fórmula (I) después de la conversión *in vivo*. Una manera alternativa de ver esto es que la fracción restante del conector es parte del compuesto con la fórmula (I).

[0058] Estos conjugados pueden afectar favorablemente a las propiedades farmacológicas y otras características de un compuesto con la fórmula (I). En una forma de realización, esta invención se refiere a un conjugado que comprende un compuesto con la fórmula (I) conjugado a una fracción moduladora.

[0059] En otra forma de realización, esta divulgación se refiere a un compuesto con la fórmula (III):



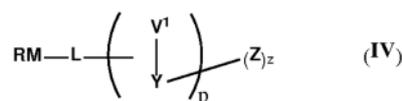
o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde

- 5  $V^2$  es una fracción funcional;  
 cada  $L^2$  es un grupo de enlace que enlaza  $V^2$  a  $L$ ;  
 cada  $L$  es un grupo de enlace que enlaza  $L^2$  a uno o más  $V^1$  y/o  $Y$ ;  
 cada  $V^1$  es una fracción escindible condicionalmente o transformable condicionalmente, que se puede escindir o transformar mediante un proceso químico, fotoquímico, físico, biológico o enzimático;  
 10 cada  $Y$  es un sistema separador de autoeliminación que está comprendido por 1 o más separadores de autoeliminación y está enlazado a  $V^1$ , opcionalmente  $L$ , y uno o más  $Z$ , donde  $Y$  está conectado con  $X^1$  mediante un separador de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil que es parte de  $Y$ ;  
 cada  $p$  y cada  $q$  son números que representan un grado de ramificación y son cada uno independientemente un número entero positivo;  
 $z$  es un número entero positivo igual a o menor que el número total de sitios de unión para  $Z$ ;  
 15 cada  $Z$  es independientemente un compuesto con la fórmula (I) tal y como se ha definido anteriormente;  
 cada  $Z$  está conectada a  $Y$  a través de  $X^1$ .

[0060] Debe entenderse, a partir de la fórmula (III), que  $L$  puede estar conectada a  $V^1$  y/o a  $Y$ . Si  $L$  está conectada a  $Y$ , esto significa que tanto  $V^1$  como  $L$ , al igual que una o más  $Z$ , están conectadas a  $Y$ . Si  $L$  está conectada a  $V^1$ , esto significa que  $V^1$  y una o más  $Z$  están conectadas a  $Y$ .  $L$  también puede estar conectada tanto a  $V^1$  como a  $Y$  al mismo tiempo.  
 20

[0061] Las fracciones  $V^2(-L^2-L(-V^1-Y))_p)_q(Z)_{z-1}$ , donde  $L(-V^1-Y)_p$  indica que  $L$  puede estar conectada a  $V^1$  y/o a  $Y$ , conectadas a  $Z$  se denominan aquí fracciones moduladoras.

[0062] La presente descripción también se refiere a un compuesto con la fórmula (IV):



- 25 o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde  
 $RM$  es una fracción reactiva y  $L$ ,  $V^1$ ,  $Y$ ,  $Z$ ,  $p$  y  $z$  son tal y como se ha definido anteriormente, excepto porque  $L$  está ahora conectando  $RM$  a una o más  $V^1$  y/o  $Y$ , y  $V^1$ ,  $Y$  y  $Z$  pueden contener grupos protectores, y donde, si hay más de 1 fracción reactiva en (IV), alguna o todas las fracciones reactivas son las mismas o diferentes. Estos conjugados conector-agente con la fórmula (IV) pueden o pueden no considerarse productos intermedios para los compuestos con la fórmula (III). En un compuesto con la fórmula (IV),  $RM$  debe estar presente, mientras que  $V^1$  puede estar o presente o ausente.  
 30

[0063] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un compuesto con la fórmula (IV), donde  $RM$  es una fracción reactiva seleccionada de haluro de carbamoilo [-N(R)C(O)X], haluro de acilo [-C(O)X], éster activo [-C(O)OR], anhídrido [-C(O)OC(O)OR],  $\alpha$ -haloacetilo [-C(O)CH<sub>2</sub>X],  $\alpha$ -haloacetamida [-N(R)C(O)CH<sub>2</sub>X], maleimida, isocianato [-N=C=O], isotiocianato [-N=C=S], disulfuro [-S-SR], tiol [SH], hidrazina [-NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>], hidrazida [-C(O)NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>], cloruro de sulfonilo [-S(O)<sub>2</sub>Cl], aldehído [C(O)H], metilcetona [-C(O)CH<sub>3</sub>], vinilsulfona [-S(O)<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>], halometilo [-CH<sub>2</sub>Cl] y metilsulfonato [-CH<sub>2</sub>OS(O)<sub>2</sub>R]. Estos conjugados conector-agente con la fórmula (IV) pueden o pueden no considerarse productos intermedios para los compuestos con la fórmula (III). En tal compuesto con la fórmula (IV),  $RM$  debe estar presente.  
 35



- [0073] Cuando un compuesto con las fórmulas (III) o (IV) contiene sitios de unión en **Y** para **Z** que no están acoplados a **Z**, por ejemplo, a consecuencia de una reacción de acoplamiento incompleta con **Z** durante la síntesis, estos sitios de unión se consideran unidos a H, OH, una fracción reactiva (por ejemplo, **RM2**) o un grupo saliente (por ejemplo, **RM2**) en su lugar. Si todos los dichos sitios de unión están conectados a **Z**, entonces  $z$  es igual al número de dichos sitios de unión; de lo contrario,  $z$  es inferior. Los compuestos de esta divulgación pueden existir como una mezcla, donde cada componente de la mezcla tiene un valor  $z$  diferente. Por ejemplo, el compuesto puede existir como una mezcla de dos compuestos separados, un compuesto donde  $z$  es 4 y otro compuesto donde  $z$  es 3. Además, para una  $z$  dada, el compuesto puede existir como una mezcla de isómeros (constitutivos), ya que **Z** puede estar conectada a distintos (conjuntos de) sitios de unión.
- [0074] Por razones de claridad, cuando se hace referencia a las conexiones de una primera fracción con otras fracciones en la fórmula (III), (IV) u (VIII), en general solo se mencionan aquellas dichas otras fracciones que se unen directamente a dicha primera fracción en la fórmula (III), (IV) u (VIII). Debe entenderse que, si una de dichas otras fracciones no está presente, dicha primera fracción está en realidad conectada a la fracción que esté presente primera en línea, a menos que se declare explícitamente lo contrario. Por ejemplo, si se declara que "**V**<sup>1</sup> se escinde de **Y**", esta expresión significa en realidad que "**V**<sup>1</sup> se escinde de **Y**, o de **Z** si **Y** está ausente" y debe leerse como "**V**<sup>1</sup> se escinde de **Z**" cuando se hace referencia a un compuesto carente de **Y**.

#### La fracción <sup>1</sup>

- [0075] En un compuesto con la fórmula (III), (IV) u (VIII), la fracción **V**<sup>1</sup> es un grupo que es condicionalmente escindible o transformable. En otras palabras, está diseñada para ser transformada y/o escindida de **Y** por un proceso químico, fotoquímico, físico, biológico o enzimático después de ser llevado a o bajo una cierta condición. Esta condición puede ser, por ejemplo, poner un compuesto de la divulgación en un medio acuoso, lo que lleva a la hidrólisis de **V**<sup>1</sup>, o poner un compuesto de la divulgación en un entorno que contiene una enzima que reconoce y escinde **V**<sup>1</sup> o poner un compuesto de la divulgación bajo condiciones reductoras, lo que lleva a la reducción y/o la eliminación de **V**<sup>1</sup>, o poner un compuesto de la divulgación bajo condiciones oxidantes, lo que lleva a la oxidación y/o la eliminación de **V**<sup>1</sup>, o poner un compuesto de la divulgación en contacto con radiación, por ejemplo, luz UV, lo que lleva a la transformación y/o la escisión, o poner un compuesto de la divulgación en contacto con calor, lo que lleva a la transformación y/o la escisión, o llevar un compuesto de la divulgación bajo presión reducida, lo que lleva a la transformación, por ejemplo, una retrocicloación, y/o la escisión, o poner un compuesto de la divulgación bajo presión elevada o alta, lo que lleva a la transformación y/o la escisión. Esta condición puede cumplirse después de administrar un compuesto de esta divulgación a un animal, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano: la condición puede cumplirse cuando el compuesto se localiza en, por ejemplo, un órgano, un tejido, una célula, una diana subcelular o una diana bacteriana, vírica o microbiana específicos, por ejemplo, por la presencia de factores internos (por ejemplo, enzimas específicas para una diana o hipoxia) o la aplicación de factores externos (por ejemplo, radiación, campos magnéticos) o la condición puede cumplirse ya directamente tras la administración (por ejemplo, enzimas ubicuas en la circulación).
- [0076] La escisión de **V**<sup>1</sup> significa que se rompe el enlace entre **V**<sup>1</sup> e **Y**. La transformación de **V**<sup>1</sup> significa que **V**<sup>1</sup> se convierte en una fracción diferente y este evento puede llevar directa o indirectamente a la autoescisión de **V**<sup>1</sup> de **Y**. Alternativamente, la transformación de **V**<sup>1</sup> puede llevar a la formación de una fracción **V**<sup>1</sup>-**Y** que es un conector autoinmolativo. En este caso, **Y** solo se vuelve autoinmolativa después de la transformación de **V**<sup>1</sup>. La fracción **V**<sup>1</sup> transformada en realidad se vuelve (parcialmente) parte de **Y**. Por ejemplo, la oxidación de una **V**<sup>1</sup> que es un átomo de hidrógeno a un grupo hidroxilo puede llevar a la formación de una fracción **V**<sup>1</sup>-**Y** *para-* u *orto*-hidroxibenciloxicarbonilo que se autoelimina. Como otro ejemplo, la reducción de una **V**<sup>1</sup> que es un grupo nitro puede llevar a formación de una fracción **V**<sup>1</sup>-**Y** *para-* u *orto*-aminobenciloxicarbonilo que se autoelimina.

- [0077] Un compuesto de esta divulgación puede contener más de una fracción **V**<sup>1</sup> por fracción moduladora ( $p$  y/o  $q > 1$ ). Estas fracciones **V**<sup>1</sup> pueden o no ser las mismas y pueden o no requerir las mismas condiciones para la transformación y/o la escisión.

- [0078] La tasa a la cual **V**<sup>1</sup> se transforma y/o se escinde puede ser dependiente de las otras fracciones en un compuesto con la fórmula (III). Por ejemplo, el uso de una fracción **L** y/o **Y** más corta puede acercar la fracción funcional y/o **Z** del sitio de escisión, lo que puede llevar a una tasa reducida de transformación y/o escisión. Los sustituyentes (voluminosos) en la fracción **L** y/o **Y** pueden llevar a una tasa reducida de transformación y/o escisión de **V**<sup>1</sup> también, especialmente cuando están situados cerca del sitio de transformación/escisión. Otros efectos, tales como los efectos de los enlaces de hidrógeno, del grupo adyacente y de electrones, también pueden jugar un papel.

[0079] En un aspecto de esta invención, un conjugado se utiliza para dirigir una o más fracciones **Z** a las células diana. En este caso, una fracción **V<sup>1</sup>** puede, por ejemplo, contener una molécula de sustrato que es escindida por una enzima presente en la proximidad de las células diana o dentro de las células diana, por ejemplo, células tumorales. **V<sup>1</sup>** puede, por ejemplo, contener un sustrato que es escindido por una enzima presente en niveles elevados en la proximidad o dentro de las células diana en comparación con otras partes del cuerpo o por una enzima que esté presente solo en la proximidad o dentro de las células diana.

[0080] Resulta importante reconocer que, si la especificidad por el sitio diana se consigue solamente en función de la transformación y/o la escisión selectivas de dicha **V<sup>1</sup>** en el sitio diana, la condición que causa la escisión debería preferiblemente, al menos hasta cierto grado, ser específica para el sitio diana, mientras que la presencia de otra fracción específica para una diana en el compuesto de la invención, por ejemplo, en una fracción **V<sup>2</sup>**, debilita o elimina este requisito. Por ejemplo, cuando **V<sup>2</sup>** causa una internalización selectiva en una célula diana, una enzima también presente en otras células puede transformar y/o escindir a **V<sup>1</sup>**. Sin embargo, preferiblemente, la escisión no debería ocurrir en un sitio distante del sitio diana. Por lo tanto, el conjugado no debería estar expuesto a enzimas o condiciones que puedan causar la escisión de **V<sup>1</sup>** en sitios distintos del sitio diana. En una forma de realización, la transformación y/o la escisión de **V<sup>1</sup>** ocurren intracelularmente. En otra forma de realización, la transformación y/o la escisión de **V<sup>1</sup>** ocurren extracelularmente. En otra forma de realización, la transformación y/o la escisión de **V<sup>1</sup>** ocurren por una enzima intracelular ubicua. En otra forma de realización, la transformación y/o la escisión de **V<sup>1</sup>** ocurren por una enzima extracelular ubicua.

En una forma de realización, **V<sup>1</sup>** contiene un único aminoácido, un di-, tri-, tetra- u oligopéptido o un peptidomimético, que consiste en un aminoácido o una secuencia de aminoácidos o un mimético de los mismos reconocido y escindible por una enzima proteolítica, por ejemplo, plasmina, una catepsina, catepsina B, antígeno prostático específico (PSA), activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA) o un miembro de la familia de las metaloproteinasas de la matriz, presentes en la proximidad o dentro de las células diana, por ejemplo, células tumorales.

[0081] Cuando **V<sup>1</sup>** se escinde extracelularmente, la una o más fracciones **Z** se pueden liberar extracelularmente. Esto puede proporcionar la ventaja de que estas fracciones **Z** no solo son capaces de afectar a la(s) célula(s) directamente circundantes al sitio de activación (por ejemplo, células positivas para la diana), sino también a células algo más lejanas al sitio de activación (por ejemplo, células negativas para la diana) debido a la difusión (efecto del espectador), siempre que las fracciones **Z** sean capaces de penetrar la membrana celular.

Una enzima para escindir **V<sup>1</sup>** puede también ser transportada a la proximidad o dentro de las células diana o el tejido diana a través, por ejemplo, de terapia con profármaco y enzima dirigida por anticuerpos (ADEPT), terapia con profármaco y enzima dirigida por polímeros (PDEPT), terapia con profármaco y enzima dirigida por macromoléculas (MDEPT), terapia con profármaco y enzima dirigida por virus (VDEPT) o terapia con profármaco y enzima dirigida por genes (GDEPT). En estos enfoques, la enzima que necesita escindir a **V<sup>1</sup>** se transporta o se induce a ser producida en el sitio diana antes de la administración del profármaco, por ejemplo, un compuesto con las fórmulas (III) o (IV). En una forma de realización, la transformación y/o la escisión de **V<sup>1</sup>** ocurren a través de una enzima enlazada a un anticuerpo usando el enfoque de ADEPT.

En otra forma de realización, **V<sup>1</sup>** se selecciona de D-alanilfenilalanil-lisina, D-valil-leucil-lisina, D-alanil-leucil-lisina, D-valilfenilalanil-lisina, D-valiltriptofanil-lisina, D-alaniltriptofanil-lisina, alanilfenilalanil-lisina, valil-leucil-lisina, alanil-leucil-lisina, valilfenilalanil-lisina, valiltriptofanil-lisina, alaniltriptofanil-lisina, D-alanilfenilalanilcitrulina, D-valil-leucilcitrulina, D-alanil-leucilcitrulina, D-valilfenilalanilcitrulina, D-valiltriptofanilcitrulina, D-alaniltriptofanilcitrulina, alanilfenilalanilcitrulina, valil-leucilcitrulina, alanil-leucilcitrulina, valilfenilalanilcitrulina, valiltriptofanilcitrulina y alaniltriptofanilcitrulina.

En otra forma de realización más, **V<sup>1</sup>** se selecciona de fenilalanil-lisina, valil-lisina, valilalanina, D-fenilalanilfenilalanil-lisina, fenilalanilfenilalanil-lisina, glicilfenilalanil-lisina, alanil-lisina, valilcitrulina, N-metilvalilcitrulina, fenilalanilcitrulina, isoleucilcitrulina, triptofanil-lisina, triptofanilcitrulina, fenilalanilarginina, fenilalanilalanina, glicilfenilalanil-leucilglicina, alanil-leucilalanil-leucina, alanilarginilarginina, fenilalanil-N<sup>9</sup>-tosilarginina, fenilalanil-N<sup>9</sup>-nitroarginina, leucil-lisina, leucilcitrulina y fenilalanil-O-benzoiltreonina.

En otra forma de realización, **V<sup>1</sup>** se selecciona de fenilalanil-lisina, valil-lisina y valilcitrulina.

En otras formas de realización adicionales, **V<sup>1</sup>** es fenilalanil-lisina o valil-lisina o valilcitrulina.

Por lo tanto, en una forma de realización, esta invención se refiere a un compuesto donde **V<sup>1</sup>** contiene un sustrato que puede ser escindido por una enzima proteolítica, plasmina, una catepsina, catepsina B,  $\beta$ -glucuronidasa, una galactosidasa, antígeno prostático específico (PSA), activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA), un miembro de la familia de las metaloproteinasas de la matriz o una enzima localizada mediante una terapia con profármaco y enzima dirigida, tales como ADEPT, VDEPT, MDEPT, GDEPT o PDEPT, o donde **V<sup>1</sup>** contiene una fracción que se puede escindir o transformar a través de la reducción bajo condiciones hipóxicas, a través de la reducción por una nitrorreductasa o a través de la oxidación.

[0082] Si un conjugado de esta invención contiene más de 1 fracción moduladora, se puede usar una de estas fracciones moduladoras para dirigir el conjugado a un sitio diana (fracción moduladora de dirección), mientras que se utiliza otra

fracción moduladora para mejorar las propiedades farmacológicas. En este caso, la fracción **V<sup>1</sup>** en la fracción moduladora de dirección se escinde preferiblemente en el sitio diana, por ejemplo, a través de un proceso específico para el sitio diana tal como una escisión enzimática por una enzima presente predominantemente en el sitio diana o a través de un proceso intracelular más genérico que puede ocurrir solo después de la internalización del conjugado selectiva para las células diana, mientras que la fracción moduladora que ayuda a mejorar las propiedades farmacológicas se puede escindir o en el sitio diana o sistémicamente, por ejemplo, por enzimas ubicuas.

5 [0083] Los compuestos con las fórmulas (III) y (IV) se pueden diseñar para liberar finalmente un compuesto con la fórmula (I), o un compuesto con la fórmula (I'), después de la transformación y/o la escisión de la una o más fracciones **V<sup>1</sup>**. Sin embargo, la liberación de un compuesto con la fórmula (I), un compuesto con la fórmula (I') o un derivado de los mismos (por ejemplo, debido a la degradación solo parcial de la fracción moduladora) de un conjugado de esta invención a través de otro mecanismo no se excluye de esta invención.

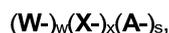
*El sistema separador de autoeliminación Y*

10 [0084] El sistema separador de autoeliminación **Y** enlaza **V<sup>1</sup>** y **L** a una o más fracciones **Z**, o **RM2** en caso de un compuesto con la fórmula (VIII).  
 15 Un sistema separador de autoeliminación **Y** se puede incorporar en un conjugado de esta invención, por ejemplo, para mejorar las propiedades de **Z** o el conjugado en general, para proporcionar químicas de acoplamiento adecuadas y/o para crear espacio entre **V<sup>1</sup>** y **Z**.

[0085] Un compuesto de esta invención puede contener más de un sistema separador **Y** por fracción moduladora. Estas fracciones **Y** pueden o pueden no ser las mismas.  
 20 Después de la escisión o la transformación de **V<sup>1</sup>**, puede desbloquearse el lado izquierdo de **Y** o puede formarse una fracción **V<sup>1</sup>-Y** de autoeliminación, lo que resulta en la liberación eventual de una o más fracciones **Z**. Los sistemas separadores de autoeliminación pueden, por ejemplo, ser aquellos descritos en la WO 02/083180 y la WO 2004/043493, aquellos descritos en esta sección, al igual que otros separadores de autoeliminación conocidos por una persona experta en la materia.

25 La fracción **Y** puede, además de proporcionar químicas de acoplamiento adecuadas y la creación de espacio entre el sitio de escisión y **Z**, ayudar a mejorar las propiedades farmacológicas del conjugado. Por ejemplo, la presencia de una fracción o sustituyente hidrosoluble, tal como una fracción polietilenglicol o un sustituyente que esté cargado, al menos parcialmente, a pH fisiológico puede contribuir a la solubilidad en agua y/o aumentar la estabilidad de almacenamiento y/o la estabilidad plasmática del conjugado.

30 En un aspecto, la invención se refiere a compuestos donde **Y** es

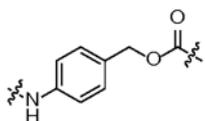


donde

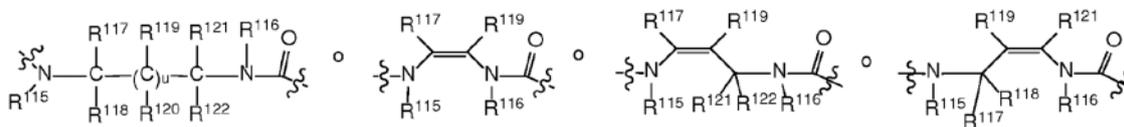
35 **W** y **X** son cada una un separador de liberación única de cascada de electrones 1,2+2n ( $n \geq 1$ ), donde son las mismas o diferentes;  
**A** es un separador de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil que forma un derivado de urea cíclico tras la ciclación; s es 1;  
 w y x son números que representan el grado de polimerización y son independientemente un número entero de 0 (incluido) a 5 (incluido).

40 En una forma de realización, w+x es 0, 1 o 2. En otra forma de realización, s es 1. En otra forma de realización, w+x es 1 o 2 y s es 1. En otra forma de realización, w+x es 1 y s es 1. En otra forma de realización más, w es 1, x es 0 y s es 1.

[0086] En otra forma de realización, el separador de cascada de electrones 1,2+2n **W** o **X** es



Según una forma de realización adicional de esta invención, el separador de eliminación de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil **A** es una fracción con la fórmula:



donde

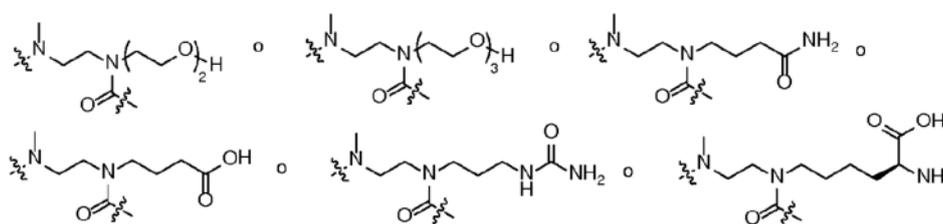
- 5 u es un número entero de 0 o 1;  
 $R^{115}$ ,  $R^{116}$ ,  $R^{117}$ ,  $R^{118}$ ,  $R^{119}$ ,  $R^{120}$ ,  $R^{121}$  y  $R^{122}$  se seleccionan independientemente de H, OH, SH,  $NH_2$ ,  $N_3$ ,  $NO_2$ , NO,  $CF_3$ , CN,  $C(O)NH_2$ ,  $C(O)H$ ,  $C(O)OH$ , halógeno,  $R^z$ ,  $SR^z$ ,  $S(O)R^z$ ,  $S(O)_2R^z$ ,  $S(O)OR^z$ ,  $S(O)_2OR^z$ ,  $OS(O)R^z$ ,  $OS(O)_2R^z$ ,  $OS(O)OR^z$ ,  $OR^z$ ,  $NHR^z$ ,  $N(R^z)R^{z1}$ ,  $+N(R^z)(R^{z1})R^{z2}$ ,  $P(O)(OR^z)(OR^{z1})$ ,  $OP(O)(OR^z)(OR^{z1})$ ,  $C(O)R^z$ ,  $C(O)OR^z$ ,  $C(O)N(R^{z1})R^z$ ,  $OC(O)R^z$ ,  $OC(O)OR^z$ ,  $OC(O)N(R^z)R^{z1}$ ,  $N(R^{z1})C(O)R^z$ ,  $N(R^{z1})C(O)OR^z$  y  $N(R^{z1})C(O)N(R^{z2})R^z$ , donde  $R^z$ ,  $R^{z1}$  y  $R^{z2}$  se seleccionan independientemente de H y  $(CH_2CH_2O)_{ee}CH_2CH_2X^{13}R^{e1}$ ,  
 10 alquilo  $C_{1-20}$ , heteroalquilo  $C_{1-20}$ , cicloalquilo  $C_{3-20}$ , heterocicloalquilo  $C_{1-20}$ , arilo  $C_{5-20}$  o heteroarilo  $C_{1-20}$  opcionalmente sustituidos, donde ee se selecciona de 1 a 1000,  $X^{13}$  se selecciona de O, S y  $NR^{f1}$ , y  $R^{f1}$  y  $R^{e1}$  se seleccionan independientemente de H y alquilo  $C_{1-3}$ , donde dos o más de  $R^z$ ,  $R^{z1}$  y  $R^{z2}$  están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos, dos o más  
 15 de los sustituyentes  $R^{115}$ ,  $R^{116}$ ,  $R^{117}$ ,  $R^{118}$ ,  $R^{119}$ ,  $R^{120}$ ,  $R^{121}$  y  $R^{122}$  están opcionalmente unidos por uno o más enlaces para formar uno o más carbociclos y/o heterociclos opcionalmente sustituidos.  
 $R^{115}$  y  $R^{116}$  son grupos sustituyentes que están localizados en los átomos de nitrógeno que son parte de los enlaces de conexión a las fracciones adyacente al separador de eliminación de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil en un compuesto con la fórmula (III), (IV) u (VIII). El nitrógeno que lleva  $R^{116}$  está conectado a **Z** o **RM2** a través de una fracción carbonilo. El átomo de nitrógeno que lleva  $R^{115}$  está conectado a **W**, **X**, **V1** o **L**. El tamaño y la naturaleza de los sustituyentes  $R^{115}$  y  $R^{116}$  pueden, además de afectar a las propiedades farmacológicas de un compuesto con la fórmula (III), (IV) u (VIII) en general, afectar especialmente a la estabilidad de dichos enlaces de conexión. Por ejemplo, la elección de que  $R^{116}$  sea un sustituyente pequeño puede causar en general que el enlace con **Z** sea menos estable a la hidrólisis o la degradación enzimática que cuando  $R^{116}$  es un sustituyente más voluminoso (por ejemplo, un sustituyente que se ramifica en el carbono  $\alpha$  o  $\beta$  respecto al átomo de nitrógeno). La naturaleza del sustituyente  $R^{116}$ , por ejemplo, si es polar o apolar o cargado o no a pH fisiológico, puede afectar a la estabilidad del enlace con **Z** también, porque el sustituyente puede afectar a las propiedades de sustrato del enlace de conexión para enzimas específicas o retardar o aumentar la tasa de hidrólisis. Si el enlace de conexión es susceptible a enzimas que están presentes ubicuamente, por ejemplo, enzimas presentes en la circulación, esto puede causar una degradación prematura del conjugado. Lo mismo se sostiene para el sustituyente  $R^{115}$  con respecto al enlace de conexión a **W**, **X**, **V1** o **L**. De forma similar, los sustituyentes en los carbonos unidos directamente a los átomos de nitrógeno ( $R^{117}$ ,  $R^{118}$ ,  $R^{119}$ ,  $R^{121}$  y  $R^{122}$ ) pueden contribuir a la estabilidad de los enlaces de conexión.

- 35 [0087] Los sustituyentes  $R^{115}$  y  $R^{116}$  también pueden afectar a la velocidad de ciclación del separador de eliminación de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil **A**. Los sustituyentes voluminosos pueden obstaculizar la ciclación y, por tanto, reducen generalmente la velocidad de ciclación. Los sustituyentes pequeños, por lo tanto, pueden ser en general favorables para velocidades de ciclación rápidas. Sin embargo, otras propiedades del sustituyente, tales como la electronegatividad, la polaridad y la disponibilidad de grupos donadores y/o aceptores de enlaces de hidrógeno, también pueden afectar a la velocidad de ciclación. Además, si uno de  $R^{115}$  y  $R^{116}$  es un sustituyente voluminoso, la velocidad de ciclación puede mejorarse con respecto a los separadores de ciclación que contienen dos sustituyentes no voluminosos, posiblemente debido a la cepa B. La velocidad de ciclación también puede ser afectada por los otros sustituyentes sobre el separador de eliminación de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil. Las propiedades de estos sustituyentes tales como la polaridad, la electronegatividad y las capacidades de enlaces de hidrógeno, pueden tener un efecto sobre la velocidad de ciclación. Además, la presencia de sustituyentes geminales en uno de los carbonos entre los dos átomos de nitrógeno puede mejorar la velocidad de ciclación también (efecto Thorpe-Ingold). La unión de sustituyentes para formar uno o más anillos también puede tener un efecto sobre la velocidad de ciclación. A este respecto, cada modificación que puede acercar más a los dos átomos de nitrógeno o que reduce la entropía puede tener un efecto de aceleración sobre la velocidad de ciclación.

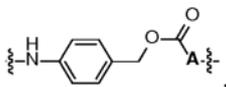
Los efectos sobre la velocidad de ciclación pueden ser dependientes del pH y el orden de la velocidad de ciclación de dos separadores de eliminación de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil se puede invertir yendo de, por ejemplo, pH 7 a pH 5.

- 5 Aunque puede ser beneficioso en algunos casos que un conjugado de esta invención tenga un separador de eliminación de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil con una velocidad de ciclación rápida, liberando así el fármaco activo poco después de la escisión de  $V^1$ , en otros casos puede ser más beneficioso tener un separador de eliminación de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil que tenga una velocidad de ciclación lenta o una velocidad de ciclación que se encuentre entre dos límites predeterminados o que se cycle preferiblemente con una velocidad rápida solo dentro de ciertos límites de pH. Esto puede causar que el producto intermedio separador de ciclación-fármaco sobreviva durante una cierta cantidad de tiempo como un profármaco que liberará el fármaco lentamente o después de que se haya cumplido una cierta condición.

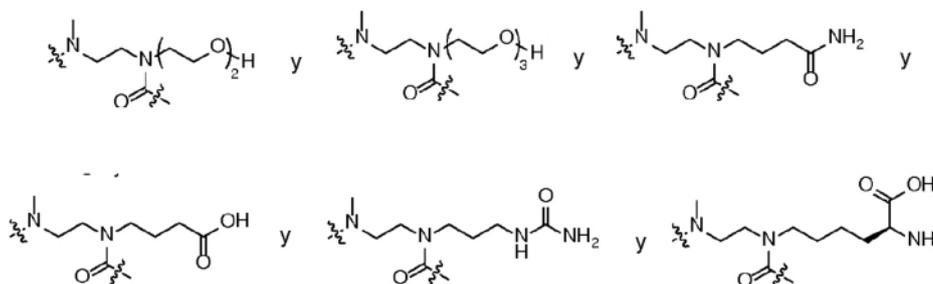
[0088] En otras formas de realización, el conector de ciclación **A** es



- 15 En otra forma de realización, esta invención se refiere a un compuesto con las fórmulas (III) o (IV) donde  $X^1$  es O e Y está conectado a  $X^1$  a través de un separador de ciclación de  $\omega$ -amino aminocarbonil que es parte de Y. En otra forma de realización, el sistema separador Y es



donde **A** se selecciona de



- 20 El grupo de enlace **L**

[0089] El grupo de enlace **L** enlaza una o más fracciones  $V^1$  y/o **Y** a  $L^2$  o **RM**. La síntesis puede ser más directa cuando **L** está conectada a  $V^1$  en vez de a **Y** y el compuesto puede ser menos propenso a una degradación prematura, ya que  $V^1$  puede estar más protegido. La conexión de **L** a **Y** puede tener la ventaja de que  $V^1$  se puede transformar y/o escindir con más facilidad. Otras razones para conectar **L** a **Y** puede ser, por ejemplo, que (parte de) **Y** permanece unido a **L** tras la escisión de  $V^1$ , lo que previene la liberación de moléculas pequeñas reactivas, y que el compuesto puede mostrar mejores propiedades farmacológicas, solubilidad o comportamiento de agregación. **L** es un grupo de enlace que enlaza funcionalmente o espacia la una o más fracciones  $V^1$  y/o **Y** y la fracción  $L^2$  o **RM**. En un compuesto con la fórmula (IV),

- 25

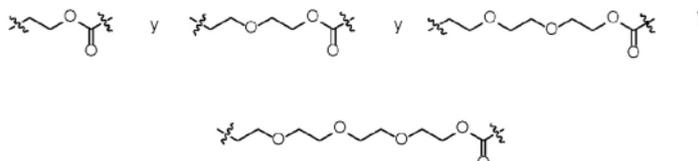
5 el espaciado puede hacer que la fracción reactiva **RM** sea más accesible a la pareja de reacción, por ejemplo, cuando la fracción funcional **V<sup>2</sup>** se está acoplando. En un compuesto con la fórmula (III), el espaciado puede proporcionar una mejor accesibilidad de **V<sup>1</sup>**, porque **V<sup>2</sup>** está más alejado, lo que, especialmente en el caso de una escisión o transformación enzimática de **V<sup>1</sup>**, puede mejorar la tasa a la cual se transforma y/o se escinde **V<sup>1</sup>**. Sin embargo, se ha observado que una fracción **L** relativamente corta puede mejorar la eficacia *in vivo* de un compuesto con la fórmula (III) en comparación con compuestos similares con una fracción **L** relativamente larga, siempre que **V<sup>1</sup>** pueda todavía transformarse y/o escindir-se en el sitio diana.

[0090] El grupo de enlace **L** debe contener grupos funcionales adecuados en ambos de sus extremos para proporcionar un acoplamiento selectivo con una o más fracciones **V<sup>1</sup>** y/o **Y** y **L<sup>2</sup>** o **RM**.

10 [0091] El grupo de enlace **L** puede ser una fracción hidrosoluble o contener una o más fracciones hidrosolubles o grupos funcionales hidrosolubles, de manera que **L** contribuye a la solubilidad en agua de un compuesto con las fórmulas (III) o (IV). **L** también puede ser una fracción o contener una o más fracciones que reduzca(n) la agregación de un compuesto con las fórmulas (III) o (IV), que pueden ser o no una fracción/fracciones que también aumente(n) la solubilidad en agua de un compuesto con las fórmulas (III) o (IV). Además, **L** también puede contener o ser una fracción que cause que un compuesto con las fórmulas (III) o (IV) sea menos susceptible a una respuesta inmunitaria o a un mayor flujo de salida de las células por proteínas transportadoras asociadas a la resistencia a múltiples fármacos. La fracción **L** puede contener una fracción oligoetilenglicol o polietilenglicol o un derivado de las mismas. Esta fracción puede, por ejemplo, mejorar la solubilidad en agua, reducir la agregación, reducir la respuesta inmunitaria y/o reducir el flujo de salida de las células de un compuesto con las fórmulas (III) o (IV). **L** puede contener, por ejemplo, una fracción  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{ff}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}^{13}$  o  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{ee}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}^{13}\text{R}^{e1}$ , donde *ff* se selecciona de 1 a 1000, **X<sup>13</sup>** se selecciona de O, S y NR<sup>f1</sup>, y R<sup>f1</sup> y R<sup>e1</sup> se seleccionan independientemente de H y alquilo C<sub>1-3</sub>. En una forma de realización, tal fracción es parte de un sustituyente unido a la cadena principal de **L** que conecta **RM** o **L<sup>2</sup>** a **V<sup>1</sup>** y no presente en la cadena principal de la propia **L** para mantener la longitud de la cadena principal relativamente corta. La fracción **L** también puede contener grupos polares y/o grupos que están cargados, al menos parcialmente, a pH fisiológico para mejorar las propiedades farmacológicas de un compuesto con las fórmulas (III) o (IV).

25

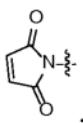
[0092] En una forma de realización, **L** se selecciona de



La fracción reactiva **RM** y el grupo de enlace **L<sup>2</sup>**

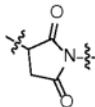
30 [0093] La fracción reactiva **RM** en un compuesto con la fórmula (IV) está conectada al grupo de enlace **L** y es capaz de reaccionar con un grupo funcional adecuado en una pareja de reacción. En una forma de realización de esta invención, la fracción reactiva **RM** está diseñada para reaccionar con un grupo funcional en la fracción **V<sup>2</sup>**, lo que resulta en la formación de un compuesto con la fórmula (III). En esta reacción, la fracción **RM** se transforma en la fracción **L<sup>2</sup>**. En otra forma de realización, la fracción reactiva **RM** está diseñada para reaccionar con una fracción complementaria *in situ*, por ejemplo, *in vivo*, por ejemplo, con seroalbúmina, para dar un compuesto que puede o puede no ser un compuesto con la fórmula (III). En un aspecto de esta invención, la fracción reactiva **RM** contiene un grupo electrófilo que reacciona con un grupo nucleofílico en la pareja de reacción, por ejemplo, **V<sup>2</sup>**, por ejemplo, un grupo tiol, un grupo amino o un grupo hidroxilo. En una forma de realización, la fracción **RM** es

35



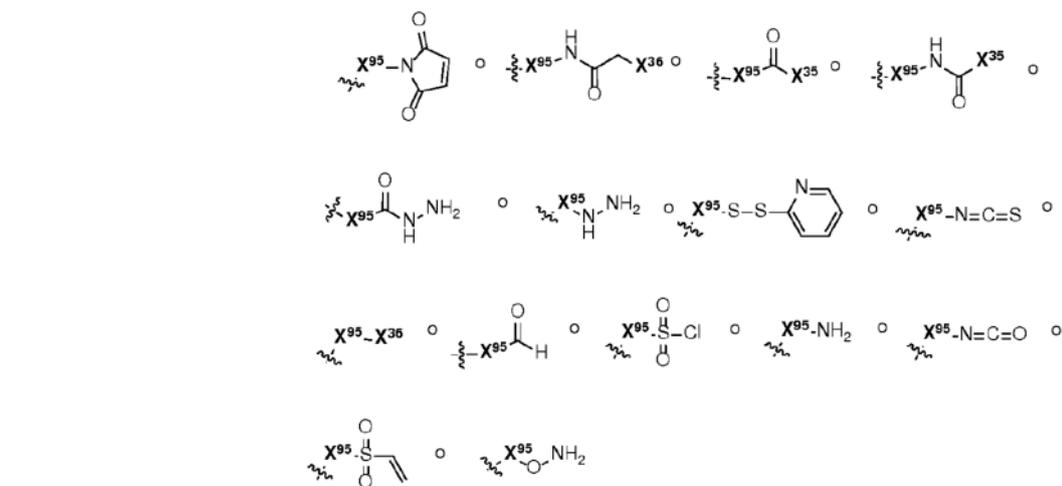
40 lo que la hace capaz de reaccionar con un grupo tiol en la pareja de reacción, por ejemplo, la fracción **V<sup>2</sup>**.

5 [0094] El grupo de enlace  $L^2$  en un compuesto con la fórmula (III) representa el resto de **RM** cuando la fracción reactiva **RM** ha reaccionado con  $V^2$ . Este grupo enlaza entonces la fracción  $V^2$  con **L**. El grupo que permanece puede ser un enlace, lo que significa que  $L^2$  está ausente. Típicamente, sin embargo,  $L^2$  es un grupo de enlace. Cuando se forma un compuesto con la fórmula (III) de manera distinta a mediante un compuesto con la fórmula (IV),  $L^2$  no representa el resto de **RM**, pero puede representar una fracción similar o la misma y además seleccionarse de, por ejemplo, alquileno  $C_{1-10}$ , heteroalquileno  $C_{1-10}$ , cicloalquileno  $C_{3-10}$ , heterocicloalquileno  $C_{1-10}$ , arileno  $C_{5-10}$  y heteroarileno  $C_{1-10}$  opcionalmente sustituidos. La fracción  $L^2$  puede comprender opcionalmente una fracción  $X^{14}(CH_2CH_2O)_{99}CH_2CH_2X^{14}$ . En una forma de realización, la fracción  $L^2$  es



10 **La fracción RM2**

[0095] **RM2** puede ser una fracción reactiva o un grupo saliente. Si **RM2** es una fracción reactiva, es preferiblemente diferente de la fracción reactiva **RM**. De esta manera, las reacciones con el conector bifuncional se pueden realizar selectiva e individualmente con cada una de las fracciones reactivas. Cuando **RM2** es una fracción reactiva, esto significa que, después de la reacción con una fracción terapéutica o diagnóstica o un derivado de la misma que contiene una fracción moduladora, la fracción **RM2** (o lo que queda de ella después de la reacción) puede volverse parte de dicha fracción terapéutica o diagnóstica o un derivado de la misma que contiene una fracción moduladora, opcionalmente junto con cualquier parte de **Y** que puede que no se autoelimine debido a una capacidad saliente limitada o ausente de **RM2** conjugada con la fracción terapéutica o diagnóstica. En una forma de realización, la **RM2** puede estar conectada a **Y** y ser



20 donde  $X^{35}$  se selecciona de haluro, hidroxilo,  $OC(O)R^{dd}$  y  $OC(O)OR^{dd}$ , o  $C(O)-X^{35}$  es un éster activo,  $X^{36}$  se selecciona de haluro, mesiloxi, trifiloxi y tosiloxi,  $X^{95}$  está ausente o se selecciona de O, S,  $NR^{95}$ , alquilo  $C_{1-3}$  y heteroalquilo  $C_{1-3}$ ,  $R^{dd}$  se selecciona de alquilo  $C_{1-10}$ , heteroalquilo  $C_{1-10}$ , cicloalquilo  $C_{3-10}$ , heterocicloalquilo  $C_{1-10}$ , arilo  $C_{5-10}$  y heteroarilo  $C_{1-10}$  opcionalmente sustituidos, y  $R^{95}$  se selecciona de H y alquilo  $C_{1-3}$ .

[0096] **RM2** también puede ser un grupo saliente. En este caso, **RM2** se sustituye por la fracción terapéutica o diagnóstica o un derivado de la misma que contiene una fracción moduladora en una reacción de un compuesto con la fórmula (VIII) con tal fracción terapéutica o diagnóstica o un derivado de la misma y esta fracción terapéutica o diagnóstica o un derivado de la misma se une directamente a **Y**.

30 En una forma de realización, **RM2** se selecciona a partir de un haluro (fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro), azida, un sulfonato (por ejemplo, un alcanosulfonato  $C_{1-6}$  opcionalmente sustituido, tal como metanosulfonato,

5 trifluorometanosulfonato y trifluoroetanosulfonato, o un bencenosulfonato opcionalmente sustituido, tal como *p*-toluenosulfonato y nosilato), imidazol, una imida tiona cíclica, succinimida-*N*-óxido, ftalimida-*N*-óxido, *p*-nitrofenóxido *o*-nitrofenóxido, pentafluorofenóxido, tetrafluorofenóxido, 1,3,5-triclorofenóxido, 1,3,5-trifluorofenóxido, un carboxilato, un aminocarboxilato (carbamato), un alcoxicarboxilato (carbonato) y un grupo alcoxi que junto con el grupo carbonilo de **Y** se puede denominar grupo de éster activo. Tales grupos alcoxi incluyen, pero de forma no limitativa, succinimida-*N*-óxido, *p*-nitrofenóxido, pentafluorofenóxido, tetrafluorofenóxido, 1-hidroxibenzotriazol y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, y grupos con una capacidad saliente comparable.

#### La fracción <sup>2</sup>

10 [0097] La fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción funcional, lo que significa que añade funcionalidad adicional a un compuesto de la invención.

En una forma de realización, **V<sup>2</sup>** es una fracción de dirección. En otra forma de realización, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que mejora las propiedades farmacológicas de un compuesto de la invención. En otra forma de realización, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que causa la acumulación de un compuesto de la invención en un sitio diana. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que mejora la solubilidad acuosa de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que mejora la solubilidad acuosa de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que aumenta la hidrofobicidad de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que reduce la extravasación de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que reduce excreción de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que reduce la inmunogenicidad de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que mejora el tiempo de circulación de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que mejora la capacidad de un compuesto de la invención para cruzar una barrera biológica, por ejemplo, una membrana, una pared celular o la barrera hematoencefálica. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que mejora la capacidad de interiorización de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que permite la interiorización de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que causa que los compuestos de la invención se agreguen. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que reduce la agregación de un compuesto de la invención. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que causa que un compuesto de la invención forme micelas o liposomas. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que causa la complejación de un compuesto de la invención con otra molécula, por ejemplo, una biomolécula. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción polinucleotídica que forma complejos con una secuencia de nucleótidos complementaria, por ejemplo, ARN o ADN. En otra forma de realización más, la fracción **V<sup>2</sup>** es una fracción que causa que un compuesto de la invención se una, asocie, interactúe o forme complejos con otra fracción, por ejemplo, una superficie o un soporte sólido (funcionalizados). En otra forma de realización, **V<sup>2</sup>** presenta dos o más funciones diferentes. La fracción **V<sup>2</sup>** puede ser, por ejemplo, una fracción de dirección y al mismo tiempo mejorar las propiedades farmacológicas, incluida la solubilidad en agua.

35 [0098] En un aspecto de la invención, la fracción **V<sup>2</sup>** incluye en su alcance cualquier unidad que se una o se asocie reactivamente o forme complejos con un receptor, un complejo receptor, un antígeno u otra fracción asociada a una población de células diana dada. **V<sup>2</sup>** puede ser cualquier molécula que se una a, forme complejos con o reaccione con una fracción de una población celular que se quiere modificar terapéuticamente o de otro modo biológicamente. La fracción **V<sup>2</sup>** actúa para administrar la una o más fracciones **Z** a la población de células diana particular con la cual **V<sup>2</sup>** reacciona o a la que **V<sup>2</sup>** se une. Tales fracciones **V<sup>2</sup>** incluyen, pero de forma no limitativa, aptámeros, anticuerpos en toda su longitud y fragmentos de anticuerpos y derivados de los mismos, lectinas, modificadores de respuestas biológicas, enzimas, vitaminas, factores de crecimiento, esteroides, nutrientes, residuos de azúcar, residuos de oligosacáridos, hormonas y cualquier derivado de los mismos, o cualquier combinación de cualquiera de estos. Tras la unión, la asociación reactiva o la complejación, los compuestos de la invención pueden o pueden no internalizarse. Si se produce la internalización, la transformación y/o la escisión de **V<sup>1</sup>** ocurre preferiblemente dentro de la célula diana.

50 [0099] Las fracciones **V<sup>2</sup>** no inmunorreactivas útiles de proteína, polipéptido o péptido incluyen, pero de forma no limitativa, transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina y sus derivados, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformantes ("TGF"), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , factores de crecimiento tumoral, factor de crecimiento del virus vaccinia ("VGF"), insulina y factores de crecimiento de tipo insulínico I y II, lectinas y apoproteína de lipoproteína de baja densidad. Las fracciones **V<sup>2</sup>** de anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo. Varios procedimientos bien conocidos en la técnica se pueden usar para la producción de anticuerpos policlonales para un antígeno de interés.

55 Las fracciones **V<sup>2</sup>** de anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno particular (por ejemplo, un antígeno de célula cancerosa). Un anticuerpo monoclonal (mAb) para un antígeno de interés

se puede preparar usando cualquier técnica conocida en la técnica que provea para la producción de moléculas de anticuerpos monoclonales.

5 [0100] Las fracciones  $V^2$  de anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero de forma no limitativa, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados o anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón (u otras especies). Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la técnica.

La fracción  $V^2$  puede ser también un anticuerpo biespecífico. Los métodos para la producción de anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica.

10 La fracción  $V^2$  puede ser un fragmento, derivado o análogo funcionalmente activo de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno en una célula diana, por ejemplo, un antígeno de una célula cancerosa. A este respecto, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, el derivado o el análogo es capaz de provocar anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que reconoce el anticuerpo del que deriva el fragmento, el derivado o el análogo.

15 Otras fracciones  $V^2$  útiles comprenden fragmentos de anticuerpos, incluidos, pero de forma no limitativa, fragmentos  $F(ab')_2$ , que contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada, que se pueden producir por la digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos  $F(ab')_2$ . Otras fracciones  $V^2$  útiles son los dímeros de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo de los mismos tales como los Fv o anticuerpos de cadena sencilla (SCA), anticuerpos de dominio, anticatalinas, anticuerpos, nanocuerpos y cualquier otra molécula con una especificidad igual, similar o comparable al anticuerpo precursor.

20 Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto partes humanas como no humanas, que pueden producirse utilizando técnicas de ADN recombinante estándares, son fracciones  $V^2$  útiles. Un anticuerpo quimérico es una molécula donde diferentes partes derivan de especies animales diferentes, tales como los que tienen una región variable derivada de uno monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana.

25 Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables como fracciones  $V^2$ . Tales anticuerpos pueden producirse, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes endógenos de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, pero que pueden expresar genes humanos de las cadenas pesadas y ligeras.

30 En otras formas de realización, la fracción  $V^2$  es una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento o derivado del mismo funcionalmente activo, por ejemplo, uno donde el anticuerpo se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico) en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal con una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma, preferiblemente al menos una parte de la proteína de 10, 20 o 50 aminoácidos) que no es el anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo se enlaza de manera covalente con la otra proteína en el extremo N-terminal del dominio constante.

40 [0101] Los anticuerpos de la fracción  $V^2$  incluyen análogos y derivados que se modifican, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre y cuando tal unión covalente permita que el anticuerpo retenga su inmunoespecificidad de unión al antígeno. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y los análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que han sido modificados adicionalmente, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, PEGilación, reducción de disulfuro, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores o de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a otra proteína, etc. Adicionalmente, el análogo o el derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

45 [0102] Los anticuerpos de la fracción  $V^2$  incluyen anticuerpos que tienen modificaciones (por ejemplo, sustituciones (por ejemplo, cisteína a serina o serina a cisteína), deleciones o adiciones). En particular, incluyen anticuerpos que tienen modificaciones en los residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn. También se pueden introducir modificaciones para ser capaces de acoplar el anticuerpo a conjugados conector-agente en posiciones específicas en el anticuerpo.

50 [0103] En una forma de realización específica, un anticuerpo inmunoespecífico para un antígeno canceroso o tumoral se usa como una fracción  $V^2$  conforme a los compuestos, las composiciones y los métodos de la invención.

[0104] Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de células cancerosas se pueden obtener comercialmente o producir por cualquier método conocido por una persona experta en la materia, tal como las técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. Las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos inmunoespecíficos para

un antígeno de células cancerosas se pueden obtener, por ejemplo, de la base de datos GenBank o una base de datos similar, una fuente comercial o de otro tipo, publicaciones de la literatura o por clonación y secuenciación rutinarias.

[0105] Un anticuerpo disponible para el tratamiento del cáncer que puede ser útil para la incorporación en conjugados de esta invención como una **V<sup>2</sup>** es HERCEPTIN (trastuzumab), que es un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico. También se describen, pero están fuera del alcance de las reivindicaciones, RITUXAN (rituximab), que es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico para el tratamiento de pacientes con linfoma no hodgkiniano; OvaRex (oregovomab), que es un anticuerpo murino para el tratamiento del cáncer ovárico; Panorex (edrecolomab), que es un anticuerpo IgG<sub>2a</sub> murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; IMC-BEC2 (mitumomab), que es un anticuerpo IgG murino para el tratamiento del cáncer de pulmón; IMC-C225 (erbitux), que es un anticuerpo IgG quimérico para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello; Vítaxin, que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; Campath I/H (alemtuzumab), que es un anticuerpo IgG<sub>1</sub> humanizado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL); SGN-70, que es un anticuerpo anti-CD70 humanizado para el tratamiento de neoplasias hematológicas; Smart MI95, que es un anticuerpo IgG humanizado para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML); J591, que es un anticuerpo humanizado contra el antígeno de membrana específico de la próstata; LymphoCide (epratuzumab), que es un anticuerpo IgG humanizado para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano; SGN-33, que es un anticuerpo anti-CD33 humanizado para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda; Smart ID 10, que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano; Oncolym, que es un anticuerpo murino para el tratamiento del linfoma no hodgkiniano; Allomune, que es un mAb anti-CD2 humanizado para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o el linfoma no hodgkiniano; Avastin (bevacizumab), que es un anticuerpo anti-VEGF humanizado para el tratamiento de los cánceres de pulmón y colorrectal; SGN-40, que es un anticuerpo anti-CD40 humanizado para el tratamiento del mieloma múltiple; SGN-30, que es un anticuerpo anti-CD30 quimérico para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin; CEAcide, que es un anticuerpo anti-CEA humanizado para el tratamiento del cáncer colorrectal; IMC-1C11, que es un anticuerpo anti-KDR quimérico para el tratamiento del cáncer colorrectal, los cánceres de pulmón y el melanoma; y Cetuximab, que es un anticuerpo quimérico anti-EGFR para el tratamiento de cánceres positivos para el factor de crecimiento epidérmico.

[0106] Otros anticuerpos que pueden ser útiles para la incorporación en conjugados de esta divulgación como una fracción **V<sup>2</sup>** incluyen, pero de forma no limitativa, anticuerpos contra los antígenos siguientes: CA125, CA9, CA6, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, Lewis A, alfa fetoproteína, CA 242, fosfatasa alcalina de placenta, antígeno específico de la próstata (PSA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), fosfatasa ácida prostática, receptores del factor de crecimiento epidérmico, receptores de interleucina, integrinas, receptores del factor de crecimiento de tipo insulínico, CanAg, DAF, PEM, IRTA-2, IRTA-4, AFP, HER2, EGFR, VEGFR1, VEGFR2, MAGE-1, LUCA1, LUCA2, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, ED-B, MADCAM, CEACAM5, MCP-1, Cripto, TAT226, VLA-4, C3B, receptor anti-transferrina, endosialina, E-selectina, GCC, GP-75, Syndecan-1, GPNMB, ROBO4, STEAP-1, CMET, EGP-1, Kim-1, Tim-1, tirosinas quinasas del receptor Eph, HMW-MAA, TMEFF2, PSCA, CLL-1, TNF- $\alpha$ , FAP- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , EphA2, EphB2, EphB3, EphB4, EGFL-7, DLL-4, RS7, 4-1BB, TENB2, FLT3, p97, FGF19, FGFR2, glipicano-3, P53, L53, RON, MN, GFR- $\alpha$ 3, FDF03, TSLPR, MUC1-KLH, Tag 72, MUC18, B7H4, PTK7, RG-1, MUC16, CSAP, PDGF, PSMA, 5T4, EpCAM, SGA-1M, SGA-56M, SGA-72M, IGF1R, CCR2, CCR5, CTLA4, CLCA-1, ELAM1, DR5, CEA, CXCR-4, GD2, gp100, gangliósido GD3, L243, HMGB1, GPC-3, MART1, receptor de IL-2, CD2, CD3, CD303, CD4, CD20, CD43, CD44, CD30, CD55, CD151, CD154, CD19, CD21, CD23, CD79, CD52, CD25, CD45, CD46, CD56, CD59, CD7, CD137, CD138, CD74, CD133, CD80, CD63, CD64, CD66, CD140b, CD32, CD33, CD37, CD22, CD27, Apo-2, ERBB4, HLA-DR, HLA-DR10, gonadotropina coriónica humana, CD38, CD40, CD70, mucina, P21, un receptor específico de células madre cancerosas, MPG y el producto del oncogén Neu. Muchos otros anticuerpos de internalización o sin internalización que se unen a antígenos asociados a tumores se pueden usar en esta invención como una fracción **V<sup>2</sup>**, algunos de los cuales se han revisado<sup>9</sup>.

[0107] En esta invención, el anticuerpo anti-Her2 trastuzumab se selecciona como la fracción **V<sup>2</sup>**.

[0108] **V<sup>2</sup>** puede reaccionar con la fracción reactiva **RM** a través de, por ejemplo, un heteroátomo en **V<sup>2</sup>**. Los heteroátomos que pueden estar presentes en **V<sup>2</sup>** incluyen, sin limitación, azufre (en una forma de realización, a partir de un grupo sulfhidrilo), oxígeno (en una forma de realización, a partir de un grupo carboxilo o hidroxilo), y nitrógeno (en una forma de realización, a partir de un grupo amino primario o secundario). **V<sup>2</sup>** también puede reaccionar a través de, por ejemplo, un átomo de carbono (en una forma de realización, a partir de un grupo carbonilo). Estos átomos pueden estar presentes en **V<sup>2</sup>** en el estado natural de **V<sup>2</sup>**, por ejemplo, un anticuerpo de origen natural, o se puede introducir en **V<sup>2</sup>** a través de una modificación (química). Los grupos sulfhidrilo libres se pueden generar en un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo por reducción del (fragmento de) anticuerpo con un agente reductor tal como el ditiotreitól (DTT) o la tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). De esta manera, se pueden obtener anticuerpos modificados que pueden tener de 1 a aproximadamente 20 grupos sulfhidrilo, pero típicamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 9 grupos sulfhidrilo.

Alternativamente,  $V^2$  puede tener uno o más grupos carbohidrato que se pueden modificar químicamente para contener uno o más grupos sulfhidrilo. Como otra alternativa, los grupos sulfhidrilo se pueden generar por reacción de grupos amino, por ejemplo, de fracciones de lisina, en  $V^2$  con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), N-succinimidilo S-acetilacetato (SATA) u otro reactivo generador de sulfhidrilo. Tal reactivo también se puede usar para introducir una funcionalidad adicional. Por ejemplo, se puede usar un reactivo generador de sulfhidrilo que no solo introduzca un grupo sulfhidrilo sobre  $V^2$ , sino que al mismo tiempo introduzca una fracción hidrosoluble tal como un oligoetilenglicol o un polietilenglicol. Tal grupo puede estar presente como un sustituyente en el reactivo (en vez de ser parte de la cadena principal) para mantener el grupo sulfhidrilo cerca de la fracción  $V^2$ . La presencia de tal fracción hidrosoluble puede mejorar finalmente las propiedades farmacológicas de un compuesto con la fórmula (III).

[0109] En una forma de realización, la fracción  $V^2$  es una fracción de unión a receptor.  
 En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o un derivado del mismo.  
 En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  es un anticuerpo monoclonal o un fragmento o derivado del mismo. En una forma de realización,  $V^2$  tiene uno o más grupos sulfhidrilo y  $V^2$  reacciona con una o más fracciones **RM** de uno o más compuestos con la fórmula (IV) a través de uno o más de los átomos de azufre de estos grupos sulfhidrilo para formar un compuesto con la fórmula (III) donde se han incorporado así uno o más compuestos con la fórmula (IV).  
 En otra forma de realización,  $V^2$  contiene uno o más enlaces disulfuro que se pueden reducir químicamente a grupos sulfhidrilo (dos por cada enlace disulfuro), que pueden luego hacerse reaccionar con una o más fracciones reactivas **RM** para formar un compuesto con la fórmula (III).  
 En otra forma de realización,  $V^2$  contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 grupos sulfhidrilo, que se pueden hacer reaccionar con una o más fracciones reactivas **RM** para formar un compuesto con la fórmula (III).

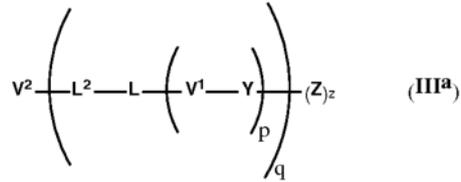
[0110] En otra forma de realización,  $V^2$  contiene aproximadamente 2 grupos sulfhidrilo, que se pueden hacer reaccionar con una o más fracciones reactivas **RM** para formar un compuesto con la fórmula (III).  
 En otra forma de realización,  $V^2$  contiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 grupos sulfhidrilo, que se pueden hacer reaccionar con una o más fracciones reactivas **RM** para formar un compuesto con la fórmula (III).  
 En otra forma de realización,  $V^2$  contiene aproximadamente 4 grupos sulfhidrilo, que se pueden hacer reaccionar con una o más fracciones reactivas **RM** para formar un compuesto con la fórmula (III).  
 En otra forma de realización,  $V^2$  contiene de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 grupos sulfhidrilo, que se pueden hacer reaccionar con una o más fracciones reactivas **RM** para formar un compuesto con la fórmula (III).  
 En otra forma de realización,  $V^2$  contiene aproximadamente 8 grupos sulfhidrilo, que se pueden hacer reaccionar con una o más fracciones reactivas **RM** para formar un compuesto con la fórmula (III).  
 En otra forma de realización,  $V^2$  puede tener uno o más grupos carbohidrato que se pueden modificar químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilo.  $V^2$  reacciona con las fracciones **RM** a través de los átomos de azufre de estos uno o más grupos sulfhidrilo para formar un compuesto con la fórmula (III).  
 En otra forma de realización,  $V^2$  puede tener uno o más grupos lisina que se pueden modificar químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilo, que se pueden hacer reaccionar con una o más fracciones reactivas **RM** para formar un compuesto con la fórmula (III).  
 Las fracciones reactivas que se pueden hacer reaccionar con un grupo sulfhidrilo incluyen, pero de forma no limitativa, haluro de carbamoilo, haluro de acilo,  $\alpha$ -haloacetamida, halometilcetona, vinilsulfona, maleimida y 2-disulfanilpiridina.

[0111] Un conjugado con la fórmula (III) puede existir como una mezcla, donde cada componente de la mezcla tiene un valor  $q$  diferente. Por ejemplo, el compuesto puede existir como una mezcla de dos compuestos separados, un compuesto donde  $q$  es 2 y otro compuesto donde  $q$  es 3. Como otro ejemplo, un compuesto puede existir como una mezcla de 5 compuestos separados, donde  $q$  es 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Como otro ejemplo más, un compuesto puede existir como una mezcla de más de 5 compuestos separados. Tales mezclas pueden además estar "contaminadas" con  $V^2$  no conjugada. Cuando se analiza el compuesto con la fórmula (III) se entiende que  $q$  puede ser el número medio (redondeado) de unidades  $L^2-L(-V^1-Y)_p(Z)_{z/q}$  por fracción  $V^2$ . Además, para una  $q$  dada, el compuesto puede existir como una mezcla de isómeros (constitutivos), ya que las  $q$  fracciones  $L^2-L(-V^1-Y)_p(Z)_{z/q}$  pueden estar conectadas a distintos (conjuntos de) grupos funcionales en  $V^2$ . Debe observarse que el número de fracciones **Z** en cada unidad solo es igual a  $z/q$  si todas las unidades son las mismas y/o contienen el mismo número de fracciones **Z**.  
 En una forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre de  $V^2$ .  
 En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre y  $q$  varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 20.

[0112] En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre y  $q$  varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 9.  
 En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre y  $q$  varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 3.

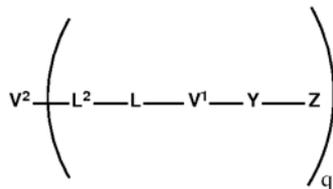
- En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre y  $q$  es aproximadamente 1.
- En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre y  $q$  es aproximadamente 2.
- 5 En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre y  $q$  varía de aproximadamente 3 a aproximadamente 5.
- En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre y  $q$  es aproximadamente 4.
- 10 En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre y  $q$  varía de aproximadamente 7 a aproximadamente 9.
- En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  está conectada a  $L^2$  a través de un átomo de azufre y  $q$  es aproximadamente 8.
- En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (III) existe como una mezcla de compuestos separados.
- En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (III) existe como una mezcla de compuestos separados donde  $q$  para tres compuestos es 1, 2 y 3, respectivamente.
- 15 En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (III) existe como una mezcla de compuestos separados donde  $q$  para tres compuestos es 3, 4 y 5, respectivamente.
- En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (III) existe como una mezcla de compuestos separados donde  $q$  para tres compuestos es 5, 6 y 7, respectivamente.
- 20 En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (III) existe como una mezcla de compuestos separados donde  $q$  para tres compuestos es 7, 8 y 9, respectivamente.
- [0113] En otra forma de realización, la fracción  $V^2$  es una fracción que es capaz de transportar el conjugado a través de una barrera biológica, por ejemplo, una membrana celular, ya sea con o sin previa unión, asociación o formación de complejos con un receptor o un complejo receptor.
- 25 [0114] En otro aspecto de la invención, la fracción  $V^2$  es una fracción que mejora las propiedades farmacológicas de un conjugado de la invención. Por ejemplo, la fracción  $V^2$  se puede elegir de manera que la solubilidad en agua del conjugado se mejora (adicionalmente). Esto se puede conseguir eligiendo una  $V^2$  que sea una fracción hidrófila. Alternativamente, la fracción  $V^2$  se puede usar, por ejemplo, para aumentar el periodo de permanencia del compuesto en la circulación, para reducir la extravasación y/o la excreción, para reducir la agregación y/o para reducir la inmunogenicidad del compuesto. Esto puede, por ejemplo, conseguirse eligiendo una  $V^2$  que sea o contenga un polietilenglicol u oligoetilenglicol o un derivado de los mismos. Cuando la fracción  $V^2$  es una fracción que mejora las propiedades farmacológicas de un compuesto de la invención y  $V^1$  es una fracción que se puede escindir o transformar inespecíficamente y no hay fracciones  $V^1$  y  $V^2$ , el compuesto sirve solamente para mejorar las propiedades (farmacológicas) de una o más fracciones  $Z$ .
- 30
- 35 [0115] En una forma de realización,  $V^2$  es una fracción que mejora las propiedades farmacológicas y  $V^1$  es una fracción que se puede escindir o transformar específicamente.
- [0116] Debe entenderse que la fracción funcional  $V^2$  puede tener varias propiedades funcionales combinadas. Por ejemplo,  $V^2$  puede ser una fracción que mejora las propiedades farmacológicas de un compuesto de esta invención y al mismo tiempo ser o contener una fracción de dirección.
- 40 [0117] Los conjugados de esta divulgación pueden contener una o más fracciones moduladoras. Estas fracciones moduladoras pueden ser iguales o diferentes. La presencia de dos o más fracciones moduladoras puede afectar favorablemente a las propiedades del conjugado. Por ejemplo, puede mejorar la solubilidad en agua y/o aumentar la eficiencia de dirección del conjugado. Además, si en un conjugado dirigido hay dos fracciones moduladoras y la fracción moduladora requerida para la dirección se escinde prematuramente de  $Z$ , por ejemplo, en la circulación, la segunda
- 45 fracción moduladora atenúa la citotoxicidad de  $Z$ .
- [0118] En una forma de realización,  $p$  es un número entero de 1 (incluido) a 128 (incluido). En otra forma de realización,  $q$  es un número entero de 1 (incluido) a 1000 (incluido). En otras formas de realización,  $p$  es un número entero de 1 (incluido) a 64 (incluido) o 32 (incluido) o 16 (incluido) u 8 (incluido) o 4 (incluido) o 2 (incluido), o  $p$  es 1. En otras formas de realización,  $q$  es un número entero de 1 (incluido) a 500 (incluido) o 400 (incluido) o 300 (incluido) o 200 (incluido) o 100 (incluido) o 16 (incluido) u 8 (incluido) o 6 (incluido) o 4 (incluido) o 2 (incluido), o  $q$  es 1. En otra forma de realización,  $q$  se selecciona de 1 a 4.
- 50

[0119] En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (III) está representado por

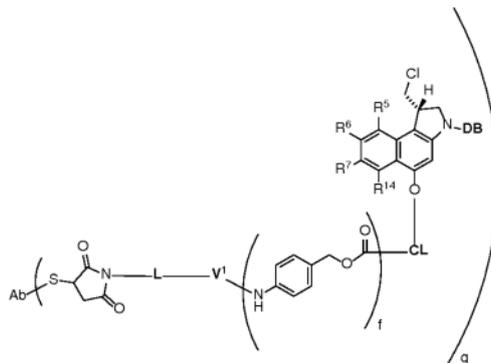


[0120] En una forma de realización, p en un compuesto con la fórmula (IIIa) es 1.

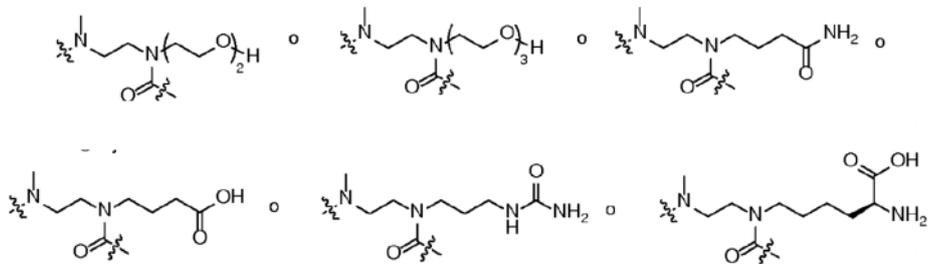
5 [0121] En otra forma de realización, en un compuesto con la fórmula (IIIa) p es 1 y z es igual a q, lo que reduce la fórmula (IIIa) a:



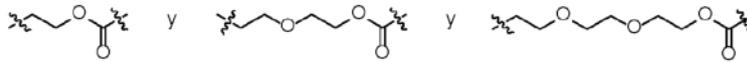
[0122] En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (IIIa) está representado por



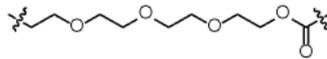
10 o por un isómero, o por una mezcla de isómeros, donde R<sup>5</sup> se selecciona de H, metilo y metoxi, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>14</sup> son H, **DB** es **DB1**, **V<sup>1</sup>** se selecciona de valilcitrulina, valil-lisina, fenilalanil-lisina, alanilfenilalanil-lisina y D-alanilfenilalanil-lisina, f es 1 o 2, **CL** se selecciona de



L se selecciona de



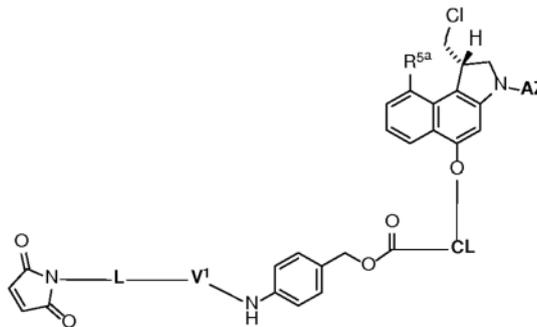
y



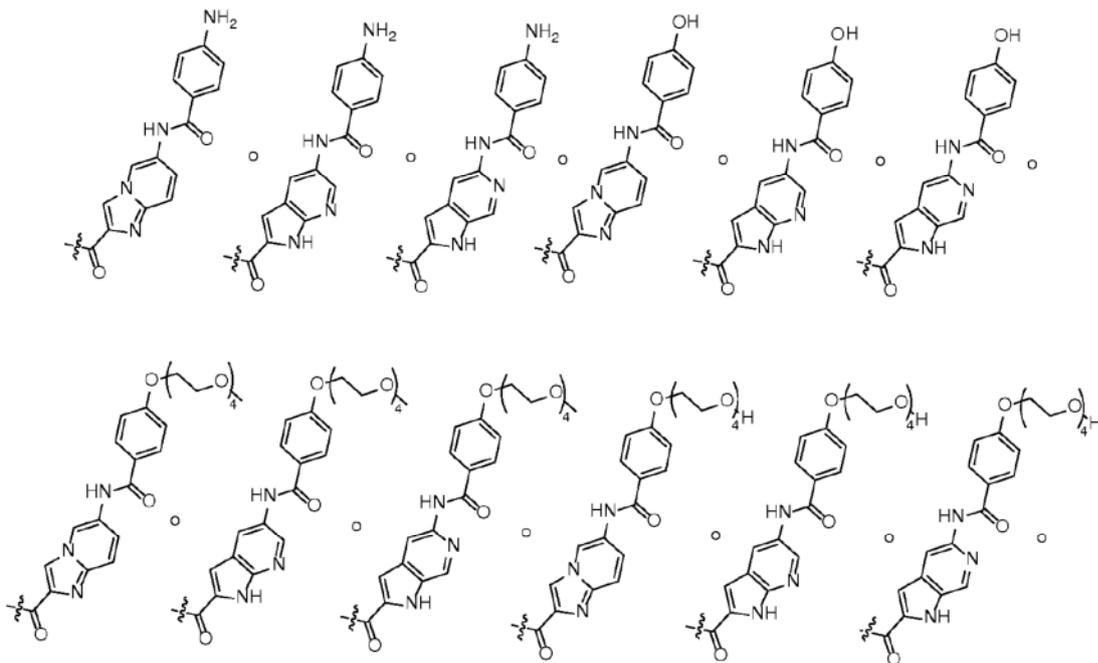
q varía de 1 a 4, y Ab es un anticuerpo según se especifica en las reivindicaciones.

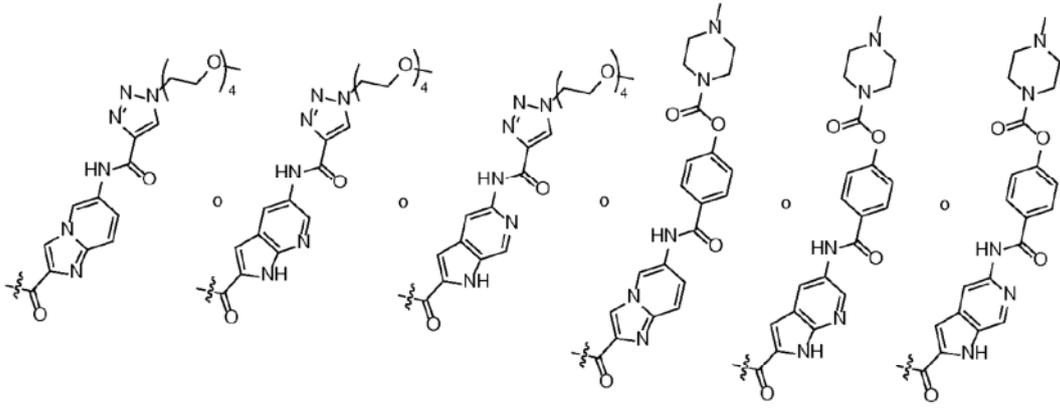
- 5 [0123] Se pueden prever formas de realización similares para los compuestos con la fórmula (IV) sustituyendo  $V^2-L^2$  por **RM** y eliminando los paréntesis con el subíndice q, o eliminando Ab-SH de las estructuras. Por lo tanto, los compuestos con la fórmula (IVa) están representados por las estructuras de los compuestos con la fórmula (IIIa), respectivamente, donde  $V^2-L^2$  se sustituye por **RM** y se eliminan los paréntesis con el subíndice q. En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (IV) está representado por

10

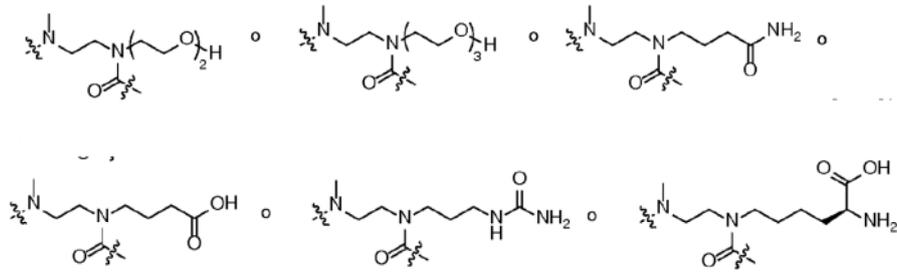


o por un isómero, o por una mezcla de isómeros, donde  $R^{5a}$  se selecciona de H, metilo y metoxi, **AZ** es

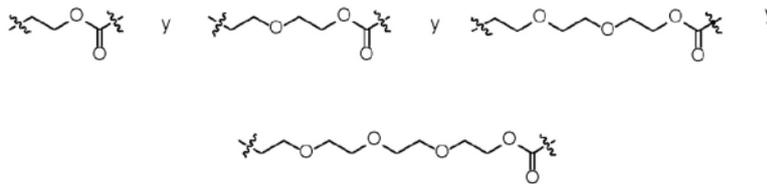




V<sup>1</sup> se selecciona de valilcitrulina, valil-lisina, fenilalanil-lisina, alanilfenilalanil-lisina y D-alanilfenilalanil-lisina, CL es

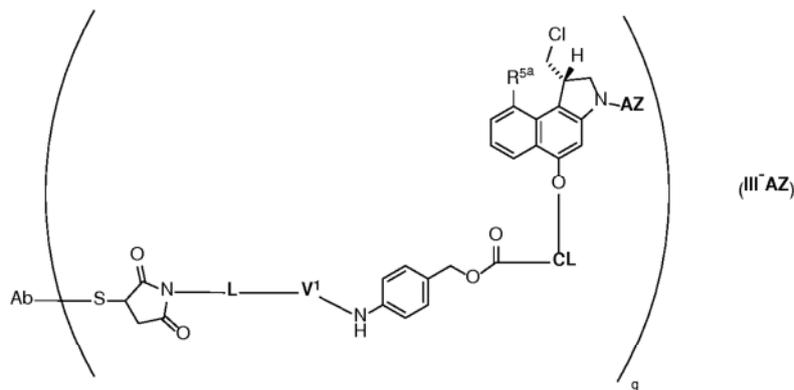


y L se selecciona de

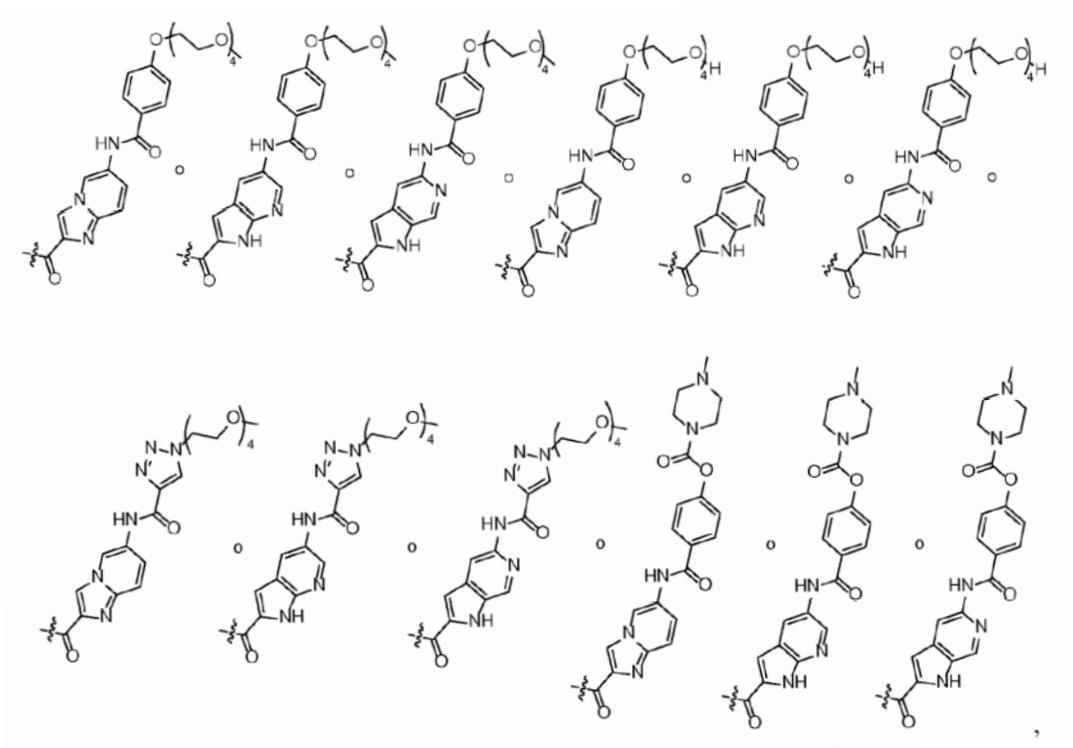
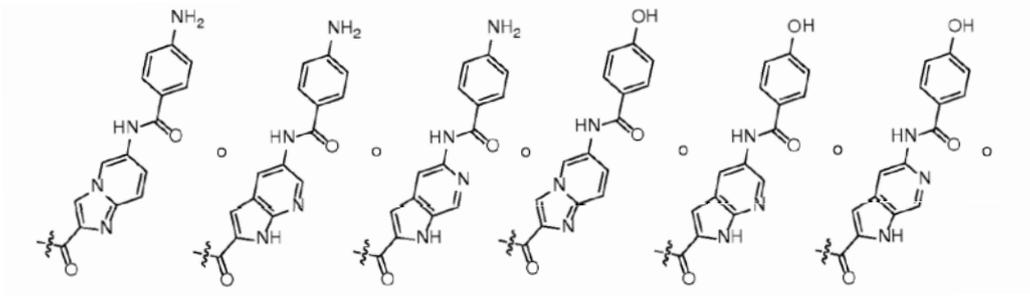


5

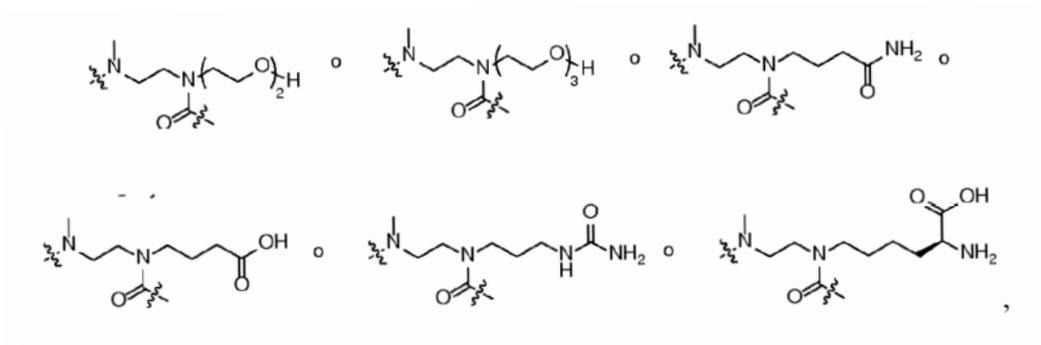
[0124] En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (III) está representado por



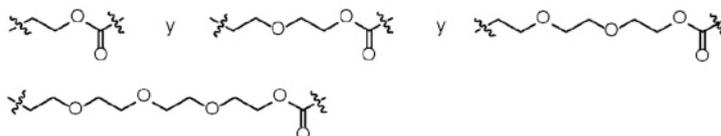
o por un isómero, o por una mezcla de isómeros, donde R<sup>5a</sup> se selecciona de H, metilo y metoxi, **AZ** es



**V<sup>1</sup>** se selecciona de valilcitrulina, valil-lisina, fenilalanil-lisina, alanilfenilalanil-lisina y D-alanilfenilalanil-lisina, **CL** es

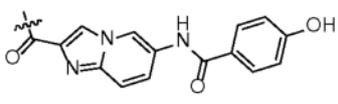


L se selecciona de



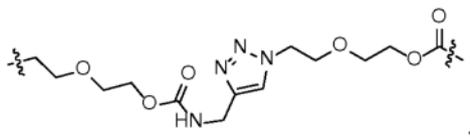
y q varía de 1 a 4, y Ab es un anticuerpo o un fragmento o derivado del mismo.

[0125] Una serie de compuestos (**III-AZ**) donde R<sup>5a</sup> es metilo, **AZ** es

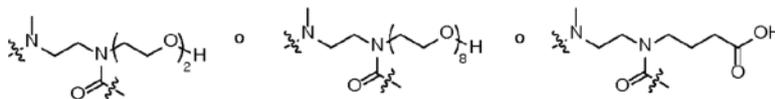


5

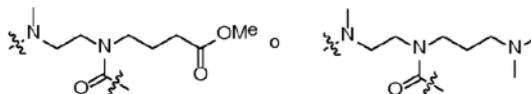
L es



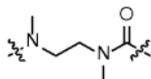
Ab es Trastuzumab, **V<sup>1</sup>** es valilcitrulina y **CL** es



10 o

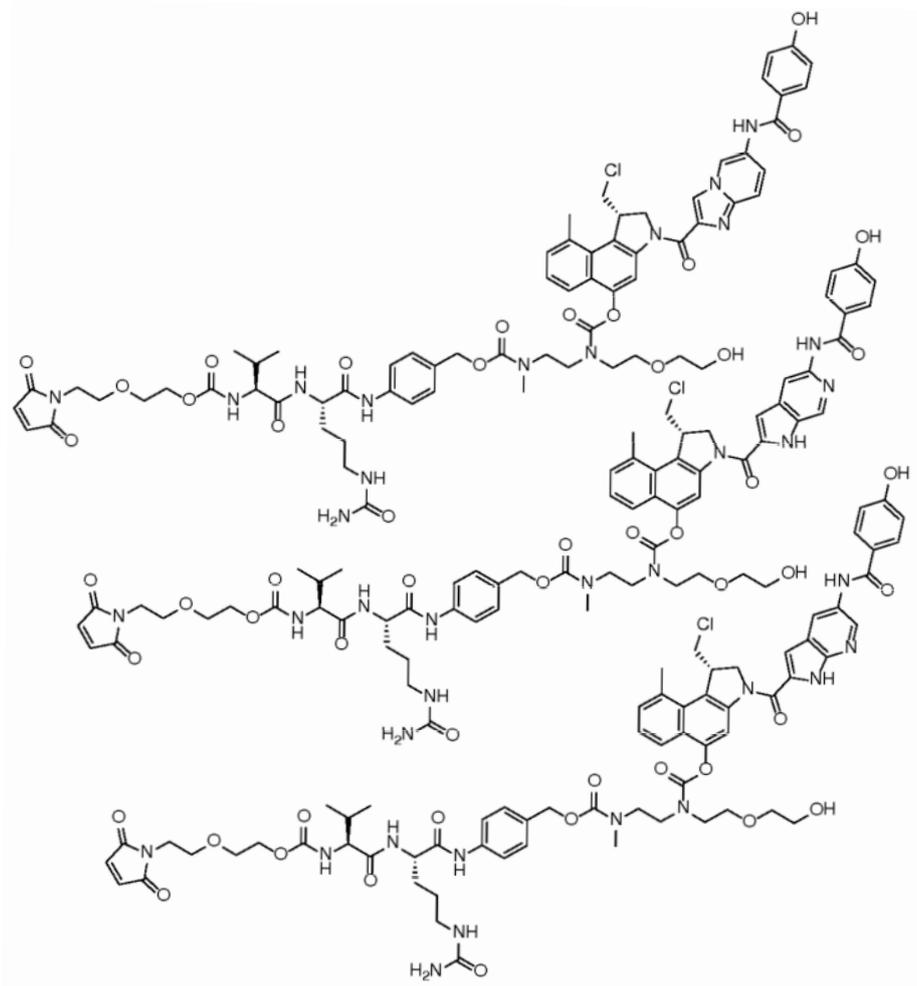


se prepararon según el procedimiento descrito en el ejemplo 15 y se evaluaron frente al compuesto de referencia correspondiente donde **CL** es

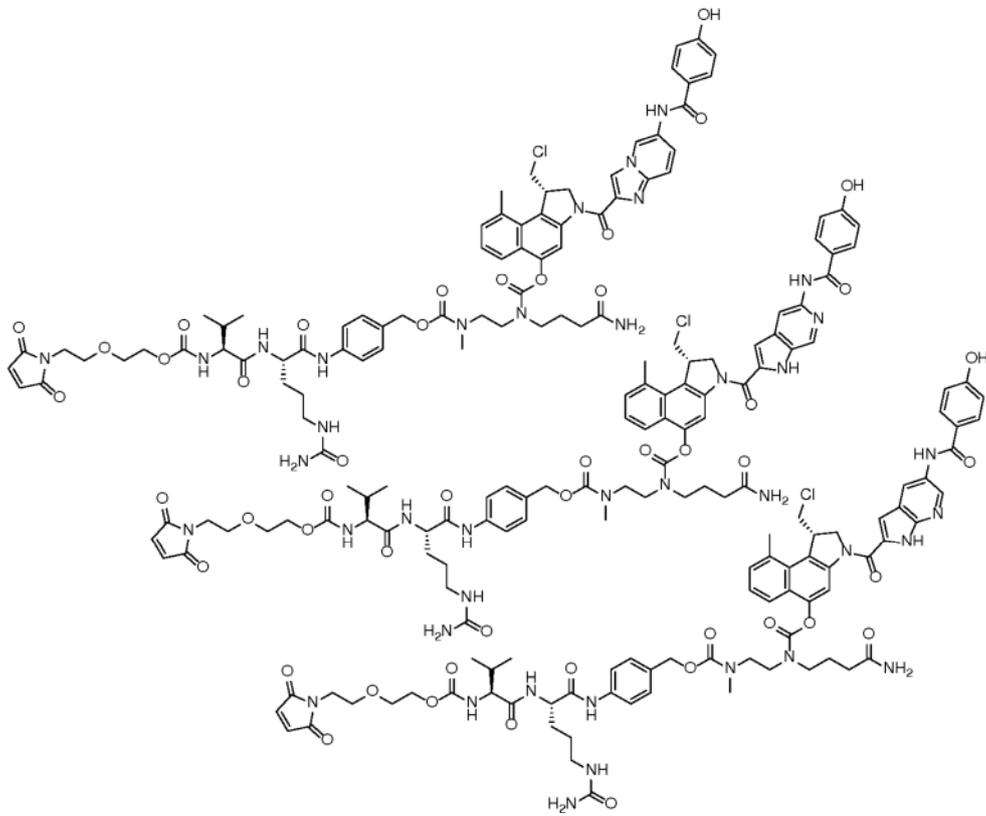


15 para determinar la cantidad de agregado presente después del paso de conjugación. Los compuestos evaluados tenían cantidades relativas de agregado de un 33%, 15%, 8%, 58% y 12%, respectivamente, en comparación con las del compuesto de referencia (100%), mostrando claramente la ventaja de los presentes separadores de ciclación.

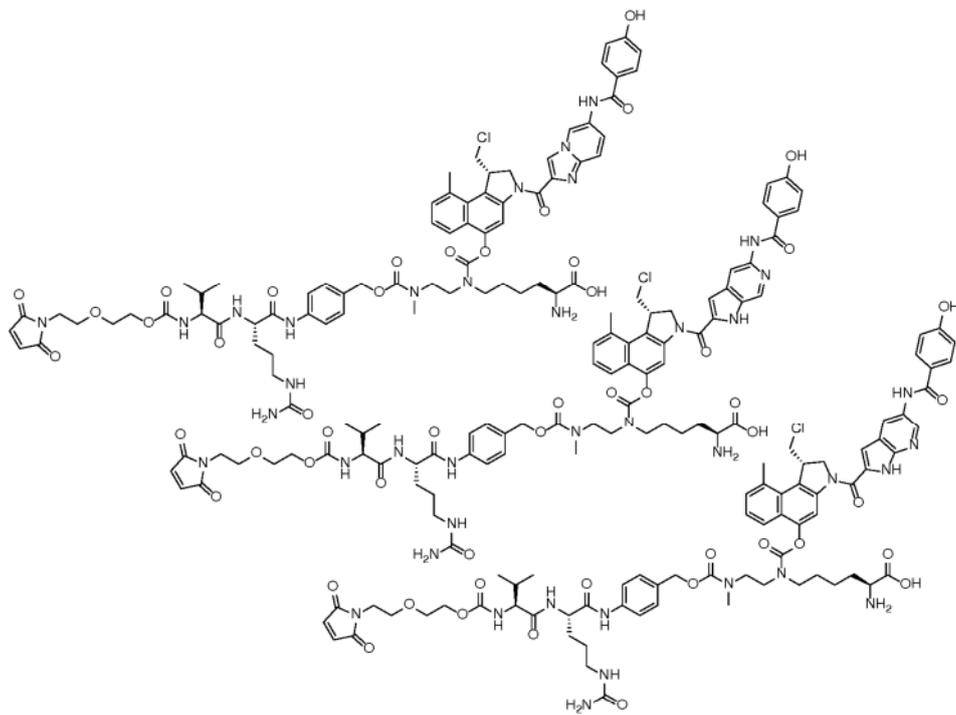
[0126] En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (**IV**) se selecciona de



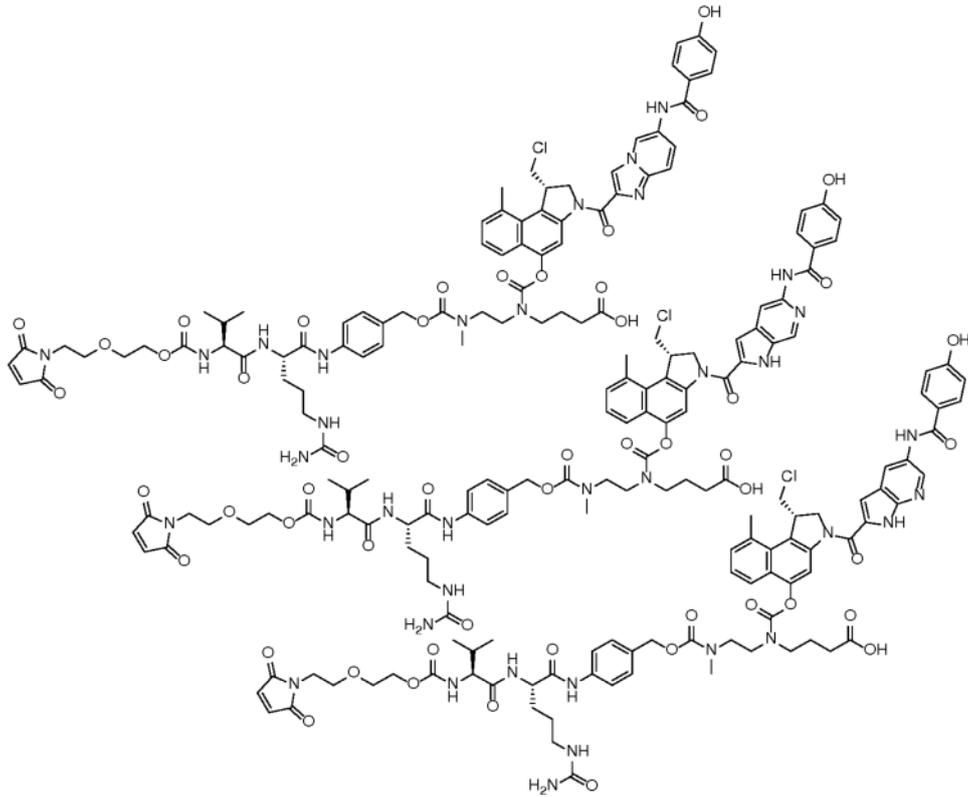
[0127] En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (IV) se selecciona de



[0128] En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (IV) se selecciona de



[0129] En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (IV) se selecciona de



[0130] En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (IV) se selecciona de



**Síntesis de compuestos de la invención**

5 [0132] Se pueden preparar convenientemente compuestos con las fórmulas (I), (III), (IV) y (VIII) de una manera en parte análoga a los compuestos proporcionados en las WO 01/83448, WO 02/083180, WO 2004/043493, WO 2007/018431, WO 2007/089149, WO 2009/017394 y WO2010/062171. Se pueden encontrar otros protocolos sintéticos representativos en los ejemplos.

10 [0133] En una forma de realización, un compuesto con la fórmula (I) se utiliza para preparar un compuesto con la fórmula (III). En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (I) se utiliza para preparar un compuesto con la fórmula (IV). En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (IV) se utiliza para preparar un compuesto con la fórmula (III). En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (III) donde  $V^1$  es un grupo protector se utiliza para preparar otro compuesto con la fórmula (III) donde  $V^1$  es una fracción escindible/transformable *in vivo*. En otra forma de realización, un compuesto con la fórmula (VIII) se utiliza para preparar un compuesto con la fórmula (IV). En otra forma de realización más, un compuesto con la fórmula (VIII) se utiliza para preparar un compuesto con la fórmula (III), opcionalmente a través de un compuesto con la fórmula (IV).

**Usos, métodos y composiciones**

15 [0134] En un aspecto, esta invención se refiere al uso de un compuesto con la fórmula (I) para la preparación de un compuesto con la fórmula (III).

[0135] En otro aspecto, esta invención se refiere al uso de un compuesto con la fórmula (IV) para la preparación de un compuesto con la fórmula (III).

20 [0136] En otro aspecto más, esta invención se refiere al uso de un compuesto con la fórmula (I) para la preparación de un compuesto con la fórmula (IV).

[0137] En otro aspecto más, esta invención se refiere al uso de un compuesto con la fórmula (VIII) para la preparación de un compuesto con la fórmula (IV).

[0138] En otro aspecto más, esta invención se refiere al uso de un compuesto con la fórmula (VIII) para la preparación de un compuesto con la fórmula (III), opcionalmente a través de un compuesto con la fórmula (III).

25 [0139] En otro aspecto más, esta invención se refiere al uso de un compuesto con la fórmula (VIII) para la preparación de conjugados y conjugados conector-agente similares a los compuestos con las fórmulas (III) y (IV) donde la fracción Z es una fracción terapéutica o diagnóstica diferente de un compuesto con la fórmula (I) o (I'), o un derivado de la misma que contiene una fracción moduladora.

30 [0140] En otro aspecto más, esta invención se refiere al uso de un compuesto con la fórmula (III) donde  $V^1$  es un grupo protector para la preparación de otro compuesto con la fórmula (III) donde  $V^1$  es una fracción escindible/transformable *in vivo*.

35 [0141] En otro aspecto más, la invención se refiere al uso de cualquiera de los compuestos definidos anteriormente para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de un mamífero que necesita de la misma. En una forma de realización, la invención se refiere al uso de cualquiera de los compuestos definidos anteriormente para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor en un mamífero. En otra forma de realización, la invención se refiere al uso de cualquiera de los compuestos definidos anteriormente para la producción de una composición farmacéutica para la prevención de un tumor en un mamífero. La invención puede también redactarse como cualquiera de los compuestos definidos anteriormente para usar en el tratamiento de un mamífero que necesita del mismo, o para usar en el tratamiento de un tumor en un mamífero o para usar en la prevención de un tumor en un mamífero.

40

[0142] La invención también se refiere a cualquiera de los compuestos definidos anteriormente como un medicamento o un componente activo o una sustancia activa en un medicamento.

[0143] En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que contiene un compuesto tal y como se ha definido anteriormente, para proporcionar una formulación sólida o una líquida para la administración por vía oral, tópica o por inyección. Tal método o proceso al menos comprende el paso de mezclar el compuesto con un portador farmacéuticamente aceptable.

5 [0144] En una forma de realización, un compuesto de la invención se usa para el tratamiento o la prevención de una enfermedad caracterizada por una proliferación no deseada. En otra forma de realización, un compuesto de la invención se usa para el tratamiento o la prevención de una enfermedad caracterizada por una proliferación celular no deseada. En otra forma de realización, un compuesto de la invención se usa para el tratamiento de un tumor. En otra forma de realización, un compuesto de la invención se usa para la prevención de un tumor. En otra forma de realización más, un compuesto de la invención se usa para el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria. En otra forma de realización más, un compuesto de la invención se usa para el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmune. En otra forma de realización, un compuesto de la invención se usa para el tratamiento o la prevención de una infección bacteriana, vírica o microbiana.

15 [0145] La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de la invención tal y como se ha definido anteriormente. Un compuesto de la invención se puede administrar en la forma purificada junto con un portador farmacéutico como una composición farmacéutica. La forma preferida depende del modo de administración y el uso terapéutico pretendidos. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible no tóxica adecuada para administrar los compuestos de la invención al paciente. Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas tales como agua o solución salina tamponada fisiológicamente u otros solventes o vehículos (estériles) tales como glicoles, glicerol, aceites tales como el aceite de oliva o ésteres orgánicos inyectables, alcohol, grasas, ceras y sólidos inertes. Un portador farmacéuticamente aceptable puede contener además compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar o para aumentar la absorción de los compuestos de la invención. Tales compuestos fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizadores o excipientes. Una persona experta en la materia sabría que la elección de un portador farmacéuticamente aceptable, incluido un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la vía de administración de la composición. Adyuvantes, agentes amortiguadores, agentes de dispersión y similares farmacéuticamente aceptables también se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas.

30 [0146] Para la administración oral, la sustancia activa se puede administrar en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, pastillas y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. El/Los componente(s) activo(s) se puede(n) encapsular en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y portadores en polvo, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato de magnesio y similares. Ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que se pueden añadir para proporcionar color, gusto, estabilidad, capacidad amortiguadora, dispersión deseables u otras características deseables conocidas son óxido de hierro rojo, gel de sílice, lauril sulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y similares. Se pueden usar diluyentes similares para hacer pastillas comprimidas. Tanto las pastillas como las cápsulas se pueden fabricar como productos de liberación prolongada para proporcionar una liberación continua de medicación durante un periodo de horas. Las pastillas comprimidas se pueden recubrir con azúcar o con una película para ocultar cualquier sabor desagradable y proteger la pastilla de la atmósfera, o con un recubrimiento entérico para la desintegración selectiva en el tracto gastrointestinal. Las formas de dosificación líquidas para la administración oral pueden contener coloración y saborizantes para aumentar la aceptación del paciente.

45 [0147] Sin embargo, los compuestos de la invención se administran preferiblemente por vía parenteral. Las preparaciones de los compuestos de la invención para la administración parenteral deben ser estériles. La esterilización se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, opcionalmente antes o después de la liofilización y la reconstitución. La vía parenteral para la administración de compuestos de la invención es acorde a métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial o intralesional. Los compuestos de la invención se pueden administrar de manera continua por infusión o por inyección en bolo. Una composición típica para la infusión intravenosa podría prepararse hasta contener de 100 a 500 ml de NaCl al 0,9% o glucosa al 5% estériles suplementados opcionalmente con una solución de 20% de albúmina y de 1 mg a 10 g del compuesto de la invención, dependiendo del tipo particular de compuesto de la invención y su régimen de dosificación requerido. Los métodos para preparar composiciones administrables parentalmente son bien conocidos en la técnica y se describen con más detalle en varias fuentes, incluyendo, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science<sup>10</sup>.

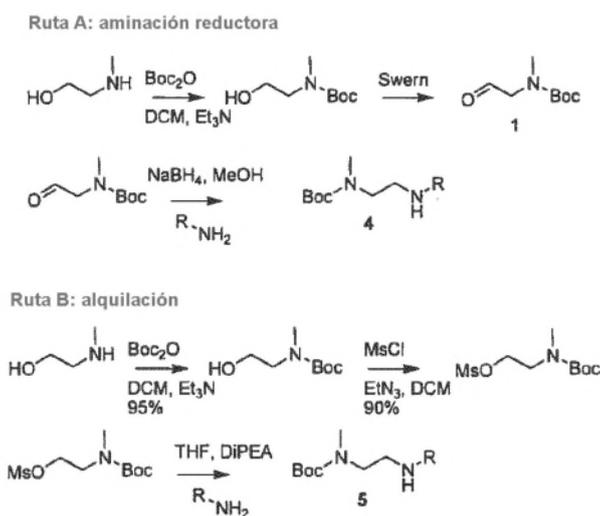
[0148] Un compuesto de la invención también se puede usar en una terapia combinatoria, donde un compuesto de esta invención se usa en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. La combinación de dos o más tratamientos puede afectar favorablemente a los resultados del tratamiento. Los agentes se pueden administrar o consecutiva o concomitantemente. Por lo tanto, en una forma de realización, esta invención se refiere al uso de un compuesto de esta invención o una composición farmacéutica que comprende un compuesto de esta invención en una terapia combinatoria.

[0149] La invención se ejemplifica adicionalmente en los ejemplos siguientes. Estos ejemplos son para uso ilustrativo. Los compuestos que no entran en las reivindicaciones no son parte de la presente invención.

## EJEMPLOS

### 10 Ejemplo 1: síntesis de separadores de ciclación protegidos con Boc

[0150]



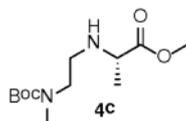
#### Vía A

15 [0151] **Síntesis del compuesto 1:** se disolvieron 7,5 ml (85 mmol) de cloruro de oxalilo en 200 ml de DCM y se enfriaron a  $T < -60\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 12,1 ml (171 mmol) de DMSO en 10 ml de DCM se añadieron gota a gota ( $T < -60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se agitó durante 10 min adicionales. Se añadieron 10,0 g (57 mmol) de N-Boc-N-metilaminoetanol en 40 ml de DCM gota a gota ( $T < -60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se agitó durante 10 min adicionales. Se añadieron 40 ml (285 mmol) de  $\text{Et}_3\text{N}$  gota a gota seguido de 50 ml de DCM ( $T < -60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se agitó durante 30 min. La mezcla reactiva se calentó a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se lavó con  $3 \times 100$  ml de agua, 100 ml de  $\text{KHSO}_4$  0,5 M, 75 ml de salmuera, se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se concentró al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , DCM/acetato de etilo, 1:0 a 9:1) para dar 7,36 g (74%) de compuesto 1.  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,42/1,46$  (s, 9H, Boc), 2,93/2,96 (s, 3H, Me), 3,90/4,01 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 9,60 (s, 1H, CHO). Isómeros Z/E.

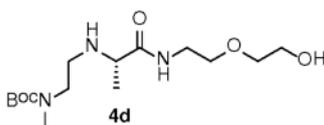
25 [0152] **Procedimiento general de aminación reductora:** se agitaron 1 mmol de R-amina y 1 mmol de compuesto 1 en 10 ml de MeOH durante 4 h. La mezcla reactiva se enfrió en hielo y se añadieron 2 mmol de borohidruro de sodio en partes y la mezcla se agitó a RT durante toda la noche. La mezcla se concentró y se purificó por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MeOH, 1:0 a 1:1) para dar N-Boc-N-Metil-N'-R-diaminoetano.

30 [0153] **Compuesto 4a, R =  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{H}$ :** rendimiento del 40%,  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,46$  (9 H, s, Boc), 2,75 - 2,87 (4 H, m, 2 x  $\text{CH}_2$ ), 2,88 (3 H, s, MMe), 3,35 (2 H, t,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,56 - 3,63 (4H, m, 2 x  $\text{CH}_2$ , CH), 3,70 - 3,75 (2H, m,  $\text{CH}_2$ , CH); MS (ESI)  $m/z = 263,5$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

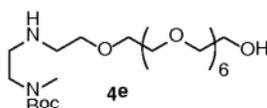
[0154] **Compuesto 4b**, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOMe: rendimiento del 61%, <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,46 (9 H, s, Boc), 1,83 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,39 (2H, t, J = 7,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,64 - 2,86 (3 H, m, CH/CH<sub>2</sub>), 2,88 (3 H, s, MMe), 2,99 (1H, m, CH), 3,30 - 3,49 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3,67 (3H, s, CH<sub>3</sub>); MS (ESI) m/z = 275,5 (M+H<sup>+</sup>).



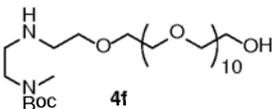
5 [0155] **Compuesto 4c**: <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,15 (3H, d, J = 6,9 Hz, CH<sub>3</sub> Ala), 1,38 (9H, s, Boc), 2,57 - 2,67 (1H, m, α-H), 2,76 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 3,08 - 3,36 (4H, m, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3,63 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); MS (ESI): m/z = 261,3 (M+H<sup>+</sup>).



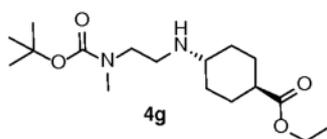
10 [0156] **Compuesto 4d**: <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,12 (3H, d, J = 6,9 Hz, CH<sub>3</sub> Ala), 1,39 (9H, s, Boc), 2,54 - 2,61 (1H, m, α-H), 2,77 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 3,10 - 3,51 (13H, m, 6 x CH<sub>2</sub> + OH), 7,90 (1H, s, NH amida); MS (ESI): m/z = 334,4 (M+H<sup>+</sup>).



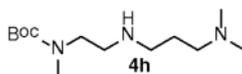
[0157] **Compuesto 4e**: rendimiento del 27%, <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,44 (9H, s, Boc), 2,72 - 2,85 (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>), 2,81 (3H, s, MeN), 3,31 (2H, m, NCH<sub>2</sub>), 3,5 - 3,7 (32H, m, 15 x CH<sub>2</sub> + OH + NH); MS (ESI): m/z = 527,4 (M+H<sup>+</sup>).



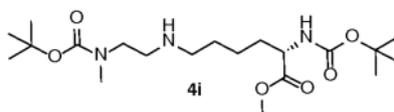
15 [0158] **Compuesto 4f**: rendimiento del 30%, <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,44 (9H, s, Boc), 2,65 - 2,79 (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>), 2,80 (3H, s, MeN), 3,26 (2H, m, NCH<sub>2</sub>), 3,5 - 3,7 (48H, m, 23 x CH<sub>2</sub> + OH + NH); MS (ESI): m/z 703,5 (M+H<sup>+</sup>).



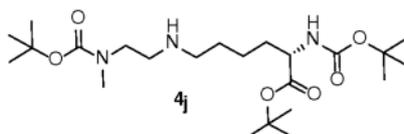
20 [0159] **Compuesto 4g**: <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,14 (5H, m, 2 CH y CH<sub>3</sub>), 1,35 (9H, s, Boc), 1,47 (4H, m, 4 CH), 1,74 - 2,38 (4H, m, 4 CH), 2,59 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,75 (3H, s, NCH<sub>3</sub>), 3,16 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3,99 (2H, m, CH<sub>2</sub>); MS (ESI): m/z = 329,4 (M+H<sup>+</sup>).



[0160] **Compuesto 4h**: rendimiento del 63%, <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,46 (9H, s, Boc), 1,69 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,24 (6H, s, Me<sub>2</sub>), 2,36 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,52 (1H, m, NH), 2,72 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,80 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,88 (3H, s, MeN), 3,37 (2H, m, CH<sub>2</sub>); MS (ESI) m/z = 260,2 (M+H<sup>+</sup>).

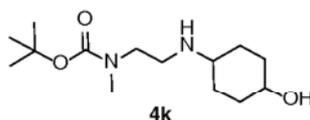


[0161] **Compuesto 4i:**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 1,30 - 1,36$  (4H, m, 2  $\text{CH}_2$  Lys), 1,35 (18H, 2 s, 2 Boc), 1,53 (2H, m,  $\text{CH}_2$  Lys), 2,46 (2H, m,  $\text{CH}_2$  Lys), 2,56 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 2,75 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ ), 3,13 (3H, m,  $\text{CH}_2$  y  $\alpha\text{-H}$  Lys), 3,58 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ); MS (ESI):  $m/z = 481,4$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).



5

[0162] **Compuesto 4j:**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 1,36$  (31H, m, 1 tBu, 2 Boc y 2  $\text{CH}_2$  Lys), 1,53 (2H, m,  $\text{CH}_2$  Lys), 2,46 (2H, m,  $\text{CH}_2$  Lys), 2,56 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 2,75 (3H, s,  $\text{NCH}_3$ ), 3,14 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ) 3,64 (1H, m,  $\alpha\text{-H}$  Lys), 7,01 (d, 1H, NH); MS (ESI):  $m/z = 460,3$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

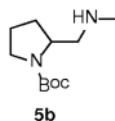


10 [0163] **Compuesto 4k:**  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1,15$  (2H, m), 1,30 (2H, m), 1,94 (4H, m), 2,46 (1H, m), 2,76 (2H, t,  $J = 6,8$  Hz), 2,87 (3H, s), 3,30 (2H, t,  $J = 6,8$  Hz), 3,60 (1H, m); MS (ESI):  $m/z = 273,3$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

### Vía B

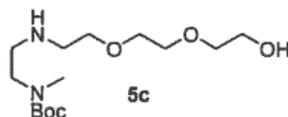
15 [0164] **Procedimiento general de reacción de alquilación:** a una solución de 1 mmol de R-amina y 1 mmol de mesilato en THF seco (1,5 ml) se añadió  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,5 mmol) y la mezcla se agitó a  $60^\circ\text{C}$  durante toda la noche. La mezcla se enfrió a RT, se concentró y se purificó por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{DCM}/\text{MeOH}$ , 1:0 a 1:1) para dar el N-Boc-N-Metil-N'-R-diaminoetano.

[0165] **Compuesto 5a, R = isopropilo:**  $^1\text{H RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1,05 (6 H, d, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 1,46 (9 H, s, Boc), 2,75 (2 H, t,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2,82 (1 H, t,  $J = 6,6$  Hz, CH), 2,87 (3 H, s, MMe), 3,31 (2 H, t,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); MS (ESI)  $m/z = 217,2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).



20

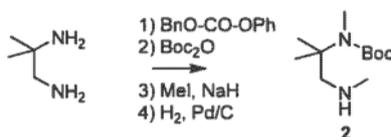
[0166] **Compuesto 5b:** partiendo de N-Boc-prolinol<sup>11</sup> se preparó el compuesto **5b** según la vía B. MS (ESI)  $m/z = 215,2$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).



25 [0167] **Compuesto 5c:**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 1,39$  (9H, s, Boc), 2,73 - 2,85 (7H, m,  $\text{NCH}_3$ + 2 x  $\text{CH}_2$ ), 3,24 - 3,30 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3,39 - 3,55 (11H, m, 5 x  $\text{CH}_2$  + OH).

Ejemplo 2: síntesis del compuesto 2

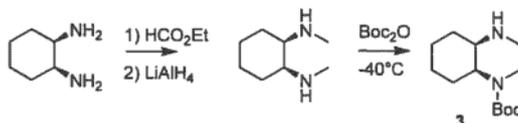
[0168]



5 [0169] Se disolvieron 2,28 g (10 mmol) de fenilcarbonato de bencilo en 20 ml de etanol y se añadieron 1,03 ml (10 mmol) de 1,2-diamino-1-metilpropano gota a gota y se agitó a RT durante toda la noche. La mezcla se diluyó con 25 ml de agua y se acidificó con HCl 1M hasta pH < 3 y se extrajo con DCM. La fase acuosa se basificó con NaOH 4M y se extrajo con DCM. El extracto se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. Esto dio 1,93 g (87%) de diamina monoprotectada. Este material se disolvió en 25 ml de dioxano, se añadieron 2,028 g (10,5 mmol) de Boc<sub>2</sub>O y 0,12 g (1 mmol) de DMAP y la reacción se agitó a RT durante toda la noche. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, éter/heptano, 1:0 a 7:3) para dar 1,13 g (40%) de diamina biprotectada. La diamina biprotectada se disolvió en 10 ml de DMF seco, se añadieron 1,1 ml (17,5 mmol) de yodometano y la mezcla reactiva se enfrió en hielo. Se añadieron 0,50 g (10,5 mmol) de hidruro de sodio (60% en aceite) en partes y se agitó en hielo durante 2 h. La mezcla se calentó a RT, se desactivó con 10 ml de NH<sub>4</sub>Cl saturado y 50 ml de agua, se extrajo con acetato de etilo, se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, DCM/acetato de etilo, 1:0 a 50:1) para dar 0,358 g (29%) de compuesto 2 protegido por Cbz. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,29 (s, 3H, Me), 1,35 (s, 3H, Me), 1,46 (s, 9H, Boc), 2,82/2,86 (s, 3H, Me, Z/E), 2,93 (s, 3H, Me), 3,72 (s, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5,12 (s, 2H, bencilo), 7,35 (m, 5H, Phe). Este material se disolvió en 20 ml de metanol, se añadieron 0,04 g de Pd/C, la mezcla se agitó bajo hidrógeno durante 3 h, se filtró y el filtrado se concentró. Esto dio 0,21 g (100%) de compuesto 2. MS (ESI): m/z = 217,2 (M+H<sup>+</sup>).

20 Ejemplo 3: síntesis del compuesto 3

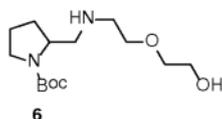
[0170]



25 [0171] Se disolvieron 2,15 g (18,8 mmol) de cis-1,2-diaminociclohexano en 20 ml de formiato etílico y se mantuvo a reflujo durante toda la noche. La suspensión se enfrió, se filtró y se secó al vacío para dar 2,59 g (80%) de producto. El sólido se añadió en partes a una mezcla enfriada de 2,1 g (53 mmol) de hidruro de aluminio y litio en 50 ml de THF y la mezcla se agitó a RT durante 1h y luego se mantuvo a reflujo durante toda la noche. La solución clara se enfrió en hielo y se desactivó por adición gota a gota de 2,1 ml de agua seguido de 15 ml de NaOH al 20%. La suspensión se calentó brevemente hasta que las sales se volvieron blancas. La mezcla se enfrió a RT y se filtró. El residuo se lavó con 2 partes de 50 ml de THF. El filtrado se concentró y se disolvió en 50 ml de DCM y se lavó con 20 ml de NaOH 4M. La fase acuosa se extrajo con 25 ml de DCM, se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para dar 1,94 g (89%) de producto. El producto bruto se disolvió en 50 ml de DCM y la mezcla se enfrió a -40 °C y se añadieron 2,95 g (13,5 mmol) de Boc<sub>2</sub>O en 10 ml de DCM gota a gota. La mezcla se calentó lentamente a RT y se lavó con 20 ml de NaOH 2M, se secó con MgSO<sub>4</sub>, se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 1:0 a 9:1) para dar 2,09 g (63%) de compuesto 3. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,38 (m, 6H, ciclohex), 1,46 (s, 9H, Boc), 1,83 (m, 3H, ciclohex + NH), 2,35 (s, 3H, NMe), 2,89 (s, 3H, NMe), 2,95 (m, 1H, CHN), 3,86 (m, 1H, CHN); MS (ESI): m/z = 243,2 (M+H<sup>+</sup>).

Ejemplo 4: síntesis del compuesto 6

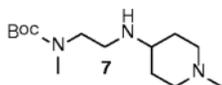
[0172]



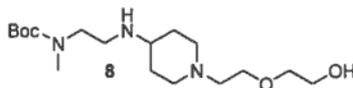
- 5 [0173] A una solución de 2,55 mmol *N*-Boc-prolinal en THF seco (5 ml) bajo una atmósfera de argón se añadieron 0,7 ml de ácido acético glacial y 272 mg de 2-(2-aminoetoxi)etanol (2,58 mmol). La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Se añadieron 2,59 mmol de borohidruro de sodio por partes, y la mezcla se agitó durante otras 4 h después de lo cual se añadió agua. La mezcla se lavó con acetato de etilo, la capa acuosa se basificó hasta pH 10 usando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se extrajo con acetato de etilo (9x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con MgSO<sub>4</sub> y se concentraron al vacío para dar 335 mg (46%) de **6** bruto, que se usó sin una purificación adicional. MS (ESI): *m/z* = 289 (M+H<sup>+</sup>).

#### Ejemplo 5: síntesis de los compuestos **7** y **8**

- 10 [0174]



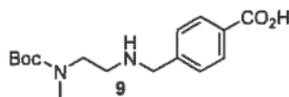
- 15 [0175] Se hicieron reaccionar 0,17 g (1,5 mmol) de *N*-metilpiperid-4-ona y 0,178 g (1,0 mmol) de *N*-Boc-*N*-metil-1,2-diaminoetano con 0,42 g (2,0 mmol) de triacetoxiborohidruro de sodio en 5 ml de DCE a RT durante toda la noche. La reacción se desactivó con MeOH y la mezcla se extrajo con DCM y salmuera (basificada a pH > 12), se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para dar 0,31 g (100%) de **7** como un aceite. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,38 (2, m, CH<sub>2</sub>), 1,45 (9H, s, Boc), 1,76 (1H, br s, NH), 1,85 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,00 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,27 (3H, s, MeN), 2,46 (1H, m, CH), 2,76 (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>), 2,86 (3H, s, MeN), 3,30 (2H, t, CH<sub>2</sub>); MS (ESI) *m/z* = 272,2 (M+H<sup>+</sup>).



- 20 [0176] El compuesto **8** se preparó de forma similar al compuesto **7** usando 0,75 g (4,0 mmol) de *N*-hidroxietoxietil-4-piperidina. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 1:0 a 95:5) para dar 0,83 g (66%) de **8** como un aceite. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,46 (9H, s, Boc), 1,89 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1,91 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,50 (3H, m, CH + OH + NH), 2,57 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,77 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,87 (3H, s, MeN), 2,94 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3,30 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 3,64 (6H, m, 3xCH<sub>2</sub>O); MS (ESI) *m/z* = 346,3 (M+H<sup>+</sup>).

#### Ejemplo 6: síntesis del compuesto **9**

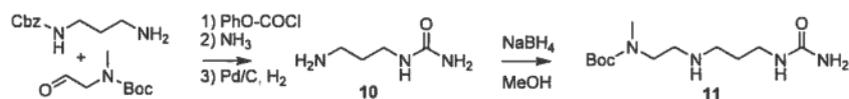
- 25 [0177]



- 30 [0178] Se hicieron reaccionar 0,18 g (1,0 mmol) de *N*-Boc-*N*-metil-1,2-diaminoetano y 0,15 g (1,0 mmol) de ácido 4-formilbenzoico según el procedimiento general A del ejemplo 1 para dar 0,34 g (90%) de **9** (sal de HCl). <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2,89 (3H, s, MeN), 3,11 (2H, m, CH<sub>2</sub>N), 3,57 (2H, t, CH<sub>2</sub>N), 4,25 (2H, m, CH<sub>2</sub>N), 7,33 (2H, d, ArH), 8,02 (2H, d, ArH), 9,03 (2H, br s, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 13,03 (1H, s, CO<sub>2</sub>H); MS (ESI) *m/z* = 309,2 (M+H<sup>+</sup>).

#### Ejemplo 7: síntesis del compuesto **11**

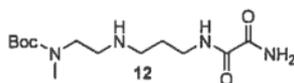
- [0179]



[0180] Se disolvieron 1,84 g (7,5 mmol) de hidrocloreto de *N*-Cbz-1,3-diamina y 3 ml de Et<sub>3</sub>N en 50 ml de DCM, se enfriaron en hielo y se añadieron gota a gota 0,94 ml de cloroformiato de fenilo disueltos en 5 ml de DCM. La mezcla se agitó a 0 °C durante 2 h y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 50 ml de DCM, se lavó con 25 ml de KHSO<sub>4</sub> 0,5 M, se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 25 ml de EtOH, se añadieron 4 ml de amoníaco concentrado y la mezcla se agitó durante 3 h. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se disolvió en 25 ml de CHCl<sub>3</sub>, se lavó con 10 ml de NaOH 4 M y salmuera, se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró al vacío para dar 1,9 g de producto intermedio. Este material se disolvió en 50 ml de MeOH, se añadió 0,1 g de Pd/C y la mezcla reactiva se agitó bajo hidrógeno durante 5 h. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró al vacío para dar 0,87 g (95%) de compuesto 10. Se hicieron reaccionar 0,26 g (1,7 mmol) de esta amina según el procedimiento general A para dar 0,17 g (36%) de **11** como un aceite. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1,39 (9H, s, Boc), 1,45 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,48 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,58 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2,78 (3H, s, MeN), 2,97 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3,18 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 5,35 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 5,87 (1H, t, NH); MS (ESI) *m/z* = 275,2 (M+H<sup>+</sup>).

#### Ejemplo 8: síntesis del compuesto **12**

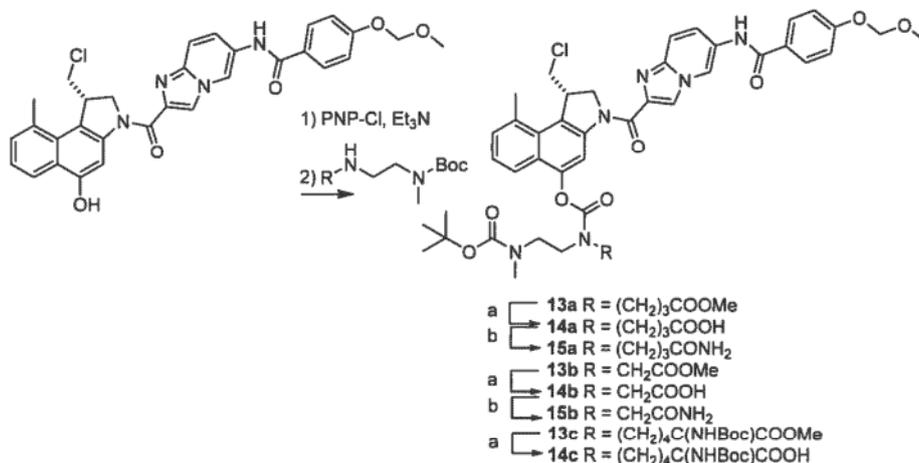
15 [0181]



[0182] Se disolvieron 0,98 g (4,0 mmol) de hidrocloreto de *N*-Cbz-1,3-diamina y 3 ml de Et<sub>3</sub>N en 15 ml de DCM y se añadió gota a gota a 1,65 ml (12 mmol) de oxalato de dietilo en 15 ml de etanol. La mezcla se agitó a RT durante toda la noche, se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 1:0 a 95:5) para dar la mono-oxalamida. Este material se disolvió en 15 ml de etanol y se añadieron 5 ml de amoníaco concentrado y la mezcla se agitó a RT durante toda la noche. La mezcla se diluyó con 50 ml de MeOH y se añadieron 100 mg de Pd/C. La mezcla se agitó bajo atmósfera de hidrógeno durante 3 h. Se añadieron 10 ml de agua, la mezcla se filtró sobre celita y el filtrado se concentró al vacío para dar 0,57 g (94%) de sólido blanco. Esto se hizo reaccionar según el procedimiento general A del ejemplo 1 para dar 0,45 g (38%) de **12** como un sólido blanco. <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,45 (9H, s, Boc), 1,80 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,80 (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>), 2,89 (3H, s, MeN), 3,39 (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>), 6,85 (1H, s, NH), 7,40 (1H, s, NH), 8,39 (1H, t, NH); MS (ESI) *m/z* = 303,2 (M+H<sup>+</sup>).

#### Ejemplo 9: síntesis de los compuestos **14a-b** y **15a-b**

[0183]

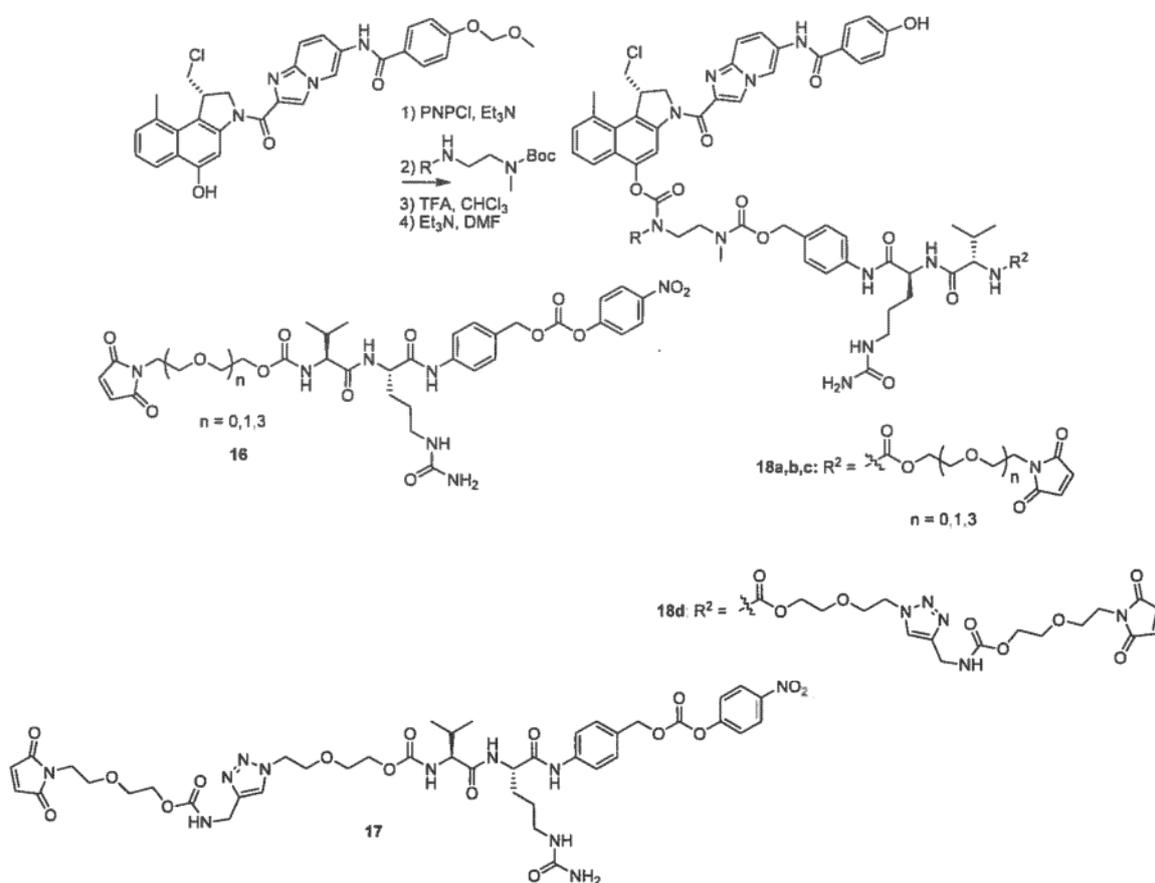


[0184] **Compuesto 14c**: el compuesto **13c** (0,51 mmol) se disolvió en THF (12 ml); se añadieron LiOH (1,02 mmol) y agua (1 ml) y la mezcla reactiva se agitó durante 4 h. Luego, la mezcla fue acidificado con HCl acuoso (1M, 1,5 ml), concentrado, se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 1:0 a 9:1) para producir el compuesto **14c** (0,41 mmol).

- 5 [0185] **Compuesto 15a**: el compuesto **14a** (0,11 mmol) se disolvió en dioxano (2 ml); se añadieron piridina (0,07 mmol) y Boc<sub>2</sub>O (0,14 mmol) seguidos de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (0,14 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 8 h. Después, la mezcla se concentró y se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 1:0 a 9:1) para producir el compuesto **15a** (0,06 mmol).

#### Ejemplo 10: síntesis de conjugados conector-agente

- 10 [0186]



- 15 [0187] **Procedimiento general para el acoplamiento del separador de ciclación al fármaco protegido activado (paso 2)**: se disolvieron 0,2 mmol de fármaco protegido activado, 0,6 mmol de separador monoprotectado y 0,02 mmol de HOBt en 2 ml de DMF, se añadió 1 mmol de Et<sub>3</sub>N y la mezcla se calentó a 50 °C durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH) para dar el separador de ciclación-fármaco.

- 20 [0188] **Procedimiento general para el acoplamiento del conector al producto intermedio separador de ciclación-fármaco (pasos 3 y 4)**: se suspendieron 0,1 mmol de separador de ciclación-fármaco en 6 ml de CHCl<sub>3</sub>, la mezcla reactiva se enfrió en hielo y se añadieron 2 ml de TFA y la mezcla se agitó durante 3 h. La mezcla se concentró luego al vacío. El residuo se disolvió en 4 ml de DMF, la solución se enfrió en hielo y se añadieron 0,13 mmol de conector activado (**16** o **17**) y 1 mmol de Et<sub>3</sub>N. La mezcla se agitó durante 2 h, se concentró al vacío y el residuo se purificó por

cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, DCM/MeOH, 1:0 a 8:2) hasta un aceite que se purificó adicionalmente por HPLC de fase reversa preparatoria (acetonitrilo/agua + TFA al 0,1%) y se liofilizó para dar la construcción **18** como un sólido amarillo pálido.

- 5 [0189] **Compuesto 18b, R = Me:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,84 (6H, dd, *J* = 6,4 Hz, 2 x CH<sub>3</sub> Val), 1,32 - 1,47 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cit), 1,52 - 1,71 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cit), 1,91 - 1,99 (1H, m, β-H Val), 2,81 - 3,03 (11H, m, 3 x CH<sub>3</sub>+ NCH<sub>2</sub>), 4,36 - 4,43 (1H, m, H-2), 4,45 - 4,51 (1H, m, α-H), 4,63 - 4,41 (1H, m, H-2), 4,97 - 5,08 (3H, m, CH<sub>2</sub> PABA + H-1), 5,97 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-3"), 7,01 (2H, s, CH=CH), 7,14 - 7,59 (7H, m, ArH + 2 x NH), 7,67 - 7,80 (3H, m, ArH), 7,91 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-2"), 8,06 (1H, br s, H-6), 8,33 (H, br s, H-4), 8,81 (1H, s, H-3'), 9,55 (1H, s, H-4'), 9,99 (1H, s, NH), 10,20 (1H, s, NH), 10,28 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z*= 1257,3 (M+H<sup>+</sup>).
- 10 [0190] **Compuesto 18c, R = Me:** <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,84 (6H, dd, Val), 1,28 - 1,73 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cit), 1,95 (1H, m, βHVal), 2,85 (3H, s, MeAr), 2,94 (3H, s, MeN), 2,87 - 3,05 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>NMe), 4,05 (2H, t, CH<sub>2</sub>O), 4,40 (1H, m, H-1), 4,48 (1H, s, CH), 4,67 (1H, m, H-2), 5,05 (3H, m, CH<sub>2</sub>O, H-2), 5,40 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 5,96 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, H-3"), 7,01 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,7 (10H, m, ArH + NH), 7,91 (2H, d, H-2"), 8,05 (1H, s, H-6), 8,33 (1H, br s, H-4), 8,77 (1H, s, H-3'), 9,52 (1H, s, H-4'), 10,0 (1H, s, NH), 10,19 (1H, s, NH), 10,25 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z*= 1345,7 (M+H<sup>+</sup>).
- 15 [0191] **Compuesto 18b, R = (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>H:** <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ (ppm): δ = 0,84 (6H, dd, Val), 1,28 - 1,73 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cit), 1,96 (1H, m, βHVal), 2,85 (3H, s, MeAr), 2,95 (3H, s, MeN), 2,87 - 3,05 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>NMe), 4,00 (2H, t, CH<sub>2</sub>O), 4,35 (1H, m, H-1), 4,48 (1H, m, CH), 4,67 (1H, m, H-2), 4,93 - 5,11 (4H, m, CH<sub>2</sub>O, H-2, CH), 5,40 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 5,97 (1H, br s, NH), 6,91 (2H, d, H-3"), 7,01 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,7 (10H, m, ArH + NH), 7,91 (2H, d, H-2"), 8,06 (1H, d, H-6), 8,33 (1H, br s, H-4), 8,80 (1H, s, H-3'), 9,54 (1H, s, H-4'), 10,01 (1H, s, NH), 10,20 (1H, s, NH), 10,27 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z*= 1331,7.
- 20 [0192] **Compuesto 18c, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C(NH<sub>2</sub>)COOH:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,84 (6H, dd, *J* = 6,4 Hz, 2 x CH<sub>3</sub> Val), 1,29 - 1,98 (11H, m, 3 x CH<sub>2</sub> Lys + 2 x CH<sub>2</sub> Cit + β-H Val), 2,82 - 3,04 (8H, m, 2 x CH<sub>3</sub>+ NCH<sub>2</sub>), 4,35 - 4,42 (1H, m, H-1), 4,45 - 4,51 (1H, m, α-H), 4,63 - 4,70 (1H, m, H-2), 4,95 - 5,07 (2H, m, CH<sub>2</sub> PABA), 5,09 - 5,16 (1H, m, H-2), 5,99 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-3"), 7,01 (2H, s, CH=CH), 7,16 - 7,77 (11H, m, ArH + 3 x NH), 7,90 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-2"), 8,05 - 8,09 (1H, m, H-6), 8,19 (3H, br s, NH<sub>2</sub> Lys + OH), 8,31 - 8,37 (1H, m, H-4), 8,75 (1H, br s, H-3'), 9,53 (1H, br s, H-4'), 10,00 (1H, br s, NH), 10,16 - 10,26 (2H, m, NH + OH); MS (ESI): *m/z*= 1460,7 (M+H<sup>+</sup>).
- 25 [0193] **Compuesto 18d, R = (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>H:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,84 (6H, dd, Val, *J* = 6,8), 1,30 - 1,46 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cit), 1,52 - 1,70 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cit), 1,91 - 1,99 (1H, m, β-H Val), 2,80 - 3,05 (10H, m, ArCH<sub>3</sub>+ NCH<sub>3</sub>+ 2 x NCH<sub>2</sub>), 3,97 - 4,06 (5H, m, 2 x CH<sub>2</sub>O + H-2), 4,20 (2H, d, *J* = 5,6 Hz, NCH<sub>2</sub>-triazol), 4,36 - 4,43 (1H, m, H-1), 4,44 - 4,52 (3H, m, CH<sub>2</sub>-triazol + α-H), 4,63 - 4,71 (1H, m, H-2), 4,94 - 5,09 (3H, m, CH<sub>2</sub> PABA + H-2), 5,98 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-3"), 6,99 (2H, s, CH=CH), 7,16 - 7,81 (11H, m, ArH + NH), 7,87 (1H, s, triazol-H), 7,91 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-2"), 8,05 - 8,09 (1H, m, H-6), 8,33 (H, m, H-4), 8,83 (1H, s, H-3'), 9,55 (1H, s, H-4'), 10 - 00 (1H, s, NH), 10,20 (1H, s, NH), 10,28 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z*= 1543,7 (M+H<sup>+</sup>).
- 30 [0194] **Compuesto 18c, R = (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>H:** <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>), δ = 0,84 (6H, dd, Val), 1,28 - 1,73 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cit), 1,96 (1H, m, βHVal), 2,85 (3H, s, MeAr), 2,94 (3H, s, MeN), 2,87 - 3,05 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>NMe), 4,05 (2H, t, CH<sub>2</sub>O), 4,40 (1H, m, H-1), 4,48 (1H, m, CH), 4,67 (1H, m, H-2), 4,93 - 5,16 (4H, m, CH<sub>2</sub>O, CH, H-2), 5,40 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 5,96 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, H-3"), 7,01 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,8 (11H, m, ArH + 3xNH), 7,90 (2H, d, H-2"), 8,05 (1H, d, H-6), 8,32 (1H, br s, H-4), 8,76 (1H, s, H-3'), 9,51 (1H, s, H-4'), 10,01 (1H, s, NH), 10,19 (1H, s, NH), 10,24 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z*= 1419,7 (M+H<sup>+</sup>).
- 35 [0195] **Compuesto 18a, R = (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>H:** <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,81 (6H, dd, *J* = 6,4 Hz, 2 x CH<sub>3</sub>), 1,30 - 1,47 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cit), 1,53 - 1,71 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cit), 1,89 - 1,99 (1H, m, β-H Val), 2,82 - 3,05 (8H, m, 2 x CH<sub>3</sub>+ NCH<sub>2</sub>), 3,96 - 4,02 (1H, m), 4,15 - 4,23 (1H, m), 4,33 - 4,40 (1H, m, H-1), 4,44 - 4,52 (1H, m, α-H), 4,63 - 4,71 (1H, m, H-2), 4,94 - 5,12 (3H, m, CH<sub>2</sub> + H-2), 5,96 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-3"), 7,01 (2H, s, CH=CH), 7,10 - 7,54 (7H, m, 5 ArH + 2 x NH), 7,66 - 7,81 (3H, m, ArH), 7,91 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-2"), 8,00 - 8,05 (1H, m, H-6), 8,29 - 8,37 (1H, m, H-4), 8,79 (1H, br s, H-3'), 9,54 (1H, br s, H-4'), 9,91 - 10,00 (1H, m, NH), 10,20 (1H, br s, OH), 10,27 (1H, s, NH); MS (ESI): *m/z*= 1287,7 (M+H<sup>+</sup>).
- 40 [0196] **Compuesto 18b, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)NH<sub>2</sub>:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,83 (6H, dd, *J* = 6,4 Hz, 2 x CH<sub>3</sub> Val), 1,25 - 2,15 (9H, m, 2 x CH<sub>2</sub> butiramida + 2 x CH<sub>2</sub> Cit + β-H Val), 2,82 - 3,04 (8H, m, 2 x CH<sub>3</sub>+ NCH<sub>2</sub>), 3,18 - 3,98 (15H, m, 2 x H-10 + 6 x CH<sub>2</sub> + α-H), 4,34 - 4,42 (1H, m, H-1), 4,46 - 4,54 (1H, m, α-H), 4,63 - 4,71 (1H, m, H-2), 4,93 - 5,07
- 45
- 50

(3H, m, CH<sub>2</sub> PABA + H-2), 5,98 (1H, br s, NH), 6,76 (1H, br s, NH), 6,91 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-3"), 7,00 (2H, s, CH=CH), 7,13 - 7,58 (8H, m, ArH + 2 x NH), 7,65 - 7,83 (3H, m, ArH), 7,91 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, H-2"), 8,04 - 8,09 (1H, m, H-6), 8,28 - 8,37 (1H, m, H-4), 8,89 (1H, br s, H-3'), 9,60 (1H, br s, H-4'), 9,93 - 10,02 (1H, m, NH), 10,34 (1H, br s, NH); MS (ESI): *m/z* = 1328,3 (M+H<sup>+</sup>).

5 [0197] **Compuesto 18b, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>C(NH<sub>2</sub>)COOH:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,83 (6H, dd, *J* = 6,4 Hz, 2 x CH<sub>3</sub> Val), 1,30 - 1,98 (11H, m, 3 x CH<sub>2</sub> Lys + 2 x CH<sub>2</sub> Cit + β-H Val), 2,82 - 3,04 (8H, m, 2 x CH<sub>3</sub>+ NCH<sub>2</sub>), 4,33 - 4,42 (1H, m, H-1), 4,45 - 4,51 (1H, m, α-H), 4,62 - 4,70 (1H, m, H-2), 4,95 - 5,07 (2H, m, CH<sub>2</sub> PABA), 5,10 - 5,16 (1H, m, H-2), 5,98 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-3"), 7,01 (2H, s, CH=CH), 7,13 - 7,77 (11H, m, ArH + 3 x NH), 7,90 (2H, d, *J* = 8,8 Hz, H-2"), 8,05 - 8,09 (1H, m, H-6), 8,19 (3H, br s, NH<sub>2</sub> Lys + OH), 8,31 - 8,37 (1H, m, H-4), 8,73 (1H, br s, H-3'), 9,51 (1H, br s, H-4'), 10,00 (1H, br s, NH), 10,17 - 10,25 (2H, m, NH + OH); MS (ESI): *m/z* = 1372,6 (M+H<sup>+</sup>).

15 [0198] **Compuesto 18b, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH:** <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,83 (6H, dd, Val), 1,28 - 1,73 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cit), 1,74 - 2,02 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1,95 (1H, m, βHVal), 2,19 - 2,39 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,85 (3H, s, MeAr), 2,94 (3H, s, MeN), 2,87 - 3,05 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>NMe), 4,00 (2H, m, CH<sub>2</sub>O), 4,40 (1H, m, H-1), 4,48 (1H, m, CH), 4,67 (1H, m, H-2), 4,93 - 5,18 (4H, m, CH<sub>2</sub>O, CH, H-2), 5,40 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 5,96 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, H-3"), 7,01 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,8 (10H, m, ArH + NH), 7,91 (2H, d, H-2"), 8,06 (1H, d, H-6), 8,33 (1H, br s, H-4), 8,76 (1H, s, H-3'), 9,51 (1H, s, H-4'), 10,01 (1H, s, NH), 10,19 (1H, s, NH), 10,24 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z* = 1329,8 (M+H<sup>+</sup>).

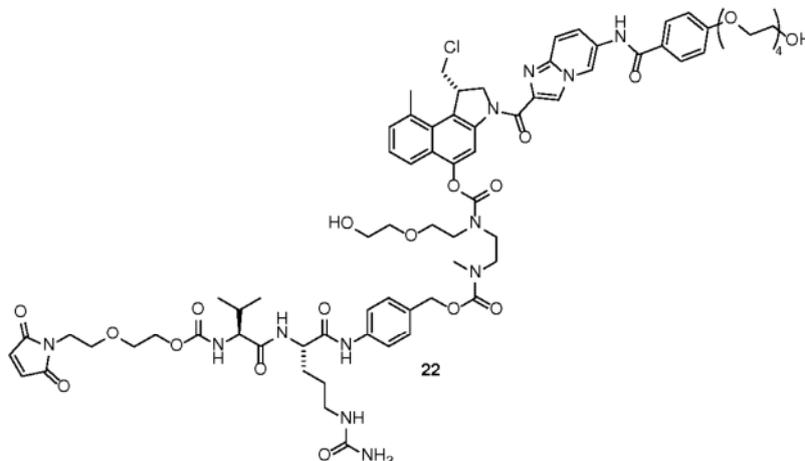
20 [0199] **Compuesto 18c, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH:** <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,84 (6H, dd, Val), 1,30 - 1,73 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cit), 1,74 - 2,02 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1,95 (1H, m, βHVal), 2,19 - 2,39 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2,85 (3H, s, MeAr), 2,94 (3H, s, MeN), 2,87 - 3,05 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>NMe), 4,05 (2H, m, CH<sub>2</sub>O), 4,40 (1H, m, H-1), 4,48 (1H, m, CH), 4,67 (1H, m, H-2), 4,95 - 5,16 (4H, m, CH<sub>2</sub>O, CH, H-2), 5,40 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 5,96 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, H-3"), 7,01 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,8 (9H, m, ArH + NH), 7,91 (2H, d, H-2"), 8,05 (1H, d, H-6), 8,34 (1H, br s, H-4), 8,77 (1H, s, H-3'), 9,52 (1H, s, H-4'), 10,01 (1H, s, NH), 10,19 (1H, s, NH), 10,24 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z* = 1417,9 (M+H<sup>+</sup>).

25 [0200] **Compuesto 18b, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub>:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,79 (6H, dd, Val), 1,25 - 1,8 (6H, m, 3xCH<sub>2</sub>), 1,91 (1H, m, βHVal), 2,80 (3H, s, MeAr), 2,90 (3H, s, MeN), 2,95 (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>N), 4,34 (1H, m, H-1), 4,61 (1H, m, H-2), 4,94 (1H, m, H-2), 4,99 (2H, s, CH<sub>2</sub>O), 5,32 (4H, br s, 2xNH<sub>2</sub>), 5,91 (1H, br s, NH), 5,98 (1H, br s, NH), 6,86 (2H, d, H-3"), 6,95 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,7 (10H, m, ArH + 2xNH), 7,86 (2H, d, H-2"), 8,02 (1H, d, H-6), 8,28 (1H, br s, H-4), 8,82 (1H, s, H-3'), 9,54 (1H, s, H-4'), 9,95 (1H, s, NH), 10,15 (1H, s, NH), 10,27 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z* = 1343,7 (M+H<sup>+</sup>).

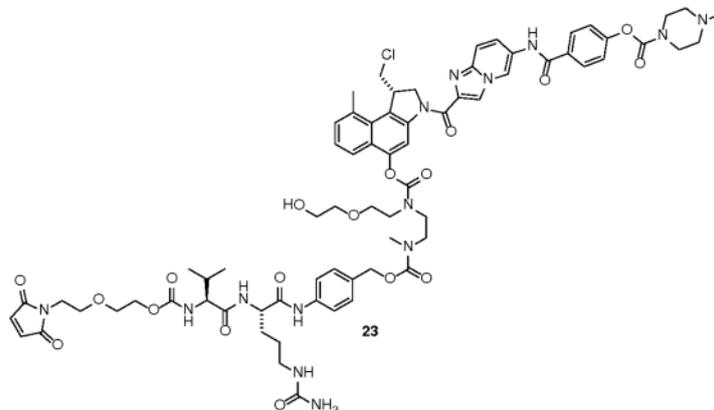
30 [0201] **Compuesto 18c, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub>:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,79 (6H, dd, Val), 1,25 - 1,8 (6H, m, 3\*CH<sub>2</sub>), 1,91 (1H, m, βHVal), 2,80 (3H, s, MeAr), 2,90 (3H, s, MeN), 2,95 (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>N), 4,34 (1H, m, CH), 4,45 (1H, m, CH), 4,61 (1H, m, H-2), 4,94 (1H, m, H-2), 4,99 (2H, s, CH<sub>2</sub>O), 5,32 (4H, br s, 2xNH<sub>2</sub>), 5,91 (1H, br s, NH), 5,98 (1H, br s, NH), 6,86 (2H, d, H-3"), 6,95 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,7 (10H, m, ArH + 2xNH), 7,86 (2H, d, H-2"), 8,02 (1H, d, H-6), 8,28 (H, br s, H-4), 8,82 (1H, s, H-3'), 9,54 (1H, s, H-4'), 9,95 (1H, s, NH), 10,15 (1H, s, NH), 10,27 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z* = 1431,5 (M+H<sup>+</sup>).

35 [0202] **Compuesto 18d, R = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(O)NH<sub>2</sub>:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,83 (6H, dd, Val), 1,25 - 1,8 (6H, m, 3xCH<sub>2</sub>), 1,95 (1H, m, βHVal), 2,85 (3H, s, MeAr), 2,94 (3H, s, MeN), 2,95 (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>N), 4,20 (2H, d, NCH<sub>2</sub>), 4,39 (1H, m, CH), 4,48 (3H, m, CH+CH<sub>2</sub>), 4,67 (1H, m, H-2), 5,02 (3H, m, H-2, CH<sub>2</sub>O), 5,41 (4H, br s, 2xNH<sub>2</sub>), 5,97 (2H, br s, 2xNH), 6,91 (2H, d, H-3"), 6,99 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,7 (11H, m, ArH + 3xNH), 7,76 (1H, s, triazol-H), 7,88 (2H, d, H-2"), 8,08 (1H, d, H-6), 8,33 (H, br s, H-4), 8,84 (1H, s, H-3'), 9,57 (1H, s, H-4'), 10,00 (1H, s, NH), 10,20 (1H, s, NH), 10,30 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z* = 1556,2 (M+H<sup>+</sup>).

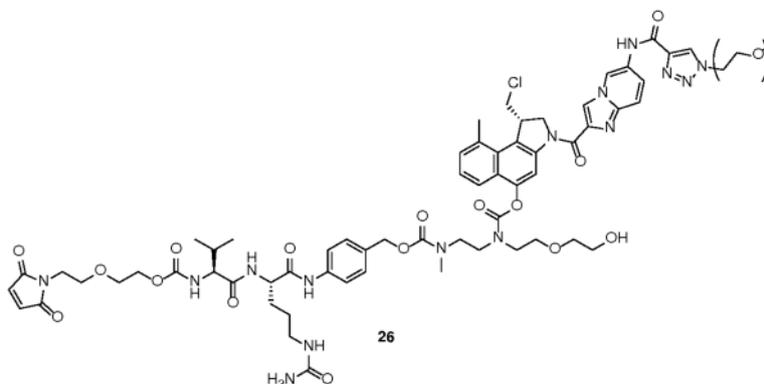
45 [0203] **Compuesto 18b, R = (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>H:** <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO): δ = 0,83 (6H, dd, *J* = 6,5 Hz, *J* = 15,8 Hz, Val), 1,3 - 1,7 (4H, m), 1,96 (1H, m), 2,90 (8H, m), 3,00 - 4,00 (6H, m), 4,44 (2H, m), 4,67 (1H, m), 6,69 (1H, s), 5,04 (2H, d, *J* = 9,8 Hz), 5,40 (1H, br s), 5,97 (1H, s, NH), 6,9 (2H, d, *J* = 8,3 Hz), 7,00 (2H, s, CH=CH), 7,13 - 7,61 (7H, m), 7,75 (3H, m), 7,91 (2H, d, *J* = 8,3 Hz), 8,06 (1H, m), 8,33 (1H, s), 8,83 (1H, s), 9,56 (1H, s), 9,97 (1H, s), 10,20 (1H, s), 10,30 (1H, s); MS (ESI): *m/z* = 1376 (M+H<sup>+</sup>).



- 5 [0204] **Compuesto 22:** el compuesto **22** se preparó análogamente partiendo con el fármaco activado correspondiente.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 0,84$  (6H, dd,  $J = 6,4$  Hz, 2 x  $\text{CH}_3$  Val), 1,30 - 1,47 (2H, m,  $\text{CH}_2$  Cit), 1,52 - 1,71 (2H, m,  $\text{CH}_2$  Cit), 1,91 - 1,99 (1H, m,  $\beta\text{-H}$  Val), 2,82 - 3,03 (8H, m, 2 x  $\text{CH}_3$  +  $\text{NCH}_2$ ), 4,18 - 4,22 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,35 - 4,43 (1H, m, H-1), 4,46 - 4,52 (1H, m,  $\alpha\text{-H}$ ), 4,63 - 4,71 (1H, m, H-2), 4,94 - 5,08 (3H, m,  $\text{CH}_2$  PABA + H-2), 5,97 (1H, br s, NH), 7,01 (2H, s,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 7,09 - 7,20 (4H, m, H-3" + 2 ArH), 7,22 - 7,58 (5H, m, 3 ArH + 2 x NH), 7,69 - 7,82 (3H, m, ArH), 8,00 (2H, d,  $J = 8,8$  Hz, H-2"), 8,03 - 8,08 (1H, br s, H-6), 8,28 - 8,37 (1H, m, H-4), 8,83 (1H, br s, H-3'), 9,57 (1H, br s, H-4'), 9,93 - 10,02 (1H, m, NH), 10,39 (1H, s, NH); MS (ESI):  $m/z = 1509,6$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).



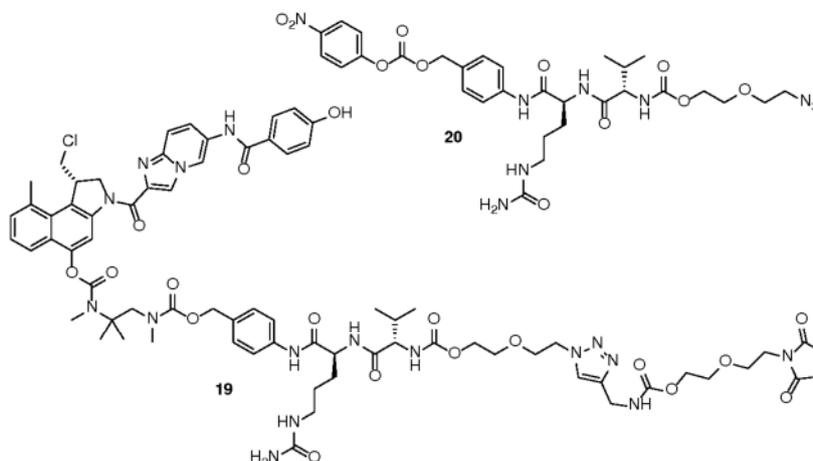
- 10 [0205] **Compuesto 23:** el compuesto **23** se preparó análogamente con el fármaco activado correspondiente.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}$ ):  $\delta = 0,80$  (6H, dd,  $J = 6,5$  Hz,  $J = 15,9$  Hz, 2 x  $\text{CH}_3$ ), 1,3 - 1,7 (4H, m), 1,93 (1H, m), 2,9 (11H, m), 3,00 - 4,50 (10H, m), 5,03 (3H, m), 5,40 (1H, br s), 5,94 (1H, s, NH), 6,98 (2H, s,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 7,10 - 7,85 (11H, m), 8,03 (3H, m), 8,32 (1H, m), 8,76 (1H, s), 9,50 (1H, s), 9,78 (1H, s), 9,98 (1H, br s), 10,51 (1H, br s); MS (ESI):  $m/z = 1457$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).



[0206] **Compuesto 26:**  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 0,83$  (6H, dd,  $J = 6,8$  Hz,  $2 \times \text{CH}_3$ ),  $1,30 - 1,47$  (2H, m,  $\text{CH}_2$  Cit),  $1,54 - 1,71$  (2H, m,  $\text{CH}_2$  Cit),  $1,90 - 2,00$  (1H, m,  $\beta\text{-H Val}$ ),  $2,82 - 3,03$  (10H, m,  $\text{ArCH}_3 + \text{NCH}_3 + 2 \times \text{NCH}_2$ ),  $3,19$  (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ),  $3,97 - 4,03$  (2H, m,  $\text{NCH}_2\text{-triazol}$ ),  $4,37 - 4,52$  (2H, m, H-1 +  $\alpha\text{-H}$ ),  $4,64 - 4,69$  (3H, m, H-2 +  $\text{CH}_2$ ),  $4,94 - 5,13$  (3H, m,  $\text{CH}_2$  PABA + H-2),  $5,96$  (1H, br s, NH),  $7,01$  (2H, s,  $\text{CH}=\text{CH}$ ),  $7,14 - 7,58$  (7H, m, 5 ArH +  $3 \times \text{NH}$ ),  $7,72 - 7,84$  (3H, m, ArH),  $8,04 - 8,07$  (1H, m, H-6),  $8,29 - 8,38$  (H, m, H-4),  $8,74 - 8,80$  (2H, s, H-3' + triazol-H),  $9,53$  (1H, s, H-4'),  $10-00$  (1H, s, NH),  $10,85$  (1H, s, NH); MS (ESI):  $m/z = 1496,9$  ( $\text{M} + \text{H}^+$ ).

#### Ejemplo 11: síntesis del compuesto 19

[0207]

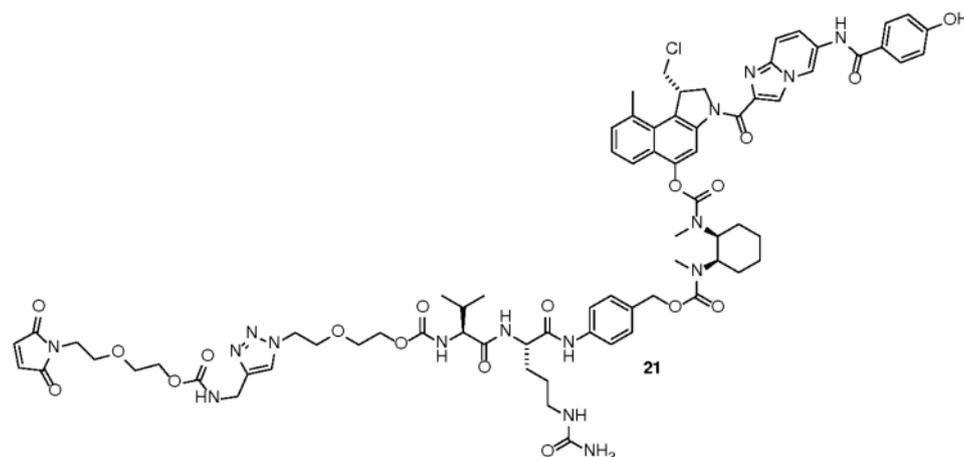


10

[0208] Se disolvieron  $0,21$  g ( $0,85$  mmol) *N*-Boc-*N*-metil-*N'*-metil-1,2-diamino-1-metilpropano,  $0,45$  g ( $0,64$  mmol) de **20** y  $8$  mg de HOBt en  $5$  ml de DMF. Se añadieron  $0,75$  ml de DiPEA y la mezcla reactiva se agitó a RT durante toda la noche. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MeOH, 1:0 a 20:1) para dar  $0,50$  g (100%) de producto intermedio. Este material se suspendió en  $4$  ml de  $\text{CHCl}_3$  y se enfrió en hielo. Se añadieron  $2$  ml de TFA y la mezcla reactiva se agitó durante  $2$  h a  $0^\circ\text{C}$  y luego se concentró al vacío. A este material en  $6$  ml de DMF, se añadieron  $0,11$  g ( $0,15$  mmol) de fármaco activado protegido con MOM,  $2$  mg de HOBt y  $0,2$  ml ( $1,2$  mmol) de  $\text{Et}_3\text{N}$  y la mezcla se calentó a  $50^\circ\text{C}$  durante  $3$  h. La mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MeOH, 1:0 a 75:15) para dar  $0,14$  g (72%) de material. Esto se suspendió en  $6$  ml de  $\text{CHCl}_3$  enfriado en hielo. Se añadieron  $0,5$  ml de TFA y la mezcla se agitó durante  $2$  h y luego se concentró al vacío. Este material y  $0,045$  g ( $0,17$  mmol) de conector de alquino-maleimida se disolvieron en  $2$  ml de DMF. Se añadieron a la mezcla reactiva  $0,6$  ml de una solución de  $0,025$  g ( $0,1$  mmol) de  $\text{CuSO}_4$ ,  $0,022$  g ( $0,11$  mmol) de 1,10-fenantrolina y  $0,022$  g ( $0,11$  mmol) de ascorbato de sodio en  $1$  ml de acetonitrilo/agua (1:2) y la mezcla se agitó durante  $2,5$  h. La mezcla se acidificó con ácido acético y se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , DCM/MeOH, 1:0 a 8:2) para dar  $0,026$  g (16%) de material, que se purificó adicionalmente por HPLC de fase reversa preparatoria y se liofilizó para dar  $0,015$  g de **19**.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 0,79$  (6H, dd, Val),  $1,34$

25

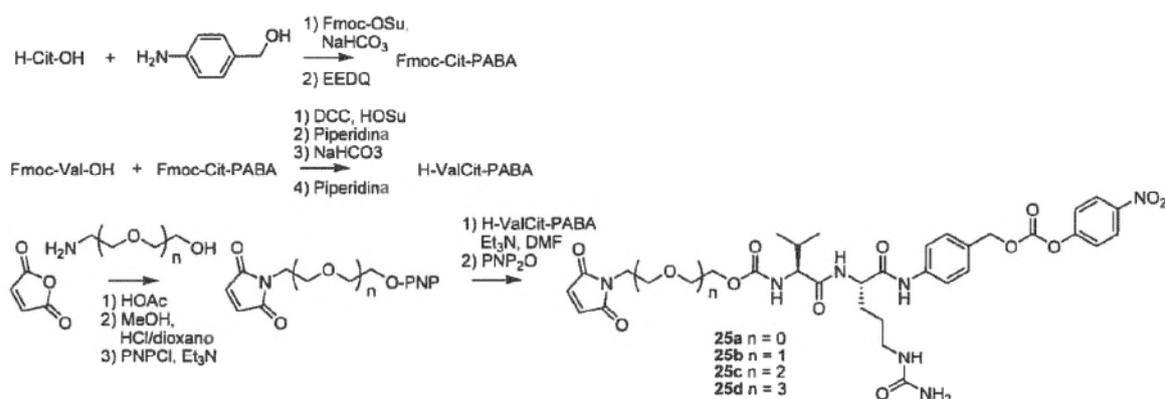
(3H, br s, gem-Me<sub>2</sub>), 1,38 (3H, br s, gem-Me<sub>2</sub>), 1,3 - 1,7 (4H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cit), 1,90 (1H, m, βHVal), 2,80 (3H, s, MeAr), 2,91 (3H, s, MeN). 3,11 (3H, br s, MeN), 3,95 (2H, t, CH<sub>2</sub>O), 3,98 (2H, t, CH<sub>2</sub>O), 4,15 (2H, d, NCH<sub>2</sub>-triazol), 4,30 (1H, m, H-1), 4,43 (2H, t, CH<sub>2</sub>-triazol), 4,61 (1H, m, H-2), 5,00 (2H, s, CH<sub>2</sub>O), 5,04 (1H, m, H-2), 5,37 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 5,92 (1H, br s, NH), 6,85 (2H, d, H-3''), 6,94 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,7 (11H, m, ArH + 3xNH), 7,81 (1H, s, triazol-H), 7,84 (2H, d, H-2''), 8,03 (1H, d, H-6), 8,27 (H, br s, H-4), 8,73 (1H, s, H-3'), 9,48 (1H, s, H-4'), 9,98 (1H, s, NH), 10,15 (1H, s, NH), 10,21 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z* = 1497,6 (M+H<sup>+</sup>).



[0209] **Compuesto 21:** el mismo procedimiento se siguió en cuanto al compuesto **19**. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,83 (6H, dd, Val), 1,3 - 2,1 (3Hm, ciclohexilo + CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cit + βHVal), 2,84 (3H, s, MeAr), 3,01 (8H, m, 2xMeNCH), 3,98 (4H, m, 2xCH<sub>2</sub>O), 4,20 (2H, d, NCH<sub>2</sub>-triazol), 4,36 (1H, m, H-1), 4,48 (2H, t, CH<sub>2</sub>-triazol), 4,65 (1H, m, H-2), 5,04 (1H, m, H-2), 5,06 (2H, s, CH<sub>2</sub>O), 5,39 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 5,96 (1H, br s, NH), 6,90 (2H, d, H-3''), 6,99 (2H, s, CH=CH), 7,2 - 7,7 (11H, m, ArH + 3xNH), 7,87 (1H, s, triazol-H), 7,91 (2H, d, H-2''), 8,06 (1H, d, H-6), 8,36 (H, br s, H-4), 8,80 (1H, s, H-3'), 9,55 (1H, s, H-4'), 9,97 (1H, s, NH), 10,20 (1H, s, NH), 10,27 (1H, s, OH); MS (ESI): *m/z* = 1523,6 (M+H<sup>+</sup>).

#### Ejemplo 12: síntesis de conectores peptídicos-maleimida

[0210]



[0211] **Compuesto 25a:** <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0,83 (6H, dd, *J* = 6,9 Hz, 2 x CH<sub>3</sub> Val), 1,30 - 1,51 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cit), 1,53 - 1,76 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cit), 1,90 - 2,01 (1H, m, β-H Val), 2,89 ÷ 3,08 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cit), 3,62 (2H, t, *J* = 5,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,83 - 3,88 (1H, m, α-H), 3,97 - 4,05 (1H, m), 4,16 - 4,24 (1H, m), 4,35 - 4,43 (1H, m, α-H), 5,25 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5,41 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 5,95 - 5,99 (1H, m, NH), 7,02 (2H, s, HC=CH), 7,11 - 7,14 (1H, m, NH), 7,40 (2H, d, *J* = 8,7 Hz, Ar-H), 7,54 - 7,59 (2H, m, Ar-H), 7,64 (2H, d, *J* = 8,4 Hz, Ar-H), 8,03 - 8,06 (1H, m, NH), 8,29 - 8,33 (2H, m, Ar-H), 10,08 (1H, s, NH); MS (ESI): *m/z* = 712,5 (M+H<sup>+</sup>).

[0212] **Compuesto 25b:**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta = 0,85$  (6H, dd,  $J = 6,9$  Hz, 2 x  $\text{CH}_3$  Val), 1,32 - 1,50 (2H, m,  $\text{CH}_2$  Cit), 1,54 - 1,76 (2H, m,  $\text{CH}_2$  Cit), 1,91 - 2,02 (1H, m,  $\beta\text{-H}$  Val), 2,90 - 3,09 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3,49 - 3,60 (6H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3,87 - 3,92 (1H, m,  $\alpha\text{-H}$ ), 3,97 - 4,06 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4,37 - 4,46 (1H, m,  $\alpha\text{-H}$ ), 5,24 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 5,41 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 5,95 - 6,00 (1H, m,  $\text{NH}$ ), 7,01 (2H, s,  $\text{HC}=\text{CH}$ ), 7,15 - 7,18 (1H, m,  $\text{NH}$ ), 7,41 (2H, d,  $J = 8,7$  Hz, Ar-H), 7,54 - 7,59 (2H, m, Ar-H), 7,64 (2H, d,  $J = 8,4$  Hz, Ar-H), 8,07 - 8,10 (1H, m,  $\text{NH}$ ), 8,29 - 8,33 (2H, m, Ar-H), 10,11 (1H, s,  $\text{NH}$ ); MS (ESI):  $m/z = 756,5$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ).

[0213] **Compuesto 25c:**  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 0,98$  (6H, dd,  $J = 6,9$  Hz,  $J = 14,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,59 (2H, m), 1,76 (1H, m), 1,94 (1H, m), 2,13 (1H, m), 3,08 - 3,28 (2H, m), 3,54 - 3,76 (10H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,00 (1H, d,  $J = 6,3$  Hz), 4,20 (2H, m), 4,57 (1H, m), 5,27 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ), 6,78 (2H, s,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 7,42 (4H, m, ArH), 7,65 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz), 8,30 (2H, d,  $J = 9,2$  Hz).

[0214] **Compuesto 25d:**  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 0,98$  (6H, dd,  $J = 6,9$  Hz,  $J = 14,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,59 (2H, m), 1,76 (1H, m), 1,94 (1H, m), 2,13 (1H, m), 3,08 - 3,28 (2H, m), 3,57 - 3,76 (14 H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4,00 (1H, m), 4,22 (2H, m), 4,57 (1H, m), 5,26 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ), 6,78 (2H, s,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 7,42 (4H, m, ArH), 7,66 (2H, d,  $J = 8,3$  Hz), 8,29 (2H, d,  $J = 9,3$  Hz).

#### 15 Ejemplo 13: determinación de la velocidad de ciclación de compuestos de separador de ciclación-duocarmicina

[0215] Se prepararon compuestos de separador de ciclación-duocarmicina donde el separador de ciclación está acoplado al grupo hidroxilo del alquilador de ADN a partir de los derivados protegidos con Boc correspondientes tales como y similares al compuesto **14a** por tratamiento con TFA en DCM durante 10 minutos, seguidos de una concentración. Para la medición de la velocidad de ciclación a pH 7,4, el compuesto de separador de ciclación-duocarmicina se disolvió en una mezcla de 100 mM de tampón fosfato de pH 7,4 y acetonitrilo (60/40) a 25 °C y se siguió la desaparición del material de partida/la aparición de fármaco libre a lo largo del tiempo por LC/MS (inyección directa de la mezcla de reacción). Para la medición de la velocidad de ciclación a pH 5, el compuesto de separador de ciclación-duocarmicina se disolvió en una mezcla de 100 mM de tampón de acetato sódico de pH 5 y acetonitrilo (60/40) a 37 °C y se siguió la desaparición del material de partida/la aparición de fármaco libre a lo largo del tiempo por LC/MS (inyección directa de la mezcla de reacción). Las velocidades de ciclación se calcularon a partir de los datos de LC/MS. La figura 2 muestra algunos datos representativos. Todos los compuestos de separador de ciclación-duocarmicina representados en la figura 2 contienen el mismo compuesto de duocarmicina. CM-Fármaco1 contiene un separador de ciclación usado en el estado de la técnica. Todos los demás compuestos de separador de ciclación-duocarmicina contienen separadores de ciclación seleccionados de los descritos en los ejemplos 1 - 9. Los resultados presentados en la figura 2 indican que los separadores de ciclación de la presente invención se pueden usar para modular la velocidad de ciclación.

#### 30 Ejemplo 14: estabilidad en el plasma humano de conjugados conector-agente conjugados con HSA

[0216] Se disolvió en DMSO un conjugado conector-agente con un grupo maleimida y se añadió a plasma humano estabilizado con heparina de sodio a 37 °C de manera que la concentración de conjugado conector-agente fue 7,5  $\mu\text{M}$  y el porcentaje de DMSO fue 2,5%. El conjugado conector-agente reaccionó *in situ* con la seroalbúmina humana en 5 minutos, como se indica por LC/MS. La formación de fármaco libre se siguió a lo largo del tiempo por LC/MS. Las muestras de plasma fueron tratadas con acetonitrilo y se centrifugaron antes del análisis. La figura 3 presenta los datos de estabilidad en el plasma humano para una selección representativa de los conjugados conector-agente de la presente invención. Todos los conjugados conector-agente contienen el mismo análogo de duocarmicina y los conectores están acoplados a la fracción alquiladora de ADN, salvo LD13, donde el conector se une a la fracción de unión a ADN. LD5, LD12 y LD13 contienen conectores que se han usado en el estado de la técnica y que contienen un conector relativamente largo, como en el compuesto **18d**. LD10, LD25, LD26, LD28 y LD29 contienen conectores relativamente cortos similares, como en el compuesto **18b**, y tienen diferentes separadores de ciclación. LD10 y LD12 difieren solo en la fracción L. Los resultados en la figura 3 demuestran que los conjugados con un conector relativamente corto tienen una alta estabilidad en el plasma humano, que generalmente excede a la de los conjugados correspondientes con un conector relativamente largo. Se demuestra además que la estabilidad en el plasma se ve afectada por el separador de ciclación.

#### 45 Ejemplo 15: estudio de la eficacia de una dosis individual en ratones *nu/nu* hembra con un xenoinjerto de N87

[0217] **Preparación de los ADC:** se redujo trastuzumab (50 mg, 10 mg/ml) usando 1,1 equivalentes molares de TCEP por incubación a 20°C durante 90 minutos para generar 2 tioles libres por mAb. La proporción de incorporación se

confirmó mediante el ensayo de Ellman. Se añadió conjugado conector-agente disuelto en DMSO a la solución de anticuerpo reducido gota a gota en una proporción de 1,3 equivalentes molares por tiol libre de manera que la concentración final de DMSO fuera de un 10%. Después de mezclar durante 50 minutos adicionales a 20°C, la reacción se desactivó por la adición de un equivalente molar de N-acetilcisteína por conjugado conector-agente. Después de la desactivación, el conjugado se desaló en tampón PBS de pH 7,4 y luego se purificó usando una columna de proteína A-r de 5 ml, donde el producto recogido de esta columna se desala en el tampón de presentación (el mismo tampón que en el Herceptin disponible comercialmente). El producto se filtró a 0,2 µm y se caracterizó la agregación (SEC), la proporción fármaco a anticuerpo (UV, 280 nm vs 335 nm) y el conjugado conector-agente libre (LC/MS). Los ADC usados en el estudio de eficacia descrito a continuación contienen una selección representativa de conjugados conector-agente de la presente invención y tienen una proporción fármaco a anticuerpo media de aproximadamente 2.

[0218] **Estudio de eficacia:** se implantaron subcutáneamente fragmentos de tumores N87 en ratones *nu/nu* hembra de 7-8 semanas de edad. El tratamiento comenzó 19 días después del implante, cuando la masa tumoral media estimada para todos los grupos fue de 130 mg. Los grupos con ADC contenían 6 animales por grupo; los grupos de control contenían 4 animales por grupo. Los animales fueron tratados con una dosis individual de 12 mg de ADC/kg (0,2 ml/20 g para el vehículo; 12 mg de mAb/kg para el trastuzumab) el día 0. Los animales fueron sometidos a eutanasia cuando el tumor alcanzó una masa de 1.000 mg. La figura 4A muestra la carga tumoral media para cada grupo. Una línea se detiene después de que un primer animal del grupo correspondiente se haya sometido a eutanasia debido a la carga tumoral. La figura B muestra el cambio de peso corporal medio para cada grupo. La figura C muestra el porcentaje de supervivencia en cada grupo. El ADC5 se basa en un conector-agente que contiene un conector relativamente largo, como en el **18d**, mientras que los ADC basados en los otros conectores-agentes contienen un conector relativamente corto, como en el **18b**. El ADC30 contiene un fármaco diferente que los otros ADC, pero tiene el mismo conector que el ADC28. El ADC5 y el ADC28 difieren solo en la fracción **L**. Los resultados de la figura 4 demuestran que los conjugados que contienen un conector relativamente corto tienen una mejor eficacia que el conjugado correspondiente con un conector relativamente largo. Se demostró que tanto la naturaleza del conector como la naturaleza del fármaco tienen también un efecto sobre la eficacia.

#### Ejemplo 16: escisión de conjugados conector-agente desactivados por la catepsina B

[0219] Se disolvió conjugado conector-agente en acetonitrilo/agua y se añadieron 5 equivalentes de N-acetilcisteína. La mezcla reactiva se incubó durante 1 h a RT y se liofilizó posteriormente para dar el conjugado conector-agente desactivado. El conjugado conector-agente desactivado disuelto en DMSO se añadió a una solución de 5 µg/ml de catepsina B (>200 U/mg) en tampón de acetato sódico de pH 5 a 37 °C. La concentración final de conjugado conector-agente desactivado fue 130 µM. La desaparición de material de partida se monitoreó a lo largo del tiempo por LC/MS. La figura 5 presenta los datos de escisión de la catepsina B para una selección representativa de conjugados conector-agente desactivados de la presente invención. LD5, LD12 y LD13 se basan en conectores-agentes del estado de la técnica y contienen conectores que son relativamente largos, como en el **18d**, mientras que los conectores en los otros conjugados conector-agente desactivados son como en el **18b**. Los dichos otros conjugados conector-agente desactivados difieren principalmente en el separador de ciclación. Los resultados de la figura 5 demuestran que todos los conjugados conector-agente desactivados son escindidos eficazmente por la catepsina B.

#### REFERENCIAS

[0220]

- 1 Boger, D.L.; Johnson, D.S.; Wrasidlo, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1994, 4, 631-636.
- 2 McGovern, J.P.; Clarke, G.L.; Pratt, E.A.; DeKoning, T.F. *J. Antibiot.* 1984, 37, 63-70.
- 3 Carter, P.; Smith, L.; Ryan, M. *Endocr.-Relat. Cancer* 2004, 11, 659-687.
- 4 Bagshawe, K.D. *Drug Dev. Res.* 1995, 34, 220-230.
- 5 Melton, R.; Connors, T.; Knox, R.J. *S.T.P. Pharma Sciences*, 1999, 13-33.
- 6 Huber, B.E.; Richards, C.A.; Krenitsky, T.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88, 8039-8043.
- 7 Bagshawe, K.D.; Springer, C.J.; Searle, F.; Antoniow, P.; Sharma, S.K.; Melton, R.G.; Sherwood, R.F. *Br. J. Cancer*, 1988, 58, 700-703.
- 8 Duncan, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2, 347-360.
- 9

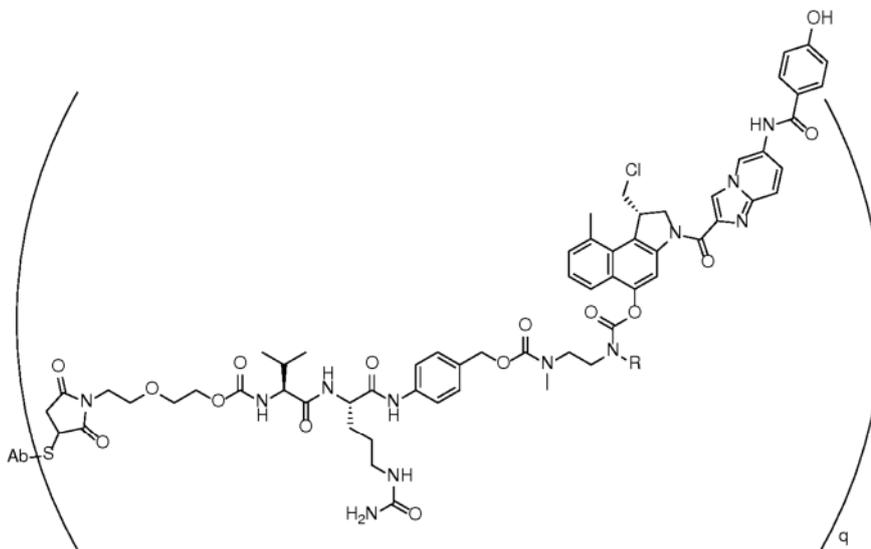
(a) Franke, A. E.; Sievers, E.L.; y Scheinberg, D. A. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2000, 15, 459-476.

(b) Murray, J. L. *Semin. Oncol.* 2000, 27, 2564-2570. (c) Breitling, F., y Dubel, S., *Recombinant Antibodies*, John Wiley and Sons, Nueva York, 1998. <sup>10</sup> Remington's *Pharmaceutical Science* (15<sup>a</sup> ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980).

<sup>11</sup> Pettit, G. R.; Burkett, D. D.; Barkóczy, J.; Breneman, G. L.; Pettit, W. E. *Synthesis* 1996, 719-725.

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto, que es



5 donde **R** es  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{H}$ ,  $(\text{CH}_2)_3\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ ,  $(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ,  $(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ,  $(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$  o  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{H}$ ; **q** varía de 1 a 4; y **Ab** es trastuzumab.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde **R** es  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{H}$ .

3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, donde el **q** medio es aproximadamente 2.

4. Proceso para la preparación del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende los pasos siguientes:

- 10 a) reducción de trastuzumab usando 1,1 equivalentes molares de TCEP por incubación a 20°C durante 90 minutos;
- b) adición gota a gota de conjugado conector-agente disuelto en DMSO en una proporción de 1,3 equivalentes molares por tiol libre hasta una concentración final de DMSO de un 10%;
- c) mezcla durante 50 minutos adicionales a 20°C;
- 15 d) desactivación de la reacción por adición de 1 equivalente molar de N-acetilcisteína por conjugado conector-agente;
- e) desalación del conjugado en tampón PBS de pH 7,4;
- f) purificación usando una columna de proteína A-r; y
- g) filtración sobre un filtro de 0,2 µm.

20 5. Composición farmacéutica que comprende el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente para la administración parenteral.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o composición farmacéutica según la reivindicación 5 para el uso como medicamento, en particular para el tratamiento o la prevención de un tumor en un mamífero.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o composición farmacéutica según la reivindicación 5 para usar en el tratamiento o la prevención de un tumor positivo para Her2 en un mamífero, en particular cáncer de mama metastásico o cáncer gástrico.

25

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o composición farmacéutica según la reivindicación 5 para usar en una terapia combinatoria con uno o más agentes terapéuticos diferentes.

Fig. 1

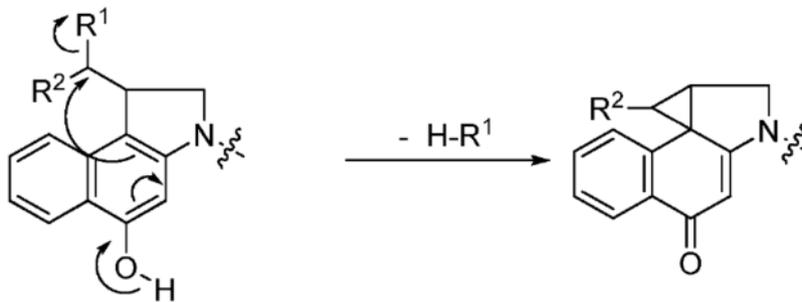
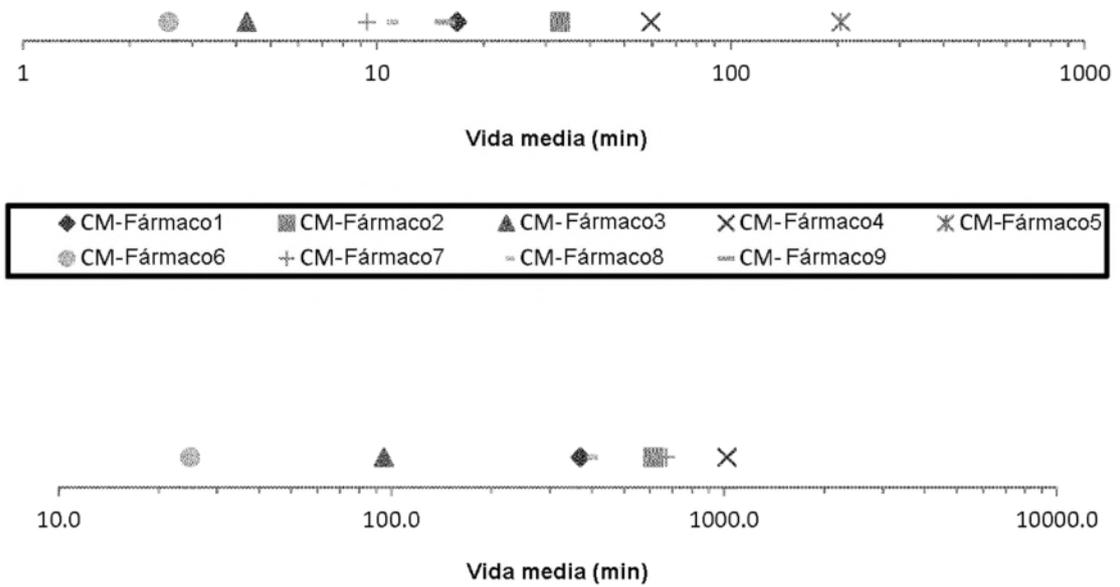


Fig. 2



*Fig. 3*

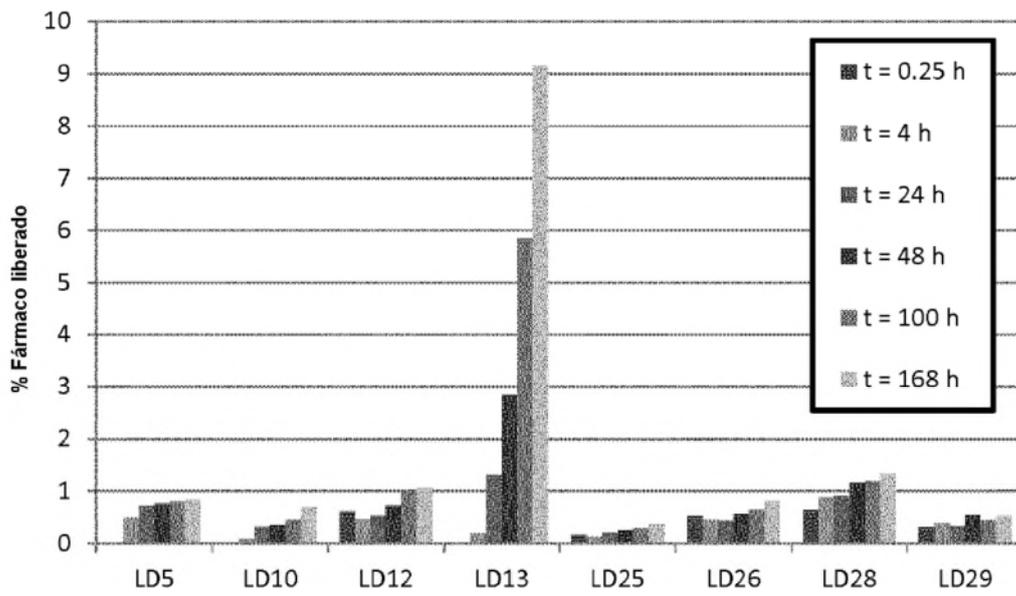


Fig. 4a

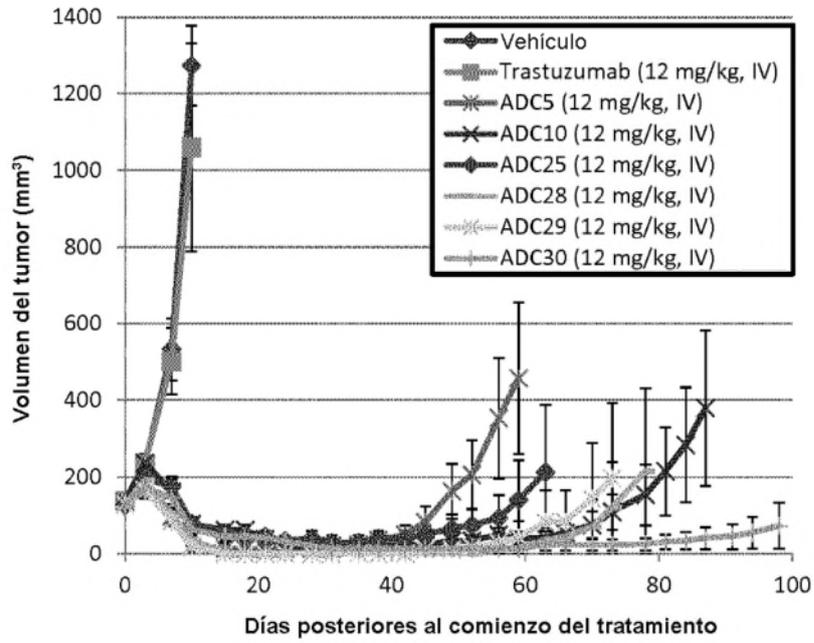


Fig. 4b

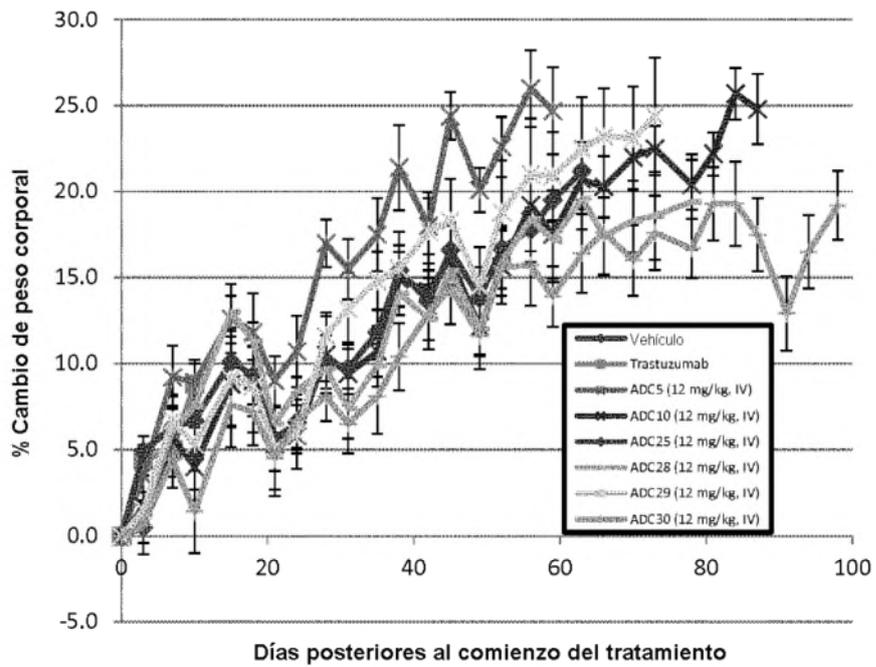


Fig. 4c

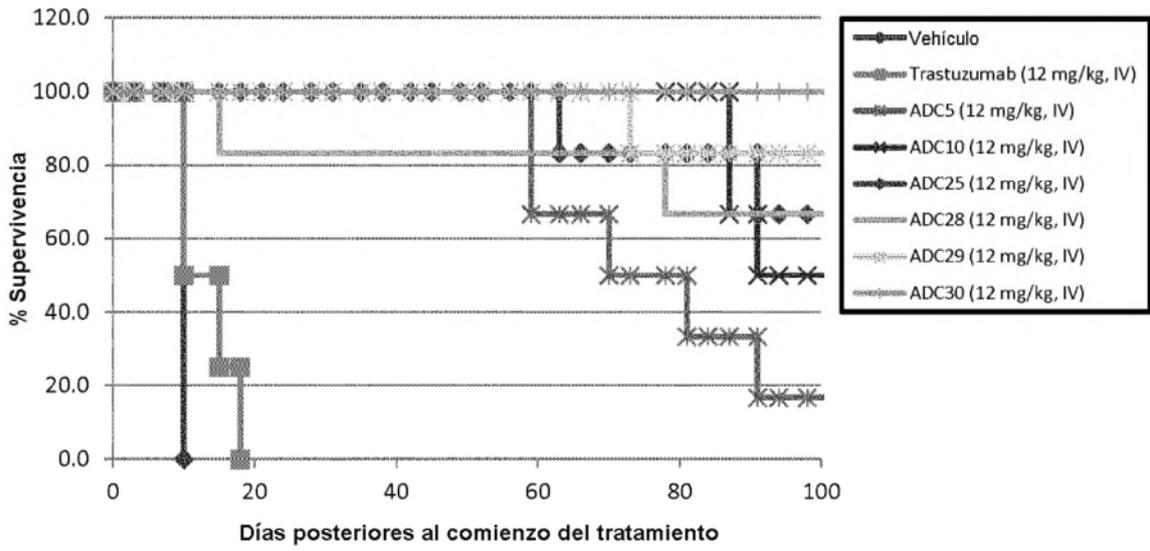


Fig. 5

