

Brevetto europeo No. 2675479

Domanda di brevetto europeo No. 12705600.0

Data di deposito: 15 febbraio 2012

Classificazione Internazionale: A61K47/48, C07D487/04, C07D519/00, A61P35/00

5 Priorità: Statunitense No. 201161443062P del 15 febbraio 2011

Statunitense No. 201161443092P del 15 febbraio 2011

Statunitense No. 201161483499P del 06 maggio 2011

Titolo: "DERIVATI CITOTOSSICI DI BENZODIAZEPINE"

Richiedente: Immunogen, Inc.

10 830 Winter Street  
Waltham, MA 02451  
U.S.A.

Inventori: LI, Wei

15 MILLER, Michael  
FISHKIN, Nathan  
CHARI, Ravi, V. J.

\*\*\*\*\*

#### CAMPO DELL'INVENZIONE

20 La presente invenzione si riferisce a nuovi composti citotossici e a coniugati citotossici comprendenti tali composti citotossici e agenti leganti cellulari. Più specificamente, la presente invenzione si riferisce a derivati dei nuovi composti benzodiazepinici, loro intermedi, loro coniugati e loro sali farmaceuticamente accettabili che sono utili come medicinali, in particolare come agenti antiproliferativi.

#### CONTESTO DELL'INVENZIONE

25 I derivati delle benzodiazepine sono composti utili per il trattamento di vari disturbi e comprendono medicinali quali antiepilettici (imidazo[2,1-b][1,3,5]benzotriadiazepine, brevetto U.S. n. 4.444.688; brevetto U.S. n. 4.062.852),



antibatterici (pirimido[1,2-c][1,3,5]benzotiadiazepine, GB 1476684), diuretici e ipotensivi (pirrolo(1,2-b)[1,2,5]benzotiadiazepine 5,5 diossido, brevetto U.S. n. 3.506.646), ipolipidemici (WO 03091232), antidepressivi (brevetto U.S. n. 3.453.266); osteoporosi (JP 2138272).

5 WO 2010/091150 A1 (ImmunoGen, Inc.) descrive derivati delle benzodiazepine con attività antiproliferativa, dimeri citotossici di tali composti e coniugati dei monomeri e dimeri e composizioni e metodi che prevedono l'uso degli stessi.

Recentemente, è stato dimostrato in modelli tumorali animali che i derivati delle benzodiazepine, come pirrolobenzodiazepine (PBD), agiscono come agenti antitumorali (N-2-imidazolil alchil-sostituito 1,2,5-benzotiadiazepine-1,1-diossido, brevetto U.S. n. 6.156.746), derivati di benzopirido o dipirido tiadiazepina (WO 10 2004/069843), derivati di pirrolo[1,2-b][1,2,5] benzotiadiazepine e pirrolo[1,2-b][1,2,5] benzodiazepine (WO2007/015280), derivati di tomamicina (*ad es.* pirrol[1,4]benzodiazepine), come quelli descritti in WO 00/12508, WO2005/085260, WO2007/085930 ed EP 2019104. Le benzodiazepine sono anche note per influenzare la crescita e la differenziazione cellulare (Kamal A., *et al.*, Bioorg Med Chem. 15 agosto 2008;16(16):7804-10 (e riferimenti citati in questo contesto); Kumar R, Mini Rev Med Chem. giugno 2003;3(4):323-39 (e riferimenti citati in questo contesto); 15 Bednarski J J, *et al.*, 2004; Sutter A. P, *et al.*, 2002; Blatt N B, *et al.*, 2002), Kamal A. *et al.*, Current Med. Chem., 2002; 2; 215-254, Wang J-J., J.Med. Chem., 2206; 49:1442-1449, Alley M.C. *et al.*, Cancer Res. 2004; 64:6700-6706, Pepper C. J., Cancer Res 2004; 74:6750-6755, Thurston D.E. e Bose D.S., Chem Rev 1994; 94:433-465; e Tozuka, Z., *et al.*, Journal of Antibiotics, (1983) 36; 1699-1708. La struttura generale delle PBD è descritta nella pubblicazione U.S. numero 20070072846. Le PBD differiscono nel numero, tipo e posizione dei sostituenti, sia nei loro anelli aromatici C e anelli 20 pirrolo C, e nel grado di saturazione dell'anello C. La loro capacità di formare un addotto nel solco minore e reticolare il DNA consente loro di interferire con l'elaborazione del DNA, da cui il loro potenziale per l'uso come agenti antiproliferativi.

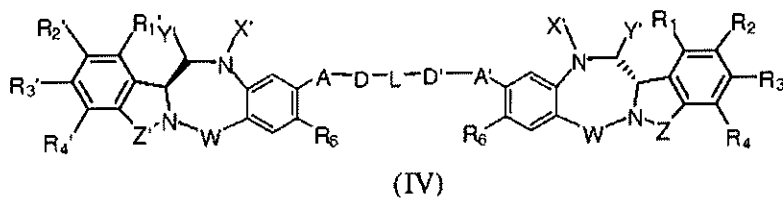
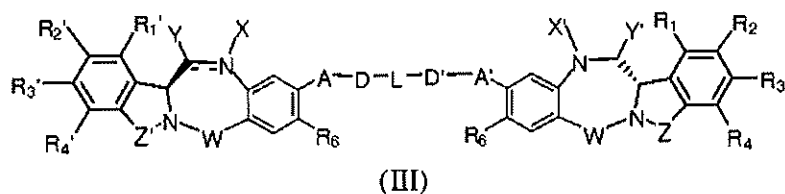
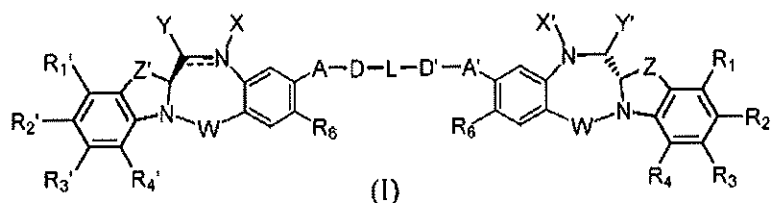
La prima pirrolobenzodiazepina entrata nella clinica, SJG-136 (NSC 694501) è un potente agente citotossico che provoca reticoli tra i filamenti del DNA (S.G. Gregson *et al.*, 2001 *J. Med. Chem.*, 44: 737-748; M.C. Alley *et al.*, 2004, 25 *Cancer Res.*, 64: 6700-6706; J.A. Hartley *et al.*, 2004, *Cancer Res.*, 64: 6693-6699; C. Martin *et al.*, 2005, *Biochemistry.*,

44: 4135-4147; S. Amould *et al.*, 2006, *Mol. Cancer Ther.*, 5: 1602- 1509). I risultati di una valutazione clinica di Fase I di SJG-136 hanno rivelato che questo farmaco era tossico a dosi estremamente basse (dose massima tollerata di 45 µg/m<sup>2</sup> e sono stati notati diversi effetti avversi, tra cui la sindrome da aumentata permeabilità capillare, edema periferico, tossicità epatica e fatica. Un danneggiamento del DNA è stato osservato a tutte le dosi nei linfociti circolanti (D. Hochhauser *et al.*, 2009, *Clin. Cancer Res.*, 15: 2140-2147). Pertanto, esiste una necessità di derivati delle benzodiazepine migliorati che siano meno tossici e ancora terapeuticamente attivi per il trattamento di una varietà di stati patologici proliferativi, come il cancro.

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

10 Dimeri benzodiazepinici citotossici descritti nella tecnica possiedono due funzioni imminiche nella loro forma libera o in forma protetta in modo reversibile, ad esempio un idrato, alcossilato o solfonato. La presenza di queste due funzioni imminiche risultati nella reticolazione del DNA (S.G. Gregson *et al.*, 2001, *J. Med. Chem.*, 44: 737-748). La presente invenzione si basa in parte sulla inaspettata scoperta che coniugati di agenti leganti cellulari di nuovi derivati citotossici delle benzodiazepine, quali dimeri indolinobenzodiazapene che sono privi di due funzioni imminiche (*ad es.* una funzione imminica e una funzione amminica), e quindi incapaci di reticolare il DNA, mostrano un indice terapeutico 15 molto più alto (rapporto tra dose massima tollerata e dose minima efficace) *in vivo* rispetto a derivati delle benzodiazepine in grado di reticolare il DNA che sono stati precedentemente descritti nella tecnica.

Pertanto, uno scopo dell'invenzione è quello di fornire un composto citotossico comprendente un gruppo legante con un gruppo reattivo legato a esso in grado di legare covalentemente il composto citotossico a un agente legante cellulare (CBA, si veda di seguito), in cui il composto citotossico è rappresentato da una delle seguenti formule:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è assente e Y è -H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio e quando è un singolo legame, X è -

5 H, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso o una frazione protettiva dell'ammina;

Y è -H o un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (*ad es.* piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo,

morfolina, ecc.), una guanidina rappresentata da  $-NR'(C=NH)NR''$ , un amminoacido o un peptide rappresentato da  $-NRCOP'$ , in cui  $P'$  è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche,  $-SR$ ,  $-SOR'$ ,  $-SO_2M$ ,  $-SO_3M$ ,  $-OSO_3M$ , alogeno, ciano e un azido; oppure

5 Y è un solfito ( $HSO_3$ ,  $HSO_2$  o un sale di  $HSO_3^-$ ,  $SO_3^{2-}$  o  $HSO_2^-$  formato con un catione), metabisolfito ( $H_2S_2O_5$  o un sale di  $S_2O_5^{2-}$  formato con un catione), mono-, di-, tri- e tetra- tiofosfato ( $PO_3SH_3$ ,  $PO_2S_2H_2$ ,  $POS_3H_2$ ,  $PS_4H_2$  o un sale di  $PO_3S^{3-}$ ,  $PO_2S_2^{3-}$ ,  $POS_3^{3-}$  o  $PS_4^{3-}$  formato con un catione), estere tiofosfato ( $(R^iO)_2PS(OR^i)$ ,  $R^iS-$ ,  $R^iSO$ ,  $R^iSO_2$ ,  $R^iSO_3$ , tiosolfato ( $HS_2O_3$  o un sale di  $S_2O_3^{2-}$  formato con un catione), ditionite ( $HS_2O_4$  o un sale di  $S_2O_4^{2-}$  formato con un catione), fosforoditioato ( $P(=S)(OR^k)(S)(OH)$  o un suo sale formato con un catione), acido idrossamico ( $R^kC(=O)NOH$  o un sale formato con un catione), formaldeide solfossilato ( $HOCH_2SO_2$  o un sale di  $HOCH_2SO_2^-$  formato con un catione, come  
10  $HOCH_2SO_2^- Na^+$ ) o una loro miscela, in cui  $R^i$  è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 10 atomi di carbonio ed è sostituito con almeno un sostituyente scelto tra  $-N(R^j)_2$ ,  $-CO_2H$ ,  $-SO_3H$  e  $-PO_3H$ ;  $R^i$  può essere inoltre opzionalmente sostituito con un sostituyente per un alchile descritto in questo contesto;  $R^j$  è un alchile lineare o modificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;  $R^k$  è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile, eterociclice o eteroarile; preferibilmente, Y è un addotto di un bisolfito, un idrosolfito o un metabisolfito, o loro sali  
15 (come sale sodico);

M è  $-H$  oppure un catione;

R, per ciascuna occorrenza, è indipendentemente scelto dal gruppo costituito da  $-H$ , un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5  
20 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo o un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;

$R'$  e  $R''$  sono ciascuno indipendentemente scelti tra  $-H$ ,  $-OH$ ,  $-OR$ ,  $-NHR$ ,  $-NR_2$ ,  $-COR$ , un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$  e un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi  
25

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

- indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- $R^c$  è -H o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio o il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso;
- n è un numero intero compreso tra 1 e 24;
- 5 W è scelto tra C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO e SO<sub>2</sub>;
- X' è scelto tra -H, un gruppo protettivo dell'ammina, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti
- 10 tra azoto, ossigeno e zolfo e un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- Y' è scelto tra -H, un gruppo osso, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile avente da 6 a 18 elementi opzionalmente sostituito, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più
- 15 eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo, un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi;
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' e R<sub>4</sub>' sono ciascuno indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, alogeno, guanidina [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -
- 20 SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, un solfato -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, una solfonammide rappresentata da -SO<sub>2</sub>NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso;
- R<sub>6</sub> è -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, alogeno o il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso;
- Z e Z' sono indipendentemente scelti tra -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>- (CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NR<sub>9</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-
- 25 (CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>- e -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>-;

$n'$  e  $na'$  sono uguali o diversi e sono scelti tra 0, 1, 2 e 3;

$R_7$  e  $R_8$  sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , un amminoacido, un'unità peptidica recante da 2 a 6 amminoacidi, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

5  $R_9$  è indipendentemente scelto tra -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

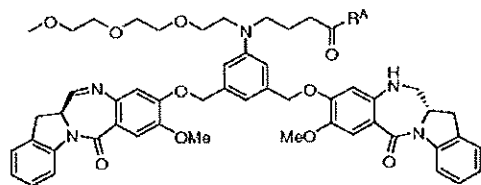
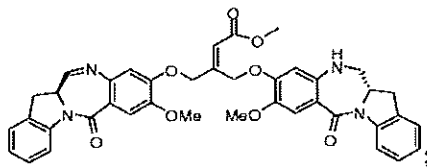
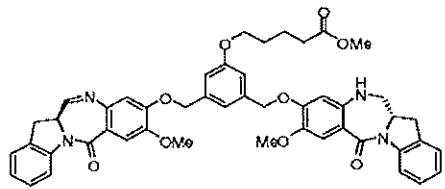
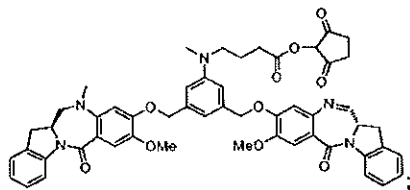
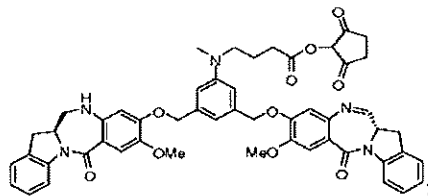
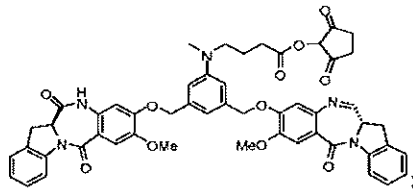
A e A' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra -O-, osso  $(-C(=O)-)$ , -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR<sub>5</sub> e -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

10  $R_5$  per ciascuna occorrenza è indipendentemente -H o un alchile lineare o ramificato opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

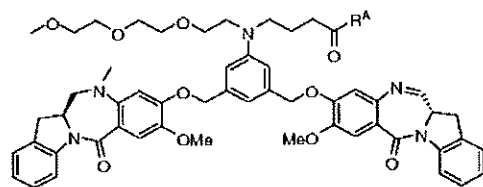
D e D' sono uguali o diversi e sono indipendentemente assenti o scelti dal gruppo costituito da un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un amminoacido, un peptide recante da 2 a 6 amminoacidi e un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

15 L è assente, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , un alchile o alchenile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un gruppo fenile, un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi o un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P, in cui l'alchile o alchenile è opzionalmente sostituito con il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso; il fenile o l'anello eterociclico o eteroarilico possono essere opzionalmente sostituiti, in cui il sostituito può essere il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, purché il composto non sia uno dei composti descritti  
20 immediatamente di seguito.

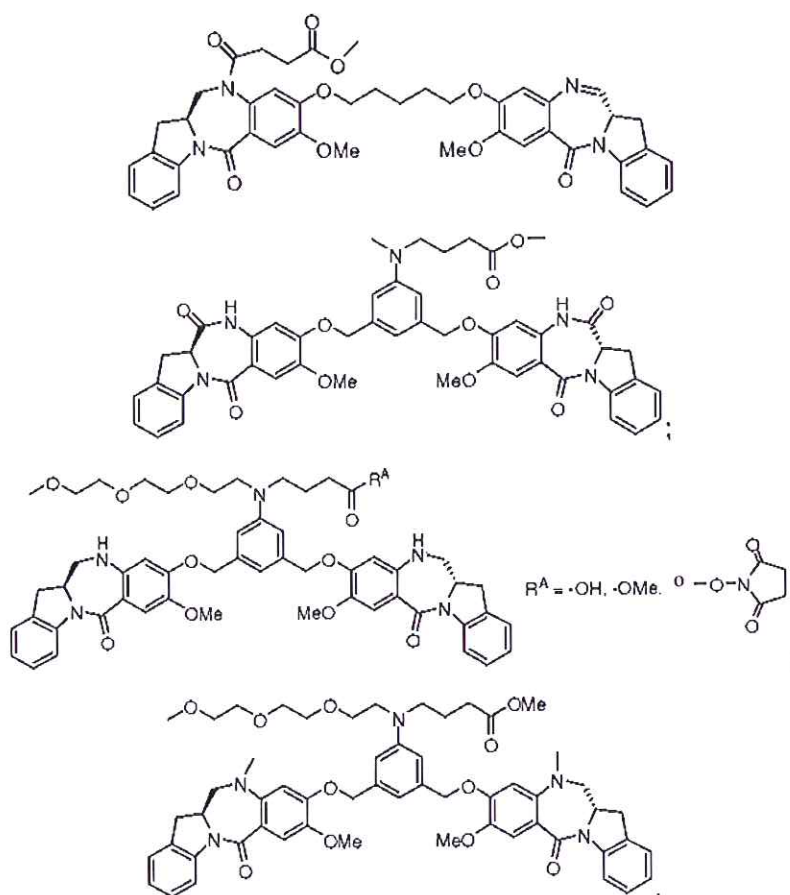
Il composto non è alcuno dei seguenti composti:



$R^A = -OH, -OMe, \text{ or } \text{O}-\text{O}-\text{N}$



$R^A = -OH, -OMe, \text{ or } \text{O}-\text{O}-\text{N}$



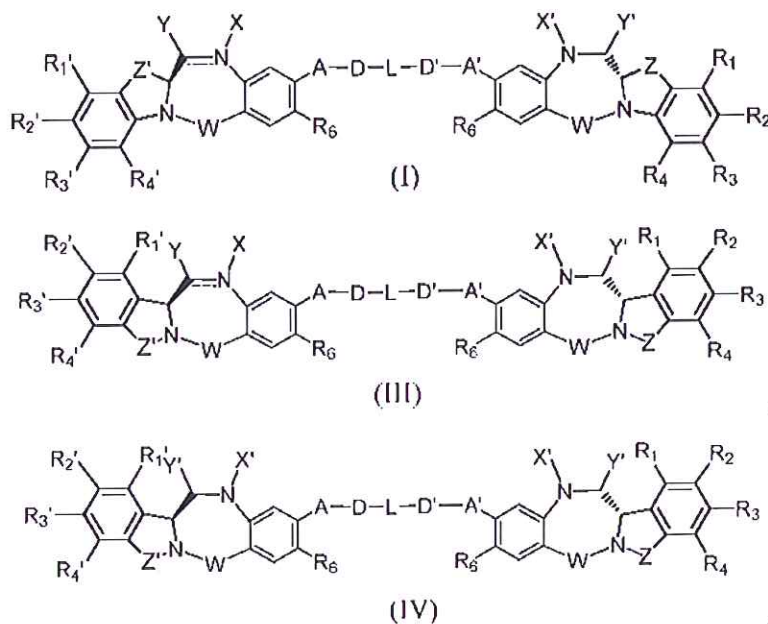
In alcune forme di realizzazione, X non è il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso. In alcune forme di realizzazione, la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame, Y non è -H.

In alcune forme di realizzazione, Y è un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', - OCOOR', -OCONR'R'', - NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (*ad es.*

piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina, *ecc.*), una guanidina rappresentata da  $-NR'(C=NH)NR''$ , un aminoacido o un peptide rappresentato da  $-NRCOP'$ , in cui  $P'$  è un aminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità aminoacidiche,  $-SR$ ,  $-SOR'$ ,  $-SO_2M$ ,  $-SO_3M$ ,  $-OSO_3M$ , alogeno, ciano e un azido.

Un secondo scopo dell'invenzione è quello di fornire coniugati di agenti leganti cellulari con i nuovi composti benzodiazepinici o loro derivati della presente invenzione. Questi coniugati sono utili come agenti terapeutici che vengono rilasciati specificamente alle cellule bersaglio e sono citotossici.

In particolare, un coniugato dell'invenzione può comprendere: un composto citotossico e un agente legante cellulare (CBA), in cui il composto citotossico comprende un gruppo legante che lega covalentemente il composto citotossico al CBA e in cui il composto citotossico è rappresentato da una qualsiasi delle seguenti formule:



10

o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:



la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è assente e Y è -H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio e quando è un singolo legame, X è -H, il gruppo legante o una frazione protettiva dell'ammina;

Y è -H o un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (*ad es.* piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina, ecc.), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido; oppure

Y è un solfito (HSO<sub>3</sub>, HSO<sub>2</sub> o un sale di HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> o HSO<sub>2</sub><sup>-</sup> formato con un catione), metabisolfito (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), mono-, di-, tri- e tetra- tiofosfato (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub> o un sale di PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, POS<sub>3</sub><sup>3-</sup> o PS<sub>4</sub><sup>3-</sup> formato con un catione), estere tiofosfato (R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>S-, R<sup>i</sup>SO, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub> tioolfato (HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), ditionite (HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> formato con un catione) fosforoditioato (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH) o un suo sale formato con un catione), acido idrossamico (R<sup>k</sup> C(=O)NOH o un sale formato con un catione), formaldeide solfossilato (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> o un sale di HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup> formato con un catione, come HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) o una loro miscela, in cui R<sup>i</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 10 atomi di carbonio ed è sostituito con almeno un sostituito scelto tra -N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, e -PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup> può essere inoltre opzionalmente sostituito con un sostituito per un alchile descritto in questo contesto; R<sup>j</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio; R<sup>k</sup> è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile, eterociclice o eteroarile; preferibilmente, Y è un addotto di un bisolfito, un idrosolfito o un metabisolfito, o loro sali (come sale sodico);

M è -H oppure un catione;

R, per ciascuna occorrenza, è indipendentemente scelto dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e

zolfo o un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;

R' e R'' sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup> e un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;

R<sup>c</sup> -H o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio o il gruppo legante; n è un numero intero compreso tra 1 e 24;

W è scelto tra C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO e SO<sub>2</sub>;

10 X' è scelto tra -H, un gruppo protettivo dell'ammina, il gruppo legante, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo e un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra  
15 O, S, N e P;

Y' è scelto tra -H, un gruppo osso, il gruppo legante, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile con da 6 a 18 elementi opzionalmente sostituito, un anello eteroarilico con da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo, un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6  
20 eteroatomi;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' e R<sub>4</sub>' sono ciascuno indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, alogeno, guanidina [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, un solfato -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
25 M<sup>+</sup>, una solfonammide rappresentata da -SO<sub>2</sub>NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e il gruppo legante;



$R_6$  è -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, alogeno o il gruppo legante;

Z e Z' sono indipendentemente scelti tra  $-(CH_2)_{n'}$ -,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-$   $(CH_2)_{na'}$ -,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ -,  $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{na'}$ - e  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$ -;

$n'$  e  $na'$  sono uguali o diversi e sono scelti tra 0, 1, 2 e 3;

- 5  $R_7$  e  $R_8$  sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , un amminoacido, un'unità peptidica recante da 2 a 6 amminoacidi, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

$R_9$  è indipendentemente scelto tra -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

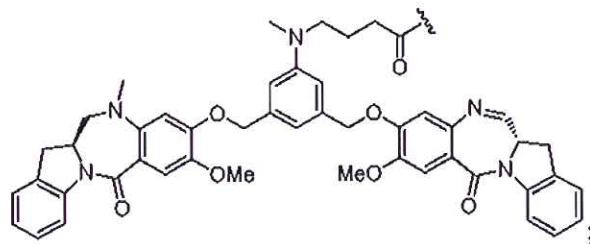
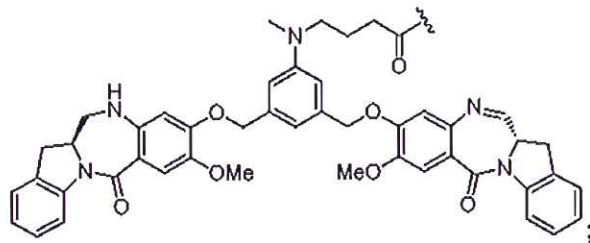
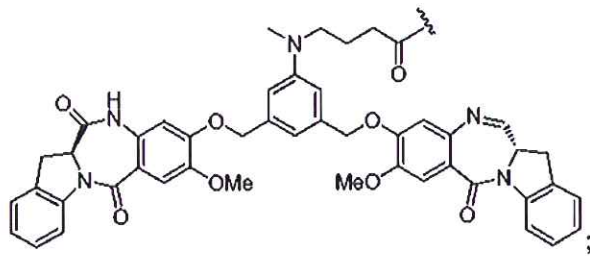
- 10 A e A' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra -O-, osso  $(-C(=O)-)$ -, -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR<sub>5</sub> e -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

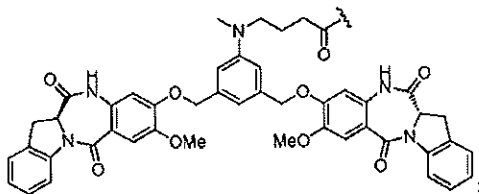
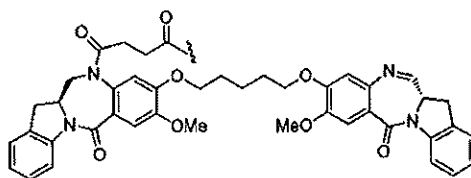
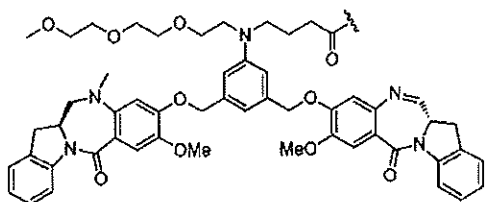
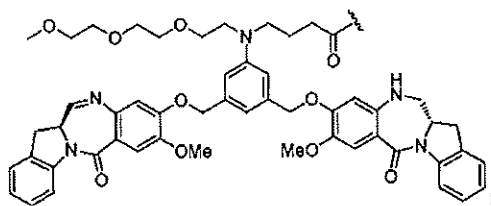
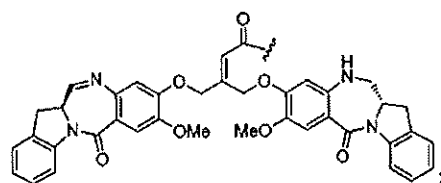
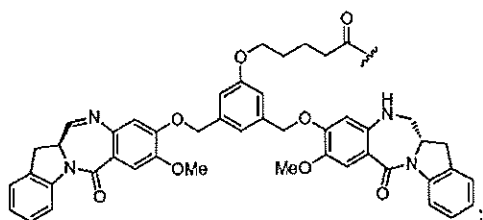
$R_5$  per ciascuna occorrenza è indipendentemente -H o un alchile lineare o ramificato opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

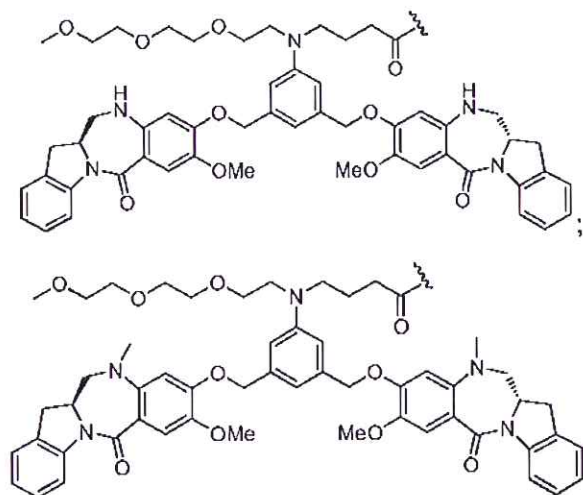
- 15 D e D' sono uguali o diversi e sono indipendentemente assenti o scelti dal gruppo costituito da un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un amminoacido, un peptide recante da 2 a 6 amminoacidi e un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

- 20 L è assente, il gruppo legante, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , un alchile o alchenile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un gruppo fenile, un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi o un anello eteroarilico con da 5 a 18 elementi avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P, in cui l'alchile o alchenile è opzionalmente sostituito con il gruppo legante; il fenile o l'anello eterociclico o eteroarilico possono essere opzionalmente sostituiti, in cui il sostituito può essere il gruppo legante, in cui il composto non è uno dei composti descritti immediatamente di seguito.

Il composto del coniugato non è alcuno dei seguenti composti (il legame ondulato rappresenta il legame attraverso il quale il composto è legato al CBA):







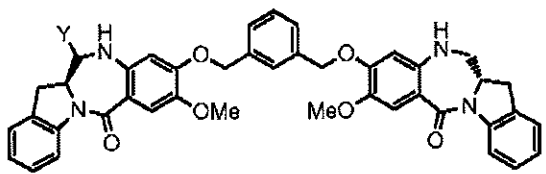
In alcune forme di realizzazione, X non è il gruppo legante. In alcune forme di realizzazione, la doppia linea == tra N e C rappresenta un singolo legame, Y non è -H.

5 In alcune forme di realizzazione, Y è -H o un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', - OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (*ad es.* piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina, *ecc.*), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido. In alcune forme di realizzazione, Y non è -H.

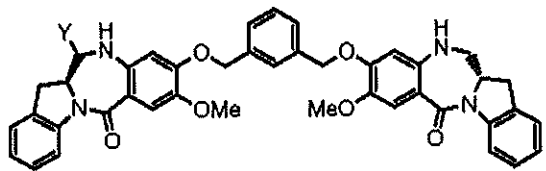
10 La presente invenzione comprende anche una composizione (*ad es.* una composizione farmaceutica) comprendente nuovi composti benzodiazepinici, loro derivati o loro coniugati (*e/o* loro solvati, idrati *e/o* sali) e un supporto (un supporto farmaceuticamente accettabile). La presente invenzione comprende inoltre una composizione (*ad es.* una composizione farmaceutica) comprendente nuovi composti benzodiazepinici, loro derivati o loro coniugati (*e/o* loro solvati, idrati *e/o* sali) e un supporto (un supporto farmaceuticamente accettabile), comprendente inoltre un secondo

agente terapeutico. Le presenti composizioni sono utili per inibire la crescita cellulare anomala o trattare un disturbo proliferativo in un mammifero (*ad es.* umano). Le presenti composizioni sono utili per trattare affezioni quali cancro, artrite reumatoide, sclerosi multipla, malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), rigetto di trapianto, lupus, miosite, infezioni, deficienza immunitaria come l'AIDS e malattie infiammatorie in un mammifero (*ad es.* umano).

- 5 La presente invenzione comprende anche un composto come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10 , un coniugato come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 11-22 o un composto rappresentato dalla seguente formula:



- 10 o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui Y è -H o -SO<sub>3</sub>M (ad es. Y è -SO<sub>3</sub>M), e M è -H o un suo catione farmaceuticamente accettabile per l'uso come medicinale. La presente invenzione comprende anche un composto come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10 , un coniugato come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 11-22 o un composto rappresentato dalla seguente formula:



- 15 o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui Y è -H o -SO<sub>3</sub>M (ad es. Y è -SO<sub>3</sub>M) e M è -H o un suo catione farmaceuticamente accettabile, per l'uso in un metodo per inibire la crescita cellulare anomala o per trattare un disturbo proliferativo, una malattia autoimmune, disturbo osseo-distruttivo, malattie infettive, malattie virali, malattie fibrotiche, disturbi neurodegenerativi, pancreatite o malattie renali in un mammifero (*ad es.* umano) comprendente la somministrazione a detto mammifero di una quantità terapeuticamente efficace di nuovi composti benzodiazepinici loro



derivati o coniugati (e/o loro solvati e sali) o una loro composizione, da soli o in combinazione con un secondo agente terapeutico. Viene anche descritto in questo contesto un metodo per sintetizzare e utilizzare nuovi composti benzodiazepinici, loro derivati e loro coniugati per la diagnosi o il trattamento *in vitro*, *in situ* e *in vivo* di cellule di mammiferi, organismi o condizioni patologiche associate.

5 I composti di questa invenzione, loro derivati o loro coniugati, e le composizioni che li comprendono, sono utili per trattare o ridurre la gravità dei disturbi come ad esempio caratterizzati da una crescita anomala delle cellule (*ad es.* cancro). Altre applicazioni dei composti e i coniugati di questa invenzione includono, tuttavia senza limitazione, il trattamento di affezioni quali cancro, artrite reumatoide, sclerosi multipla, malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), rigetto di trapianto, lupus, miosite, infezioni, deficienza immunitaria come l'AIDS e malattie infiammatorie in un  
10 mammifero (*ad es.* umano).

Come utilizzato in questo contesto, quando si fa riferimento a un gruppo (*ad es.* R<sup>c</sup>, L, X' *ecc.*), "è/essere" (oppure "non è") il gruppo legante o il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso significa che il gruppo "comprende" (o "non comprende") il gruppo legante o il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso.

#### BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

15 Le FIGG. 1-6 mostrano gli schemi di sintesi di composti benzodiazepinici e i corrispondenti composti legabili adatti per la coniugazione della presente invenzione.

La FIG. 7 mostra lo schema di sintesi di composti rappresentativi con linker PEG modificati della presente invenzione.

La FIG. 8 mostra lo schema di sintesi di composti rappresentativi con un linker metiltio della presente invenzione.

20 Le FIGG. 9-10 mostrano gli schemi di sintesi di composti rappresentativi contenenti un'ammina terziaria della presente invenzione.

La FIG. 11 mostra lo schema di sintesi di composti rappresentativi con un linker peptide della presente invenzione.

Le FIGG. 12-19 mostrano gli schemi di sintesi di composti rappresentativi adatti per metodi di coniugazione in una fase della presente invenzione.

La FIG. 20 mostra lo schema di una sintesi di un dimero di monoimmuna in due fasi.

25 La FIG. 21 mostra lo schema di una sintesi di un dimero di-ridotto in due fasi.



- La FIG. 22 mostra lo schema della sintesi in una fase dei coniugati anticorpo-farmaco rappresentativi.
- La FIG. 23 mostra lo schema della sintesi in due fasi dei coniugati anticorpo-farmaco rappresentativi.
- La FIG. 24 mostra la citotossicità *in vitro* del dimero metilditio Id contro linee cellulari Namalwa, KB e HL60/QC.
- La FIG. 25 mostra la citotossicità *in vitro* e la specificità dei coniugati huMy9-6-SPDB-1f contro varie linee cellulari. Si
- 5 noti che alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.
- La FIG. 26 mostra la citotossicità *in vitro* e la specificità dei coniugati huFOLRI-SPDB-1f.
- La FIG. 27 mostra che la coniugazione del dimero non riduce l'affinità di legame dell'anticorpo. Si noti che alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.
- La FIG. 28 mostra l'attività antitumorale *in vivo* del coniugato huMy9-6. Si noti che alla reazione di coniugazione è stato
- 10 aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.
- La FIG. 29 mostra la citotossicità *in vitro* del coniugato huMy9-6-SPDB-1f contro cellule antigene-positive. Si noti che alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.
- La FIG. 30 mostra lo schema di sintesi per realizzare disolfuri linker contenenti tioetere 27e-h.
- La FIG. 31 mostra lo schema di sintesi per realizzare dimeri 28c-f.
- 15 La FIG. 32 mostra lo schema di sintesi per realizzare dimeri legati a fenile 29b-c.
- La FIG. 33 mostra lo schema di una sintesi di dimeri di monoimmuna in due fasi alternativa.
- La FIG. 34 mostra la citotossicità *in vitro* di huMy9-6-SPDB-1f (A), huMy9-6- sulfoSPDB-1f (B) e huMy9-6-BMPS-1f (C) contro cellule HL60/QC (Ag<sup>+</sup>) con e senza blocco dei siti antigene-leganti. Si noti che in tutti e tre gli esperimenti (34A, 34B e 34C), alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.
- 20 La FIG. 35 mostra la citotossicità *in vitro* per chB38.1-SPDB-1f (A) e chB38.1- sulfoSPDB-1f (B) contro cellule COLO205 (Ag<sup>+</sup>). Si noti che in entrambi gli esperimenti, alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.
- La FIG. 36 mostra l'efficacia *in vivo* di huMy9-6-SPDB-1f in topi recanti HL60/QC. Si noti che alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio.
- 25 La FIG. 37 mostra l'efficacia *in vivo* di huFOLRI-SPDB-1f in topi portatori di tumore KB.



- La FIG. 38 mostra uno schema di sintesi del composto 1.
- La FIG. 39 mostra uno schema di sintesi del composto 1d con 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB).
- La FIG. 40 mostra uno schema di sintesi del composto 1d con triacetossiboroidruo di sodio (STAB).
- La FIG. 41 mostra uno schema di sintesi del composto 31a-c.
- 5 La FIG. 42 mostra uno schema di sintesi del composto 32c-d.
- La FIG. 43 mostra uno schema di sintesi dei composti 1i e 12a.
- La FIG. 44 mostra l'attività antiproliferativa attraverso il confronto di (A) huMy9-6-SPDB-1f, (B) huMy9-6-solfoSPDB-1f e (C) huMy9-6-BMPS-1f, contro cellule OCI-AML3 (Ag<sup>+</sup>) con e senza blocco dei siti antigene-leganti. Si noti che in tutti e tre gli esperimenti, alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.
- 10 La FIG. 45 mostra uno schema alternativo per sintetizzare acido 4-(benzilossi)-5-metossi-2-nitrobenzoico utilizzato nella preparazione del monomero IBD.
- La FIG. 46 è uno schema di sintesi alternativo per (5-((2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)(2-metil-2-(metildisolfanil)propil)ammino)-1,3-fenilen)dimetanolo (1b).
- La FIG. 47 è uno schema di sintesi alternativo per (5-((2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)(2-metil-2-
- 15 (metildisolfanil)propil)ammino)-1,3-fenilen)dimetanolo (1b).
- La FIG. 48 è uno schema di sintesi alternativo per la sintesi di un dimero di monoimmuna in due fasi.
- La FIG. 49 mostra la potenza di vari coniugati contro varie linee cellulari. I valori IC<sub>50</sub> elencati in tabella sono in unità di nM.
- La FIG. 50 mostra l'efficacia *in vivo* di huMy9-6-solfo-SPDB-1f in topi portatori di tumore MOLM-13.
- 20 La FIG. 51 mostra l'efficacia *in vivo* di huMy9-6-solfo-SPDB-1f in topi portatori di tumore NB4.
- La FIG. 52 mostra l'efficacia *in vivo* di huMy9-6-BMPS-1f in topi portatori di tumore HL60/QC.
- La FIG. 53 mostra l'efficacia *in vivo* di huMy9-6-BMPS-1f in topi portatori di tumore MOLM-13. Si noti che alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.
- La FIG. 54 mostra uno schema di sintesi rappresentativo per un coniugato di composto citotossico/folato solfonato.
- 25 La FIG. 55 mostra diversi coniugati farmaco solfonato-anticorpo rappresentativi con linker differenti.

La FIG. 56 mostra l'efficacia *in vivo* di huMy9-6-farmaco 2 in topi portatori di tumore HL60/QC. Si noti che alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.

La FIG. 57 mostra l'efficacia *in vivo* di huMy9-6-farmaco 2 in topi portatori di tumore MOLM-13. Si noti che alla reazione di coniugazione è stato aggiunto bisolfito di sodio per realizzare il coniugato.

5 La FIG. 58 mostra la simile citotossicità *in vitro* di HuMy9-6-Farmaco 2 (coniugati preparati con e senza bisolfito di sodio contro cellule HL60 di espressione dell'antigene CD33).

La FIG. 59 mostra la simile citotossicità *in vitro* di anti-CD22 Ab-Farmaco 2 (coniugati preparati con e senza bisolfito di sodio contro cellule BJAB di espressione dell'antigene CD22).

10 La FIG. 60 mostra la preparazione di huMy9-6-solfo-SPDB-1d utilizzando il linker altamente reattivo 4-nitroPy-solfo-SPDB.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Verrà ora fatto riferimento in dettaglio a determinate forme di realizzazione dell'invenzione, esempi delle quali sono illustrati nelle strutture e formule allegate.

15 Risulterà chiaro che qualsiasi delle forme di realizzazione descritte in questo contesto, comprese quelle descritte sotto diversi aspetti dell'invenzione (*ad es.* composti, molecole linker dei composti, coniugati, composizioni, metodi di realizzazione e utilizzo) e in diverse parti della descrizione (incluse forme di realizzazione descritte solo negli Esempi) può essere combinata con una o più altre forme di realizzazione dell'invenzione, se non esplicitamente indicato diversamente o improprio. La combinazione di forme di realizzazione non è limitata a quelle combinazioni specifiche rivendicate nelle rivendicazioni dipendenti multiple.

#### 20 DEFINIZIONI

“Alchile lineare o ramificato” come utilizzato in questo contesto si riferisce a un radicale saturo idrocarburico monovalente a catena lineare o ramificata avente da uno a venti atomi di carbonio. Esempi di alchile includono, tuttavia senza limitazione, metile, etile, 1-propile, 2-propile, 1-butile, 2-metil-1-propile,  $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , 2-butile, 2-metil-2-propile, 1-pentile, 2-pentil-3-pentile, 2-metil-2-butile, 3-metil-2-butile, 3-metil-1-butile, 2-metil-1-butile, 1-esile), 2-esile, 25 3-esile, 2-metil-2-pentile, 3-metil-2-pentile, 4-metil-2-pentile, 3-metil-3-pentile, 2-metil-3-pentile, 2,3-dimetil-2-butile,

3,3-dimetil-2-butile, 1-eptile, 1-ottile e simili. Preferibilmente, l'alchile ha da uno a dieci atomi di carbonio. Più preferibilmente, l'alchile ha da uno a quattro atomi di carbonio.

5 “Alchenile lineare o ramificato” si riferisce a un radicale idrocarburo monovalente a catena lineare o ramificata avente da due a venti atomi di carbonio con almeno un sito di insaturazione, vale a dire, un doppio legame carbonio-carbonio, in cui il radicale alchenile include radicali aventi orientamenti “cis” e “trans” o, in alternativa, orientamenti “E” e “Z”. Esempi includono, tuttavia senza limitazione, etilenile o vinile ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ), allile ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ) e simili. Preferibilmente, l'alchenile ha da due a dieci atomi di carbonio. Più preferibilmente, l'alchile ha da due a quattro atomi di carbonio.

10 “Alchinile lineare o ramificato” si riferisce a un radicale idrocarburo monovalente lineare o ramificato avente da due a venti atomi di carbonio con almeno un sito di insaturazione, vale a dire, un triplo legame carbonio-carbonio. Esempi includono, tuttavia senza limitazione, etinile, propinile, 1-butinile, 2-butinile, 1-pentinile, 2-pentinile, 3-pentinile, esinile e simili. Preferibilmente, l'alchinile ha da due a dieci atomi di carbonio. Più preferibilmente, l'alchinile ha da due a quattro atomi di carbonio.

15 I termini “carbociclo,” “carbociclile” e “anello carbociclico” si riferiscono a un anello monovalente non aromatico, saturo o parzialmente insaturo avente da 3 a 12 atomi di carbonio come anello monociclico o da 7 a 12 atomi di carbonio come anello biciclico. I carbocicli biciclici aventi da 7 a 12 atomi possono essere disposti, ad esempio, come sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] e i carbocicli biciclici aventi 9 o 10 atomi dell'anello possono essere disposti come sistema biciclo [5,6] o [6,6] o come sistemi a ponte, come biciclo[2.2.1]eptano, biciclo[2.2.2]ottano e biciclo[3.2.2]nonano. Esempi di carbocicli monociclici includono, tuttavia senza limitazione, ciclopropile, ciclobutile, 20 ciclopentile, 1-ciclopent-1-enile, 1-ciclopent-2-enile, 1-ciclopent-3-enile, cicloesile, 1-cicloes-1-enile, 1-cicloes-2-enile, 1-cicloes-3-enile, cicloesadienile, cicloeptile, cicloottile, ciclonoenile, ciclodecile, cicloundecile, ciclododecile e simili.

I termini “alchile ciclico” e “cicloalchile” possono essere utilizzati in modo intercambiabile. Essi si riferiscono a un radicale ad anello carbociclico saturo. Preferibilmente, l'alchile ciclico è un radicale ad anello monociclico avente da 3 a 7 elementi. Più preferibilmente, l'alchile ciclico è cicloesile.

25 Il termine “alchenile ciclico” si riferisce a un radicale ad anello carbociclico avente almeno un doppio legame

nella struttura ad anello.

Il termine “alchinile ciclico” si riferisce a un radicale ad anello carbociclico avente almeno un triplo legame nella struttura ad anello.

“Arile” indica un radicale idrocarburo aromatico monovalente avente 6-18 atomi di carbonio derivato dalla rimozione di un atomo di idrogeno da un singolo atomo di carbonio di un sistema anulare aromatico progenitore. Alcuni gruppi arilici sono rappresentati nelle strutture esemplificative come “Ar”. Arile include radicali biciclici comprendenti un anello aromatico fuso a un anello saturo, parzialmente insaturo o anello aromatico carbociclico o eterociclico. Gruppi arilici tipici includono, tuttavia senza limitazione, radicali derivati da benzene (fenile), benzeni sostituiti, naftalene, antracene, indenile, indanile, 1,2-diidronaftalene, 1,2,3,4-tetraidronaftile e simili. Preferibilmente, arile è un gruppo fenile.

I termini “eterociclo”, “eterociclice” e “anello eterociclico” sono utilizzati in modo intercambiabile in questo contesto e si riferiscono a un radicale carbociclico saturo o parzialmente insaturo (vale a dire, avente uno o più legami doppi e/o tripli nell'anello) avente da 3 a 18 atomi dell'anello in cui almeno un atomo dell'anello è un eteroatomo scelto tra azoto, ossigeno, fosforo e zolfo, i restanti atomi dell'anello essendo C, in cui uno o più atomi dell'anello sono opzionalmente indipendentemente sostituiti con uno o più sostituenti descritti di seguito. Un eterociclo può essere un monociclo avente da 3 a 7 elementi dell'anello (da 2 a 6 atomi di carbonio e da 1 a 4 eteroatomi scelti tra N, O, P e S) o un biciclo avente da 7 a 10 elementi dell'anello (da 4 a 9 atomi di carbonio e da 1 a 6 eteroatomi scelti tra N, O, P e S), ad esempio: un sistema abiciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Eterocicli sono descritti in Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W. A. Benjamin, New York, 1968), in particolare Capitoli 1, 3, 4, 6, 7 e 9; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950 a oggi), in particolare Volumi 13, 14, 16, 19 e 28; e J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. “Eterociclice” include anche radicali dove i radicali eterociclici sono fusi con un anello saturo, un anello parzialmente insaturo o un anello aromatico carbociclico o eterociclico. Esempi di anelli eterociclici includono, tuttavia senza limitazioni, pirrolidinile, tetraidrofurano, diidrofurano, tetraidrotienile, tetraidropirano, diidropirano, tetraidrotiopirano, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tiossanile, piperazinile, omopiperazinile, azetidino, ossetanile, tietanile, omopiperidinile, ossepanile, tiepanile, ossazepinile, diazepinile, tiazepinile, 2-pirrolinile, 3-pirrolinile, indolinile, 2H-pirano, 4H-pirano, diossanile, 1,3-



diossolanile, pirazolinile, ditanile, ditiolanile, diidropiranile, diidrotienile, diidrofuranile, pirazolidinilimidazolinile, imidazolidinile, 3-azabicyclo[3.1.0]esanile, 3-azabicyclo[4.1.0]eptanile e azabicyclo[2.2.2]esanile. Anche frazioni spiro sono incluse nell'ambito della presente definizione. Esempi di un gruppo eterociclico in cui atomi dell'anello sono sostituiti con frazioni osso (=O) sono pirimidinonile e 1,1-diosso-tiomorfolinile.

5 Il termine "eteroarile" si riferisce a un radicale aromatico monovalente di anelli a 5 o 6 elementi e include sistemi anulari fusi (almeno uno dei quali è aromatico) aventi 5-18 atomi, contenenti uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo. Esempi di gruppi eteroarilici sono piridinile (incluso ad esempio 2-idrossipiridinile), imidazolile, imidazopiridinile (incluso ad esempio 4-idrossipirimidinile), pirimidinile, pirazolile, triazolile, pirazinile, tetrazolile, furile, tienile, isossazolile, tiazolile, ossazolile, isotiazolile, pirrolile, chinolinile, isochinolinile, indolile, 10 benzimidazolile, benzofuranile, cinnolinile, indazolile, indolizinile, ftalazinile, piridazinile, triazinile, isoindolile, pteridinile, purinile, ossadiazolile, triazolile, tiadiazolile, furazanile, benzofurazanile, benzotiofenile, benzotiazolile, benzossazolile, chinazolinile, chinossalinile, naftiridinile e fuopiridinile.

I gruppi eterociclici o eteroarilici possono essere legati a carbonio (carbonio-legati) o azoto (azoto-legati), dove ciò è possibile. A titolo esemplificativo e non limitativo, eterocicli o eteroarili con legami carbonio sono legati in 15 corrispondenza della posizione 2, 3, 4, 5 o 6 di una piridina, posizione 3, 4, 5 o 6 di una piridazina, posizione 2, 4, 5 o 6 di una pirimidina, posizione 2, 3, 5 o 6 di una pirazina, posizione 2, 3, 4 o 5 di un furano, tetraidrofurano, tiofurano, tiofene, pirrolo o tetraidropirrolo, posizione 2, 4 o 5 di un ossazolo, imidazolo o tiazolo, posizione 3, 4 o 5 di un isossazolo, pirazolo o isotiazolo, posizione 2 o 3 di un'aziridina, posizione 2, 3 o 4 di un'azetidina, posizione 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 di una chinolina o posizione 1, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 di un'isochinolina.

20 A titolo esemplificativo e non limitativo, eterocicli o eteroarili con legami azoto sono legati in corrispondenza della posizione 1 di un'aziridina, azetidina, pirrolo, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazolo, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazolo, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indolo, indolina, 1H-indazolo, posizione 2 di un isoindolo, o isoindolina, posizione 4 di una morfolina e posizione 9 di un carbazolo, o O-carbolina.

25 Gli eteroatomi presenti in eteroarile o eterocicliche comprendono le forme ossidate come NO, SO e SO<sub>2</sub>.

Il termine "alo" o "alogeno" si riferisce a F, Cl, Br o I.

L'alchile, alchenile, alchinile, alchile ciclico, alchenile ciclico, alchinile ciclico, carbociclice, arile, eterociclice ed eteroarile descritti in precedenza possono essere opzionalmente sostituiti con uno o più (*ad es.* 2, 3, 4, 5, 6 o più) sostituenti.

5           Se un sostituente è descritto come "sostituito", un sostituente non idrogeno è in luogo di un sostituente idrogeno su carbonio, ossigeno, zolfo o azoto del sostituente. Pertanto, ad esempio, un sostituente alchilico sostituito è un sostituente alchilico in cui almeno un sostituente non idrogeno è in luogo di un sostituente idrogeno sul sostituente alchilico. A scopo illustrativo, monofluoroalchile è alchile sostituito con un sostituente fluoro e difluoroalchile è alchile sostituito con due sostituenti fluoro. Risulterà chiaro che se vi è più di una sostituzione su un sostituente, ciascun  
10           sostituente non idrogeno può essere identico o differente (se non indicato diversamente).

          Se un sostituente è descritto come "opzionalmente sostituito", il sostituente può essere (1) non sostituito o (2) sostituito. Se un carbonio di un sostituente è descritto come opzionalmente sostituito con uno o più di un elenco di sostituenti, uno o più idrogeni sul carbonio (purché ve ne siano) possono essere separatamente e/o insieme sostituiti con un sostituente opzionale scelto in modo indipendente. Se un azoto di un sostituente è descritto come opzionalmente  
15           sostituito con uno o più di un elenco di sostituenti, uno o più idrogeni sull'azoto (purché ve ne siano) possono essere ciascuno sostituito con un sostituente opzionale scelto in modo indipendente. Un sostituente esemplificativo può essere descritto come -NR'R", in cui R' e R" insieme all'atomo di azoto al quale sono attaccati possono formare un anello eterociclico. L'anello eterociclico formato da R' e R" insieme all'atomo di azoto al quale sono attaccati può essere parzialmente o completamente saturo. In una forma di realizzazione, l'anello eterociclico è costituito da 3 a 7 atomi. In  
20           un'altra forma di realizzazione, l'anello eterociclico è scelto dal gruppo costituito da pirrolile, imidazolile, pirazolile, triazolile, tetrazolile, isossazolile, piridile e tiazolile.

La presente descrizione utilizza i termini "sostituente", "radicale" e "gruppo" in modo intercambiabile.

          Se un gruppo di sostituenti viene collettivamente descritto come opzionalmente sostituito da uno o più di un elenco di sostituenti, il gruppo può comprendere: (1) sostituenti insostituibili, (2) sostituenti sostituibili che non sono  
25           sostituiti dai sostituenti opzionali, e/o (3) sostituenti sostituibili che sono sostituiti da uno o più dei sostituenti opzionali.

Se un sostituito è descritto come opzionalmente sostituito con fino a un determinato numero di sostituenti non idrogeno, tale sostituito può essere (1) non sostituito; o (2) sostituito con fino a quel determinato numero di sostituenti non idrogeno o fino al numero massimo di posizioni sostituibili sul sostituito, qualunque sia inferiore. Pertanto, ad esempio, se un sostituito è descritto come un eteroarile opzionalmente sostituito con fino a 3 sostituenti non idrogeno, allora qualsiasi eteroarile con meno di 3 posizioni sostituibili sarebbe opzionalmente sostituito con fino a solo il numero di sostituenti non idrogeno corrispondente alle posizioni sostituibili dell'eteroarile. Tali sostituenti, in esempi non limitativi, possono essere scelti tra un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile, eteroarile, eterociclice, alogeno, guanidina  $[-NH(C=NH)NH_2]$ ,  $-OR^{100}$ ,  $NR^{101}R^{102}$ ,  $-NO_2$ ,  $-NR^{101}COR^{102}$ ,  $-SR^{100}$ , un solfossido rappresentato da  $-SOR^{101}$ , un solfone rappresentato da  $-SO_2R^{101}$ , un solfonato  $-SO_3M$ , un solfato  $-OSO_3M$ , una solfonammide rappresentata da  $-SO_2NR^{101}R^{102}$ , ciano, un azido,  $-COR^{101}$ ,  $-OCOR^{101}$ ,  $-OCONR^{101}R^{102}$  e un'unità polietilenglicolica  $(-OCH_2CH_2)_nR^{101}$  in cui M è H o un catione (come  $Na^+$  or  $K^+$ );  $R^{101}$ ,  $R^{102}$  e  $R^{103}$  sono ciascuno indipendentemente scelti tra H, alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $(-OCH_2CH_2)_nR^{104}$ , in cui n è un numero intero da 1 a 24, un arile avente da 6 a 10 atomi di carbonio, un anello eterociclico avente da 3 a 10 atomi di carbonio e un eteroarile avente da 5 a 10 atomi di carbonio; e  $R^{104}$  è H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio, in cui l'alchile, alchenile, alchinile, arile, eteroarile ed eterociclice nei gruppi rappresentati da  $R^{100}$ ,  $R^{101}$ ,  $R^{102}$ ,  $R^{103}$  e  $R^{104}$  sono opzionalmente sostituiti con uno o più (*ad es.* 2, 3, 4, 5, 6 o più) sostituenti indipendentemente scelti tra alogeno,  $-OH$ ,  $-CN$ ,  $-NO_2$  e un alchile lineare o ramificato non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio. Preferibilmente, i sostituenti per l'alchile, alchenile, alchinile, alchile ciclico, alchenile ciclico, alchinile ciclico, carbociclice, arile, eterociclice ed eteroarile opzionalmente sostituiti descritti in precedenza comprendono alogeno,  $-CN$ ,  $-NR^{102}R^{103}$ ,  $-CF_3$ ,  $-OR^{101}$ , arile, eteroarile, eterociclice,  $-SR^{101}$ ,  $-SOR^{101}$ ,  $-SO_2R^{101}$  e  $-SO_3M$ .

Il termine "composto" o "composto citotossico", "dimero citotossico" e "composto dimerico citotossico" sono utilizzati in modo intercambiabile. Essi sono intesi a includere composti per i quali nella presente invenzione sia stata descritta una struttura o formula o qualsiasi loro derivato. Il termine comprende anche stereoisomeri, isomeri geometrici, tautomeri, solvati, metaboliti, sali (*ad es.* sali farmaceuticamente accettabili) e profarmaci e sali profarmaco di un

composto di tutte le formule descritte nella presente invenzione. Il termine include anche eventuali solvati, idrati e polimorfi di qualsiasi dei precedenti. L'indicazione specifica di "stereoisomeri", "isomeri geometrici", "tautomeri", "solvati", "metaboliti", "sale" "profarmaco", "sale profarmaco", "coniugati", "sali coniugati", "solvato," "idrato" o "polimorfo" in alcuni aspetti dell'invenzione descritta in questa descrizione non deve essere interpretata come una  
5 omissione intenzionale di queste forme in altri aspetti dell'invenzione in cui viene utilizzato il termine "composto" senza indicazione di queste altre forme.

Il termine "coniugato" come utilizzato in questo contesto si riferisce a un composto descritto in questo contesto o a un suo derivato che è legato a un agente legante cellulare.

10 Il termine "legabile a un agente legante cellulare" come utilizzato in questo contesto si riferisce ai composti descritti in questo contesto o ai loro derivati comprendenti almeno un gruppo legante o un suo precursore adatto per legare tali composti o loro derivati a un agente legante cellulare.

Il termine "precursore" di un dato gruppo si riferisce a qualsiasi gruppo che può portare a tale gruppo mediante qualsiasi deprotezione, una modificazione chimica o una reazione di accoppiamento.

15 Il termine "legato a un agente legante cellulare" si riferisce a una molecola coniugata comprendente almeno uno dei composti descritti in questo contesto (*ad es.* composti di formula (I)-(IV) e (VIII)-(XI) e composti farmaco-linker descritti in questo contesto) o un loro derivato legato a un agente legante cellulare tramite un gruppo legante adatto o un suo precursore.

Il termine "chirale" si riferisce a molecole che hanno la proprietà di non sovrapponibilità del partner speculare, mentre il termine "achirale" si riferisce a molecole che sono sovrapponibili al loro partner speculare.

20 Il termine "stereoisomero" si riferisce a composti che hanno identica composizione chimica e connettività, ma diversi orientamenti dei loro atomi nello spazio che non possono essere interconvertiti per rotazione attorno a legami singoli.

25 "Diastereomero" si riferisce a uno stereoisomero con due o più centri di chiralità e le cui molecole non sono immagini speculari l'una dell'altra. I diastereomeri hanno proprietà fisiche differenti, *ad es.* punti di fusione, punti di ebollizione, proprietà spettrali e reattività. Le miscele di diastereoisomeri possono separarsi con procedure di analisi ad



alta risoluzione come cristallizzazione, elettroforesi e cromatografia.

“Enantiomeri” si riferisce a due stereoisomeri di un composto che sono immagini speculari l'uno dell'altro non sovrapponibili.

Definizioni stereochemiche e convenzioni utilizzate in questo contesto seguono generalmente S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; ed Eliel, E. e Wilen, S., “Stereochemistry of Organic Compounds,” John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. I composti dell'invenzione possono contenere centri chirali o asimmetrici e pertanto esistono in diverse forme stereoisomeriche. Si intende che tutte le forme stereoisomeriche dei composti dell'invenzione, inclusi tuttavia senza limitazioni, diastereomeri, enantiomeri e atropisomeri, come anche loro miscele come miscele racemiche, fanno parte della presente invenzione. Esistono molti composti organici in forme otticamente attive, vale a dire, hanno la capacità di ruotare il piano della luce piano polarizzata. Nel descrivere un composto otticamente attivo, vengono utilizzati i prefissi D e L o R e S per denotare la configurazione assoluta della molecola attorno al suo centro o centri chirali. I prefissi d e l o (+) e (-) sono impiegati per designare il segno di rotazione della luce piano polarizzata dal composto, con (-) o l indicante che il composto è levorotatorio. Un composto con il prefisso (+) o d è destrorotatorio. Per una data struttura chimica, questi stereoisomeri sono identici tranne per il fatto che sono immagini speculari l'uno dell'altro. Uno stereoisomero specifico può essere indicato anche come un enantiomero e una miscela di tali isomeri è spesso chiamata miscela enantiomerica. Una miscela 50:50 di enantiomeri è indicata come una miscela racemica o un racemato, che può verificarsi se non vi è stata alcuna stereoselezione o stereospecificità in una reazione o processo chimico. I termini "miscela racemica" e "racemato" si riferiscono a una miscela equimolare di due specie enantiomeriche, priva di attività ottica.

Il termine “tautometro” o “forma tautomerica” si riferisce a isomeri strutturali aventi energie differenti che sono interconvertibili mediante una barriera a bassa energia. Ad esempio, tautomeri protonici (noti anche come tautomeri prototropici) includono interconversioni per migrazione di un protone, come isomerizzazioni di cheto-enolo e immino-enammina. I tautomeri di valenza includono interconversioni per riorganizzazione di alcuni degli elettroni di legame.

Il termine “profarmaco” come utilizzato in questa domanda di brevetto si riferisce a un precursore o una forma derivata di un composto dell'invenzione che è in grado di essere enzimaticamente o idroliticamente attivato o convertito

nella forma analoga più attiva. Si veda *ad es.* Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pagg. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) e Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (a cura di), pagg. 247-267, Humana Press (1985). I profarmaci della presente invenzione includono, tuttavia senza limitazione, profarmaci contenenti esteri, profarmaci  
5 contenenti fosfato, profarmaci contenenti tiofosfato, profarmaci contenenti solfato, profarmaci contenenti peptide, profarmaci D-aminoacido-modificati, profarmaci glicosilati, profarmaci contenenti  $\beta$ -lattame, profarmaci contenenti fenossiacetammide opzionalmente sostituito o profarmaci contenenti fenilacetammide opzionalmente sostituito, 5-fluorocitosina e altri profarmaci di 5-fluorouridina che possono essere convertiti nel farmaco libero citotossico più attivo. Esempi di farmaci citotossici che possono essere derivatizzati in una forma di profarmaco per l'uso nella presente  
10 invenzione includono, tuttavia senza limitazione, composti dell'invenzione e agenti chemioterapici descritti in precedenza.

Il termine "profarmaco" intende anche includere un derivato di un composto che può idrolizzare, ossidare o diversamente reagire in condizioni biologiche (*in vitro* o *in vivo*) per fornire un composto della presente invenzione. I profarmaci possono diventare attivi solo con tale reazione in condizioni biologiche o possono avere attività nelle loro forme non reagite. Esempi di profarmaci contemplati nella presente invenzione includono, tuttavia senza limitazione,  
15 analoghi o derivati di composti di una qualsiasi delle formule descritte in questo contesto che comprendono frazioni bioidrolizzabili come ammidi bioidrolizzabili, esteri bioidrolizzabili, carbammati bioidrolizzabili, carbonati bioidrolizzabili, ureidi bioidrolizzabili e analoghi di fosfato bioidrolizzabili. Altri esempi di profarmaci includono i derivati dei composti di una qualsiasi delle formule descritte in questo contesto che comprendono frazioni -NO, -NO<sub>2</sub>, -ONO o -ONO<sub>2</sub>. I profarmaci possono essere tipicamente preparati utilizzando metodi ben noti, come quelli descritti da  
20 Burger in Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (a cura di Manfred E. Wolff, 5<sup>a</sup> ed.); si veda anche Goodman e Gilman, The Pharmacological basis of Therapeutics, 8a ed., McGraw-Hill, Int. Ed. 1992, "Biotransformation of Drugs."

Una forma preferita di profarmaco dell'invenzione include composti (con o senza gruppi linker) e coniugati dell'invenzione comprendenti un addotto formato tra un legame imminico dei composti/coniugati e un reagente imminore-  
25 reattivo. Un'altra forma preferita di profarmaco dell'invenzione comprende composti come quelli di formula (I) - (IV), in

cui quando la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un legame singolo, X è H o un gruppo protettivo dell'ammina e il composto diventa un profarmaco. Un profarmaco dell'invenzione può contenere una o entrambe le forme di profarmaci descritte in questo contesto (*ad es.* contenente un addotto formato tra un legame imminico dei composti/coniugati e un reagente immina-reattivo e/o contenente un gruppo uscente Y quando X è -H).

5 Il termine "Reagente immina-reattivo" si riferisce a un reagente che è in grado di reagire con un gruppo imminico. Esempi di reagenti immina-reattivi includono, tuttavia senza limitazione, solfiti ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_2$  o un sale di  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  o  $\text{HSO}_2$  formato con un catione), metabisolfito ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  o un sale di  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$  formato con un catione), mono-, di-, tri- e tetra-tiofosfati ( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_3$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_3$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_3$  o un sale di  $\text{PO}_3\text{S}^{3-}$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  o  $\text{PS}_4^{3-}$  formato con un catione), esteri tiofosfato ( $(\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ ,  $\text{R}^i\text{SH}$ ,  $\text{R}^i\text{SOH}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_2\text{H}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_3\text{H}$ ), varie ammine (ammina idrossile (*ad es.*  $\text{NH}_2\text{OH}$ ), idrazina (*ad es.*  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ),  $\text{NH}_2\text{-R}^i$ ,  $\text{R}^i\text{NH-R}^i$ ,  $\text{NH}_2\text{-R}^i$ ),  $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$ ,  $\text{NH}_2\text{-C(=S)-NH}_2$ ), tiosolfato ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$  o un sale di  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  formato con un catione), ditionite ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_4$  o un sale di  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  formato con un catione), fosforoditioato ( $\text{P(=S)(OR}^k\text{)(SH)(OH)}$  o un suo sale formato con un catione), acido idrossamico ( $\text{R}^k\text{C(=O)NHOH}$  o un sale formato con un catione), idrazide ( $\text{R}^k\text{CONHNH}_2$ ), formaldeide solfoilato ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{H}$  o un sale di  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2$  formato con un catione, come  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{-Na}^+$ ), nucleotide glicato (come GDP-mannosio), fludarabina o una loro miscela, in cui  $\text{R}^i$  e  $\text{R}^i$  sono ciascuno indipendentemente un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 10 atomi di carbonio e sono sostituiti con almeno un sostituito scelto tra  $\text{-N(R}^j\text{)}_2$ ,  $\text{-CO}_2\text{H}$ ,  $\text{-SO}_3\text{H}$ , e  $\text{-PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^j$  e  $\text{R}^j$  possono essere ulteriormente opzionalmente sostituiti con un sostituito per un alchile descritto in questo contesto;  $\text{R}^j$  è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio; e  $\text{R}^k$  è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile, eterociclice o eteroarile (preferibilmente,  $\text{R}^k$  è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; più preferibilmente,  $\text{R}^k$  è metile, etile o propile). Preferibilmente, il catione è un catione monovalente, come  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}$ . Preferibilmente, il reagente immina-reattivo è scelto tra solfiti, ammina idrossile, urea e idrazina. Più preferibilmente, il reagente immina-reattivo è  $\text{NaHSO}_3$  o  $\text{KHSO}_3$ .

25 Come utilizzato in questo contesto e salvo diversa indicazione, i termini "ammide bioidrolizzabile", "estere bioidrolizzabile", "carbammato bioidrolizzabile", "carbonato bioidrolizzabile", "ureide bioidrolizzabile" e "analogo di fosfato bioidrolizzabile" indicano un'ammide, estere, carbammato, carbonato, ureide o analogo di fosfato, rispettivamente,



che: 1) non distrugge l'attività biologica del composto e impartisce a tale composto proprietà vantaggiose *in vivo*, come assorbimento, durata di azione o insorgenza di azione; oppure 2) è biologicamente inattivo di per sé ma è convertito *in vivo* in un composto biologicamente attivo. Esempi di ammidi bioidrolizzabili includono, tuttavia senza limitazione, ammidi di alchile inferiore, ammidi di alfa-ammino acidi, ammidi di alcossiacile e ammidi di alchilamminoalchilcarbonile. Esempi di esteri bioidrolizzabili includono, tuttavia senza limitazione, esteri di alchile inferiore, esteri alcossiacilossi, esteri di alchilacilamminoalchile ed esteri di colina. Esempi di carbammati bioidrolizzabili includono, tuttavia senza limitazione, alchilammine inferiori, etilendiammine sostituite, amminoacidi, idrossialchilammine, ammine eterocicliche ed eteroaromatiche e ammine polietere. Profarmaci e sali di profarmaci particolarmente preferiti sono quelli che aumentano la biodisponibilità dei composti della presente invenzione quando tali composti vengono somministrati a un mammifero.

La frase "sale farmaceuticamente accettabile" come utilizzata in questo contesto si riferisce a sali organici o inorganici farmaceuticamente accettabili di un composto dell'invenzione. Sali esemplificativi includono, tuttavia senza limitazione, solfato, citrato, acetato, ossalato, cloruro, bromuro, ioduro, nitrato, bisolfato, fosfato, fosfato acido, isonicotinato, lattato, salicilato, citrato acido, tartrato, oleato, tannato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, saccarato, formiato, benzoato, glutammato, metansolfonato "mesilato", etansolfonato, benzensolfonato, p-toluensolfonato, pamoato (*vale a dire*, sali 1,1'-metilen-bis-(2-idrossi-3-naftoato)), metallo alcalino (*ad es.* sali di sodio e potassio), metallo alcalino terroso (*ad es.* magnesio) e sali di ammonio. Un sale farmaceuticamente accettabile può comportare l'inclusione di un'altra molecola, come uno ione acetato, uno ione succinato o altro controione. Il controione può essere qualsiasi frazione organica o inorganica che stabilizza la carica sul composto parentale. Inoltre, un sale farmaceuticamente accettabile può avere più di un atomo caricato nella sua struttura. I casi in cui più atomi caricati fanno parte del sale farmaceuticamente accettabile possono avere più controioni. Quindi, un sale farmaceuticamente accettabile può avere uno o più atomi caricati e/o uno o più controioni.

Se il composto dell'invenzione è una base, il sale farmaceuticamente accettabile desiderato può essere preparato mediante qualsiasi metodo adatto disponibile nella tecnica, ad es. il trattamento della base libera con un acido inorganico, come acido cloridrico, acido bromidrico, acido solforico, acido nitrico, acido metansolfonico, acido fosforico e simili o

5 con un acido organico, come acido acetico, acido maleico, acido succinico, acido mandelico, acido fumarico, acido malonico, acido piruvico, acido ossalico, acido glicolico, acido salicilico, un acido piranosidile, come acido glucuronico o acido galatturonico, un alfaidrossiacido, come acido citrico o acido tartarico, un amminoacido, come acido aspartico o acido glutammico, un acido aromatico, come acido benzoico o acido cinnamico, un acido solfonico, come acido p-toluensolfonico o acido etansolfonico o simili.

10 Se il composto dell'invenzione è un acido, il sale farmaceuticamente accettabile desiderato può essere preparato mediante qualsiasi metodo adatto, ad. es. trattamento dell'acido libero con una base inorganica oppure organica, come un'ammina (primaria, secondaria o terziaria), un idrossido di metallo alcalino o idrossido di metallo alcalino-terroso o simili. Esempi illustrativi di sali adatti includono, tuttavia senza limitazioni, sali organici derivati da amminoacidi, come glicina e arginina, ammoniaca, ammine primarie, secondarie e terziarie, e ammine cicliche, come piperidina, morfolina e piperazina, e sali inorganici derivati da sodio, calcio, potassio, magnesio, manganese, ferro, rame, zinco, alluminio e litio.

15 Come utilizzato in questo contesto, il termine "solvato" si riferisce a un composto che comprende inoltre una quantità stechiometrica o non stechiometrica di solvente come acqua, isopropanolo, acetone, etanolo, metanolo, DMSO, etilacetato, acido acetico ed etanolamina diclorometano, 2-propanolo o simili, legato mediante forze intermolecolari non covalenti. Solvati o idrati dei composti sono preparati facilmente mediante l'aggiunta di almeno un equivalente molare di un solvente idrossilico come metanolo, etanolo, 1-propanolo, 2-propanolo o acqua al composto per dare come risultato la solvatazione o idratazione della frazione immina.

20 I termini "crescita cellulare anomala" e "disturbo proliferativo" sono utilizzati in modo intercambiabile nella presente domanda di brevetto. "Crescita cellulare anomala", come utilizzato in questo contesto, tranne se diversamente indicato, si riferisce alla crescita cellulare che è indipendente dai meccanismi regolatori normali (ad es. perdita di inibizione da contatto). Questa include ad esempio la crescita anomala di: (1) cellule tumorali (tumori) che proliferano mediante espressione di una tirosin-chinasi mutata o sovraespressione di una tirosin-chinasi del recettore; (2) cellule benigne e maligne di altre patologie proliferative in cui si verifica l'attivazione di tirosin-chinasi aberrante, (3) qualsiasi tumore che prolifera mediante tirosin-chinasi del recettore; (4) qualsiasi tumore che prolifera mediante attivazione di serina/treonina chinasi aberrante; e (5) cellule benigne e maligne di altre patologie proliferative in cui si verifica

25

attivazione di serina/treonina chinasi aberrante.

I termini “cancro” e “canceroso” si riferiscono a o descrivono la condizione fisiologica nei mammiferi che è tipicamente caratterizzata da crescita cellulare non regolata. Un “tumore” comprende una o più cellule cancerose e/o cellule benigne o precancerose. Esempi di cancro includono, tuttavia senza limitazioni, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia o patologie linfoidi maligne. Ulteriori esempi particolari di tali cancri comprendono cancro a cellule squamose (ad esempio carcinoma a cellule squamose epiteliali), cancro del polmone tra cui cancro del polmone a piccole cellule, cancro del polmone non a piccole cellule (“NSCLC”), adenocarcinoma del polmone e carcinoma squamoso del polmone, carcinoma del peritoneo, carcinoma epatocellulare tra cui cancro gastrointestinale, cancro del pancreas, glioblastoma, cancro della cervice, cancro dell'ovaio, cancro del fegato, cancro della vescica, epatoma, tumore al seno, cancro al colon, cancro del retto, cancro del colon-retto, carcinoma dell'endometrio o dell'utero, carcinoma delle ghiandole salivari, cancro del rene o renale, cancro alla prostata, cancro vulvare, cancro della tiroide, carcinoma epatico, carcinoma anale, carcinoma del pene e carcinoma di testa/cervello e collo, leucemia acuta, cancri degli organi linfatici e malignità ematologiche tra cui leucemia (leucemia linfoblastica acuta (LLA), leucemia mieloide acuta (LMA), leucemia linfocitica cronica (LLC), leucemia mieloide cronica (LMC), leucemia monocitica acuta (AMOL), leucemia a cellule capellute (LCC), leucemia promielocitica a cellule T (T-PLL), grande leucemia linfocitica granulosa, leucemia a cellule T adulte), linfoma (piccolo linfoma linfocitico (PLL), linfomi di Hodgkin (linfoma di Hodgkin a sclerosi nodulare, a cellularità mista, ricco in linfociti, con o senza linfocitopenia e a predominanza linfocitaria nodulare), linfomi non-Hodgkin (tutti i sottotipi), leucemia linfocitica cronica/piccolo linfoma linfocitico, leucemia prolinfocitica a cellule B, linfoma linfoplasmacitico (come macroglobulinemia di Waldenstrom), linfoma della zona marginale splenica, neoplasie delle plasmacellule (mieloma delle plasmacellule, plasmocitoma, malattie di deposito di immunoglobuline monoclonali, malattie delle catene pesanti), linfoma a cellule B della zona marginale extranodale (linfoma MALT), linfoma a cellule B della zona marginale nodale (NMZL), linfoma follicolare, linfoma delle cellule del mantello, linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma a grandi cellule B del mediastino (timo), linfoma intravascolare a grandi cellule B, linfoma a effusione primaria, linfoma/leucemia di Burkitt, leucemia prolinfocitica a cellule T, leucemia linfocitica granulosa a grandi cellule T, leucemia aggressiva a cellule NK, leucemia/ linfomi a cellule T adulte, linfoma a cellule NK/T extranodali (tipo nasale),



linfoma a cellule T tipo enteropatia, linfoma a cellule T epatosplenico, linfoma a cellule NK blastiche, micosi fungoide/sindrome di Sezary, disordini linfoproliferativi a cellule T primarie CD30-positivo cutanee, linfoma anaplastico a grandi cellule cutanee primarie, papulosi linfomatoide, linfoma a cellule T angioimmunoblastiche, linfoma periferico a cellule T (non specificate), linfoma anaplastico a grandi cellule), mieloma multiplo (mieloma delle plasmacellule o malattia di Kahler).

Un "agente terapeutico" comprende sia un agente biologico come un anticorpo, un peptide, una proteina, un enzima o un agente chemioterapico.

Un "agente chemioterapico" è un composto chimico utile nel trattamento del cancro. Esempi di agenti chemioterapici includono Erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), Bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), Fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), Sutent (SU11248, Pfizer), Letrozole (FEMARA®, Novartis), Imatinib mesilato (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), Oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracile), Leucovorina, Rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), Lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafamib (SCH 66336), Sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs) e Gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agenti alchilanti come tiotepa e CYTOXAN® ciclofosfamide; alchilsolfonati come busulfano, improsulfano e piposulfano; aziridine come benzodopa, carboquone, meturedopa e uredopa; etilenimine e metilmelamine, incluse altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamide, trietilenfosforamide e trimetilmelamina; acetogenine (in particolare bullatacina e bullatacinone); una camptotecina (incluso l'analogo sintetico topotecan); briostatina; callistatina; CC-1065 (inclusi i suoi analoghi sintetici adozelesina, carzelesina e bizelesina); criptoficine (in particolare criptoficina 1 e criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (inclusi gli analoghi sintetici KW-2189 e CBI-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; spongistatina; azotipriti come clorambucile, clornafazina, clorofosfamide, estramustina, ifosfamide, mecloretamina, mecloretamina cloridrato ossido, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamide, mostarda di uracile; nitrosuree quali carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina e ranimustina; antibiotici quali gli antibiotici enedina (*ad es.* calicheamicina, in particolare calicheamicina gammall e calicheamicina omegall (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186; dinemicina, inclusa dinemicina A; una esperamicina; nonché cromoforo neocarzinostatina e cromofori

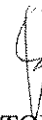


antibiotici di cromoproteina correlati), aclacinomisine, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicine, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-osso-L-norleucina, ADRIAMYCIN® doxorubicina (inclusi morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina e deossidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicine quali mitomicina  
5 C, acido micofenolico, nogalamicina, olivomicine, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, streptonigrina, streptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metaboliti quali metotrexato e 5-fluorouracile (5-FU); analoghi di acido folico quali denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; analoghi di purina quali fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; analoghi di pirimidina quali ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideossiridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; androgeni quali calusterone,  
10 dromostanolone propionato, epitiostanolo, mepitioetano, testolattone; anti-adrenali quali amminoglutetimide, mitotano, trilostano; riempitori di acido folico quali acido frolinico; aceglatone; aldofosfamido glicoside; acido aminolevulinico; eniluracile; amsacrina; bestrabucil; bisantrene; edatratato; defofamina; demecolcina; diaziqone; elfornitina; elliptinio acetato; un eptilone; etoglucide; nitrato di gallio; idrossiurea; lentinano; lonidainina; maytansinoidi quali maytansina e ansamitocine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidanmolo; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrone;  
15 acido podofillinico; 2-etilidrazide; procarbazine; complesso di polisaccaride PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; spirogermanio; acido tenuazonico; triaziqone; 2,2',2''-triclorotrietilammina; tricoteceni (soprattutto tossina T-2, verracurina A, roridina A e anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitolo; mitolattolo; pipobromano; gacitosina; arabinoside ("Ara-C"); ciclofosfammide; tiotepa; taxoidi, *ad es.* TAXOL® (paclitaxel; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE® (privo di Cremophor),  
20 formulazioni di paclitaxel in nanoparticelle ingegnerizzata con albumina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) e TAXOTERE® (doxetaxel; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambucile; GEMZAR® (gemcitabina); 6- tioguanina; mercaptapurina; metotrexato; analoghi del platino quali cisplatino e carboplatino; vinblastina; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitoxantrone; vincristina; NAVELBINE® (vinorelbina); novantrone; teniposide; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®); ibandronato; CPT-11; inibitore della  
25 topoisomerasi RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoidi come acido retinoico; e sali, acidi e derivati

farmaceuticamente accettabili di qualsiasi dei precedenti.

Sono anche inclusi nella definizione di "agente chemioterapico": (i) agenti anti-ormonali che agiscono in modo da regolare o inibire l'azione ormonale su tumori come antiestrogeni e modulatori selettivi del recettore per gli estrogeni (SERM) tra cui, ad esempio, tamoxifene (tra cui NOLVADEX®; tamoxifene citrato), raloxifene, drolossifene, 4-idrossitamoxifene, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone e FARESTON® (toremifine citrato); (ii) inibitori dell'aromatasi, che inibiscono l'enzima aromatasi che regola la produzione estrogenica nelle ghiandole surrenali, come ad esempio 4, (5)-imidazoli, amminoglutetimmide, MEGASE® (megestrol acetato), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestanie, fadrozolo, RIVISOR® (vorozolo), FEMARA® (letrozolo; Novartis) e ARIMIDEX® (anastrozolo; AstraZeneca); (iii) anti-androgeni come flutammide, nilutamide, bicalutammide, leuprolide, e goserelina; nonché troxacitabina (un analogo 1,3-diossolano del nucleoside citosina); (iv) inibitori di protein chinasi; (v) inibitori di lipide chinasi; (vi), oligonucleotidi antisenso, in particolare quelli che inibiscono l'espressione di geni nelle vie di segnalazione coinvolte nella proliferazione cellulare aberrante, come ad esempio PKC alfa, Ralf e H-Ras; (vii) ribozimi, come inibitori dell'espressione di VEGF (ad esempio Angiozyme®) e inibitori dell'espressione di HER2; (viii) vaccini come vaccini di terapia genica, ad esempio ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® e VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; un inibitore della topoisomerasi I come LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agenti anti-angiogenici come bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); e (x) sali, acidi e derivati farmaceuticamente accettabili di qualsiasi dei precedenti. Altri agenti anti-angiogenici sono inibitori della MMP-2 (metalloproteinasi della matrice 2), inibitori della MMP-9 (metalloproteinasi della matrice 9), inibitori della COX-II (cicloossigenasi II) e inibitori della tirosina chinasi del recettore VEGF. Esempi di tali inibitori della metalloproteinasi di matrice utili che possono essere usati in combinazione con i presenti composti/composizioni sono descritti in WO 96/33172, WO 96/27583, EP 818442, EP 1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, EP 606.046, EP 931.788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO 99/07675, EP 945864, brevetto U.S. n. 5.863.949, brevetto U.S. n. 5.861.510 ed EP 780.386.

Esempi di inibitori della tirosina chinasi del recettore VEGF includono (4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metossi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetossi)chinazolina (ZD6474; Esempio 2 in WO 01/32651), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-ilossi)-6-



metossi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropossi)-chinazolina (AZD2171; esempio 240 in WO 00/47212), vatalanib (PTK787; WO 98/35985) e SU11248 (sunitinib; WO 01/60814) e composti quali quelli descritti nelle pubblicazioni PCT nn. WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 e WO 98/13354).

Altri esempi di agenti chemioterapici che possono essere utilizzati in combinazione con i composti della presente  
5 invenzione includono inibitori della PI3K (fosfatidilinositolo-3-chinasi), come quelli riportati in Yaguchi *et al.* (2006) Jour.  
of the Nat. Cancer Inst. 98(8):545-556; brevetto U.S. n. 7.173.029; brevetto U.S. n. 7.037.915; brevetto U.S. n. 6.608.056;  
brevetto U.S. n. 6.608.053; brevetto U.S. n. 6.838.457; brevetto U.S. n. 6.770.641; brevetto U.S. n. 6.653.320; brevetto  
U.S. n. 6,403,588; WO 2006/046031; WO 2006/046035; WO 2006/046040; WO 2007/042806; WO 2007/042810; WO  
2004/017950; U.S. 2004/092561; WO 2004/007491; WO 2004/006916; WO 2003/037886; U.S. 2003/149074; WO  
10 2003/035618; WO 2003/034997; U.S. 2003/158212; EP 1417976; US 2004/053946; JP 2001247477; JP 08175990; JP  
08176070; brevetto U.S. n. 6.703.414; e WO 97/15658. Esempi specifici di tali inibitori di PI3K includono SF-1126  
(inibitore PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inibitore PI3K, Novartis), XL-147 (inibitore PI3K, Exelixis, Inc.).

Gli agenti chemioterapici possono anche includere uno qualsiasi dei farmaci generici o biosimilari dei farmaci  
di marca menzionati in questo contesto, o loro miglioramenti, incluse formulazioni, profarmaci, mezzi di rilascio (rilascio  
15 prolungato, rivestimento bioadesivo, somministrazione mirata, *ecc.*) e forme di dosaggio migliorate.

Un "metabolita" è un prodotto realizzato attraverso il metabolismo nel corpo di un composto specifico, un suo  
derivato o un suo coniugato o suo sale. I metaboliti di un composto, un suo derivato o un suo coniugato possono essere  
identificati utilizzando tecniche ordinarie note nella tecnica e le loro attività possono essere determinate utilizzando test  
quali quelli descritti in questo contesto. Tali prodotti possono derivare, ad esempio, dall'ossidazione, idrossilazione,  
20 riduzione, idrolisi, ammidazione, deamidazione, esterificazione, deesterificazione, scissione enzimatica e simili del  
composto somministrato. Di conseguenza, l'invenzione comprende metaboliti di composti, un loro derivato o un loro  
coniugato, dell'invenzione, inclusi composti, un loro derivato o un loro coniugato prodotti mediante un procedimento  
comprendente mettere a contatto un composto, un suo derivato o un suo coniugato della presente invenzione con un  
mammifero per un periodo di tempo sufficiente a produrre un suo prodotto metabolico.

25 L'espressione "farmaceuticamente accettabile" indica che la sostanza o composizione deve essere chimicamente

e/o tossicologicamente compatibile con gli altri ingredienti facenti parte di una formulazione e/o il mammifero in corso di trattamento con la stessa.

Il termine "gruppo protettivo" o "frazione protettiva" si riferisce a un sostituito che viene comunemente impiegato per bloccare o proteggere una particolare funzionalità reagendo al contempo altri gruppi funzionali sul composto, un suo derivato o un suo coniugato. Ad esempio, un "gruppo protettivo dell'ammina" o una "frazione protettiva dell'ammina" è un sostituito attaccato a un gruppo amminico che blocca o protegge la funzionalità amminica nel composto. Tali gruppi sono ben noti nella tecnica (si veda ad esempio P. Wuts e T. Greene, 2007, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Capitolo 7, J. Wiley & Sons, NJ) ed esemplificati da carbammati come metile e carbammato di etile, FMOC, carbammati etile-sostituiti, carbammati scissi da 1,6- $\beta$ -eliminazione (chiamati anche "auto-immolativi"), uree, ammidi, peptidi, derivati alchilici e arilici. Gruppi protettivi dell'ammina adatti includono acetile, trifluoroacetile, t-butossicarbonile (BOC), benzilossicarbonile (CBZ) e 9-fluorenilmetilenossicarbonile (Fmoc). Per una descrizione generale di gruppi protettivi e del loro uso, si veda P.G.M. Wuts & T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2007.

Il termine "gruppo uscente" si riferisce a un gruppo di frazione caricata o non caricata che si diparte durante una sostituzione o spostamento. Tali gruppi uscenti sono ben noti nella tecnica e includono, tuttavia senza limitazione, alogeni, esteri, alcossi, idrossile, tosilati, triflati, mesilati, nitrili, azide, carbammato, disolfuri, tioesteri, tioeteri e composti di diazonio.

Il termine "agente reticolante bifunzionale", "linker bifunzionale" o "agenti reticolanti" si riferisce ad agenti modificanti che possiedono due gruppi reattivi modifica; uno dei quali è in grado di reagire con un agente legante cellulare, mentre l'altro reagisce con il composto citotossico per legare insieme le due frazioni. Tali reticolanti bifunzionali sono ben noti nella tecnica (si veda ad esempio Isalm e Dent in *Bioconjugation*, capitolo 5, pagg. 218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999). Ad esempio, agenti reticolanti bifunzionali che consentono il legame tramite un legame tioetere includono *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimmidometil)-cicloesano-1-carbossilato (SMCC) per introdurre gruppi maleimmido, o *N*-succinimidil-4-(iodoacetil)-amminobenzoato (SIAB) per introdurre gruppi iodoacetile. Altri agenti reticolanti bifunzionali che introducono gruppi maleimido o gruppi aloacetile su un agente legante cellulare sono ben noti



nella tecnica (si vedano le domande di brevetto U.S. 2008/0050310, 20050169933 disponibili da Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA) e includono, tuttavia senza limitazione, bis-maleimmidopolietilenglicole (BMPEO), BM(PEO)<sub>2</sub>, BM(PEO)<sub>3</sub>, N-(β-maleimmidopropilossi)succinimide estere (BMPS), acido γ-maleimmidobutirrico N-succinimide estere (GMBS), acido ε-maleimmidocaproico N-idrossisuccinimide estere (EMCS), acido 5-maleimmidovalerico NHS, HBVS, N-succinimidil-4-(N-maleimmidometil)-cicloesano-1-carbossi-(6-ammidocaproato), che è un analogo a "catena lunga" di SMCC (LC-SMCC), m-maleimmidobenzoil-N-idrossisuccinimide estere (MBS), acido 4-(4-N-maleimmidofenil)-butirrico idrazide o sale HCl (MPBH), N-succinimidil-3-(bromoacetammido)propionato (SBAP), N-succinimidil iodoacetato (SIA), acido K-maleimmidoundecanoico N-succinimidil estere (KMUA), N-succinimidil-4-(p-maleimmidofenil)-butirrato (SMPB), succinimidil-6-(β-maleimmidopropionammido)esanoato (SMPH), succinimidil-(4-vinilsolfonil)benzoato (SVSB), ditiobis-maleimmidoetano (DTME), 1,4-bis-maleimmidobutano (BMB), 1,4 bismaleimidil-2,3-diidrossibutano (BMDB), bis-maleimmidoesano (BMH), bis-maleimmidoetano (BMOE), solfosuccinimidil 4-(N-maleimmido-metil)cicloesano-1-carbossilato (solfo-SMCC), solfosuccinimidil(4-iodo-acetil)amminobenzoato (solfo-SIAB), m-maleimmidobenzoil-N-idrossisolfosuccinimide estere (solfo-MBS), N-(γ-maleimmidobutirilossi)solfosuccinimide estere (solfo-GMBS), N-(ε-maleimmidocaproilossi)solfosuccinimide estere (solfo-EMCS), N-(K-maleimmidoundecanoilossi)solfosuccinimide estere (solfo-KMUS) e solfosuccinimidil-4-(p-maleimmidofenil)butirrato (solfo-SMPB).

Agenti reticolanti eterobifunzionali sono agenti reticolanti bifunzionali aventi due diversi gruppi reattivi. Agenti reticolanti eterobifunzionali contenenti sia un gruppo N-idrossisuccinimide ammino-reattivo (gruppo NHS) sia un gruppo idrazina carbonil-reattivo possono anche essere utilizzati per legare i composti citotossici descritti in questo contesto con un agente legante cellulare (*ad es.* anticorpo). Esempi di tali agenti reticolanti eterobifunzionali disponibili in commercio includono succinimidil-6-idrazino nicotinamide acetone idrazone (SANH), succinimidil-4-idrazidotereftalato cloridrato (SHTH) e succinimidil idrazinio nicotinato cloridrato (SHNH). Coniugati recanti un legame acido-labile possono anche essere preparati utilizzando un derivato di benzodiazepine recante idrazina della presente invenzione. Esempi di agenti reticolanti bifunzionali che possono essere utilizzati comprendono succinimidil-p-formilbenzoato (SFB) e succinimidil-p-formilfenossiacetato (SFPA).

Agenti reticolanti bifunzionali che consentono il legame dell'agente legante cellulare con composti citotossici tramite legami disolfuro sono noti nella tecnica e comprendono *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), *N*-succinimidil-4-(2-piridilditio)2-solfobutanoato (solfo-SPDB) per introdurre gruppi ditiopiridile. Altri agenti reticolanti bifunzionali che  
5 possono essere utilizzati per introdurre gruppi disolfuro sono noti nella tecnica e sono descritti nei brevetti U.S. 6.913.748, 6,716,821 e nelle pubblicazioni di brevetto 20090274713 e 20100129314. In alternativa, possono essere impiegati anche agenti reticolanti quali 2-iminotiolano, omocisteina tiolato o anidride S-acetilsuccinica che introducono gruppi tiolici.

Un "linker", "frazione linker" o "gruppo legante" come definito in questo contesto si riferisce a una frazione che collega tra loro due gruppi, come un agente legante cellulare e un composto citotossico. Tipicamente, il linker è  
10 sostanzialmente inerte nelle condizioni per le quali i due gruppi che sta collegando sono legati. Un agente reticolante bifunzionale può comprendere due gruppi reattivi, uno in corrispondenza di ciascuna estremità di una frazione linker, in modo tale che un gruppo reattivo possa essere prima fatto reagire con il composto citotossico per fornire un composto recante la frazione linker e un secondo gruppo reattivo, che può quindi reagire con un agente legante cellulare. In alternativa, una estremità dell'agente reticolante bifunzionale può essere fatta reagire con il primo agente legante cellulare  
15 per fornire un agente legante cellulare recante una frazione linker e un secondo gruppo reattivo, che può quindi reagire con un composto citotossico. La frazione legante può contenere un legame chimico che consente il rilascio della frazione citotossica in corrispondenza di un sito specifico. Legami chimici adatti sono ben noti nella tecnica e comprendono legami disolfuro, legami tioetere, legami acido labili, legami fotolabili, legami peptidasi labili e legami esterasi labili (si vedano ad esempio i brevetti U.S. 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565;  
20 7.388.026 e 7.414.073). Sono preferiti i legami disolfuro, tioetere e i legami peptidasi-labili. Altri linker che possono essere usati nella presente invenzione includono linker non scindibili, come quelli descritti in dettaglio nella pubblicazione U.S. numero 2005/20050169933 o linker carichi o linker idrofili e sono descritti in U.S. 2009/0274713, U.S. 2010/01293140 e WO 2009/134976.

In una forma di realizzazione, il gruppo legante con un gruppo reattivo attaccato a una estremità, ad esempio un  
25 estere attivo, viene scelto tra i seguenti:



- O(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- O(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>26</sub>=CR<sub>27</sub>)<sub>m'</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- O(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(alchinil)<sub>n</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- O(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(piperazino)<sub>t</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- 5 -O(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(pirrolo)<sub>t</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- O(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>A''<sub>m</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- S(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- S(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>26</sub>=CR<sub>27</sub>)<sub>m'</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- S(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(alchinil)<sub>n</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- 10 -S(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(piperazino)<sub>t</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- S(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(pirrolo)<sub>t</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- S(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>A''<sub>m</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- NR<sub>33</sub>(C=O)<sub>p</sub>(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- NR<sub>33</sub>(C=O)<sub>p</sub>(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>26</sub>=CR<sub>27</sub>)<sub>m'</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- 15 -NR<sub>33</sub>(C=O)<sub>p</sub>(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(alchinile)<sub>n</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- NR<sub>33</sub>(C=O)<sub>p</sub>(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(piperazino)<sub>t</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- NR<sub>33</sub>(C=O)<sub>p</sub>(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(pirrolo)<sub>t</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- NR<sub>33</sub>(C=O)<sub>p</sub>(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>A''<sub>m</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- 20 -(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- (CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>26</sub>=CR<sub>27</sub>)<sub>m'</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- (CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(alchinile)<sub>n</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- (CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(piperazino)<sub>t</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- (CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>A''<sub>m</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- (CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>29</sub>=N-NR<sub>30</sub>)<sub>n'</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''
- 25 -(CR<sub>20</sub>R<sub>21</sub>)<sub>m</sub>(CR<sub>29</sub>=N-NR<sub>30</sub>)<sub>n'</sub>(CR<sub>26</sub>=CR<sub>27</sub>)<sub>m'</sub>(CR<sub>22</sub>R<sub>23</sub>)<sub>n</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(CR<sub>40</sub>R<sub>41</sub>)<sub>p</sub>·Y''(CR<sub>24</sub>R<sub>25</sub>)<sub>q</sub>(CO)<sub>t</sub>X''



$-(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{CR}_{29}=\text{N}-\text{NR}_{30})_n(\text{alchinile})_n(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}''$ ,

$-(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})_m(\text{CR}_{29}=\text{N}-\text{NR}_{30})_n\text{A}''_m(\text{CR}_{22}\text{R}_{23})_n(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_p(\text{CR}_{40}\text{R}_{41})_p\text{Y}''(\text{CR}_{24}\text{R}_{25})_q(\text{CO})_t\text{X}''$ ,

in cui:

m, n, p, q, m', n', t' sono numeri interi compresi tra 1 e 10 o sono opzionalmente 0;

5 t, m'', n'' e p'' sono 0 o 1;

X'' è scelto tra OR<sub>36</sub>, OR<sub>37</sub>, NR<sub>38</sub>R<sub>39</sub>, in cui R<sub>36</sub>, R<sub>37</sub>, R<sub>38</sub>, R<sub>39</sub> sono H o alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 20 atomi di carbonio o un'unità polietilenglicolica  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ , R<sub>37</sub>, opzionalmente, è un gruppo protettivo tiolico quando t = 1, COX'' forma un estere reattivo scelto tra esteri N-idrossisuccinimide, esteri N-idrossifalimmide, esteri N-idrossisolfo-succinimide, esteri para- nitrofenile, esteri dinitrofenile, esteri pentafluorofenile e loro derivati, in cui detti derivati facilitano la formazione del legame ammidico;

10

Y'' è assente o è scelto tra O, S, S-S o NR<sub>32</sub>, in cui R<sub>32</sub> ha la stessa definizione riportata in precedenza per R; o

quando Y'' non è S-S e t = 0, X'' è scelto tra un gruppo maleimmido, un gruppo aloacetile o SR<sub>37</sub>, in cui R<sub>37</sub> ha la stessa definizione precedente;

A'' è un amminoacido scelto tra glicina, alanina, leucina, valina, lisina, citrullina e glutammato o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche;

15

R<sub>20</sub>, R<sub>21</sub>, R<sub>22</sub>, R<sub>23</sub>, R<sub>24</sub>, R<sub>25</sub>, R<sub>26</sub> e R<sub>27</sub> sono uguali o diversi e sono -H oppure un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 5 atomi di carbonio;

R<sub>29</sub> e R<sub>30</sub> sono uguali o diversi e sono -H o alchile avente da 1 a 5 atomi di carbonio;

R<sub>33</sub> è -H oppure un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 12 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $\text{R}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$  oppure R<sub>33</sub> è -COR<sub>34</sub>, -CSR<sub>34</sub>, -SOR<sub>34</sub> o -SO<sub>2</sub>R<sub>34</sub>, in cui R<sub>34</sub> è H o un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 20 atomi di carbonio o un'unità polietilenglicolica  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ ; e uno di R<sub>40</sub> e R<sub>41</sub> è opzionalmente un gruppo funzionale caricato negativamente o positivamente e l'altro è H o alchile, alchenile, alchinile avente da 1 a 4 atomi di carbonio.

20

Qualsiasi dei gruppi leganti precedenti può essere presente in qualsiasi dei composti, composti farmaco-linker o coniugati dell'invenzione, incluso sostituendo i gruppi leganti di qualsiasi delle formule descritte in questo contesto.

25

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

Il termine "amminoacido" si riferisce ad amminoacidi presenti in natura o ad amminoacido non presenti in natura rappresentati da  $\text{NH}_2\text{-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{'R}^{\text{aa}})\text{-C(=O)OH}$ , in cui  $\text{R}^{\text{aa}}$  sono ciascuno indipendentemente H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile, eteroarile o eterociclice. Il termine "amminoacido" si riferisce anche al corrispondente residuo quando un atomo di idrogeno viene  
5 rimosso dall'estremità ammina e/o carbossi dell'amminoacido, come  $\text{-NH-C}(\text{R}^{\text{aa}}\text{'R}^{\text{aa}})\text{-C(=O)O-}$ .

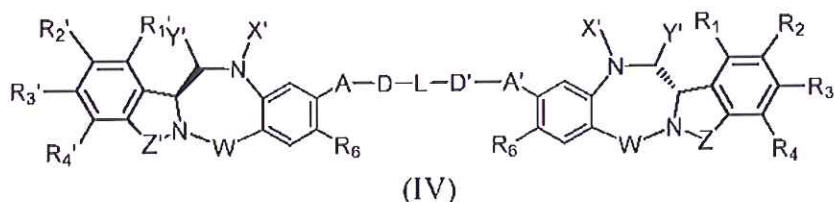
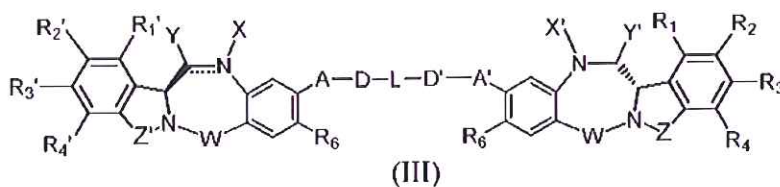
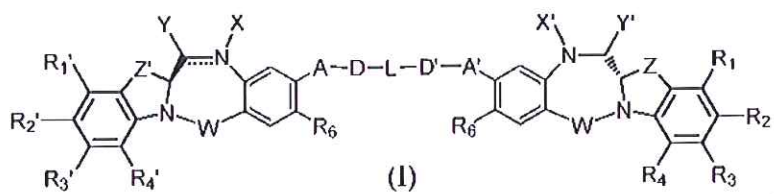
Il termine 'catione' si riferisce a uno ione con carica positiva. Il catione può essere monovalente (*ad es.*  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  
*ecc.*), bivalente (*ad es.*  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , *ecc.*) o multivalente (*ad es.*  $\text{Al}^{3+}$  *ecc.*). Preferibilmente, il catione è monovalente.

Il termine "quantità terapeuticamente efficace" indica quella quantità di composto attivo o coniugato che suscita  
10 la risposta biologica desiderata in un soggetto. Tale risposta include l'alleviamento dei sintomi della patologia o disturbo da trattare, la prevenzione, l'inibizione o il ritardo della ricorrenza dei sintomi della patologia o della patologia stessa, un aumento della longevità del soggetto rispetto all'assenza del trattamento o la prevenzione, l'inibizione o il ritardo della progressione dei sintomi della patologia o della patologia stessa. La determinazione della quantità efficace rientra nelle capacità degli esperti della tecnica, in particolare alla luce della descrizione dettagliata fornita nel presente contesto. La tossicità e l'efficacia terapeutica del composto I possono essere determinate mediante procedure farmaceutiche standard  
15 in colture cellulari e in animali da esperimento. La quantità efficace di composto o coniugato della presente invenzione o altro agente terapeutico da somministrare a un soggetto dipenderà dallo stadio, dalla categoria e dallo stato del mieloma multiplo e dalle caratteristiche del soggetto come salute generale, età, sesso, peso corporeo e tolleranza della d.m.g. La quantità efficace di composto o coniugato della presente invenzione o altro agente terapeutico da somministrare dipenderà  
20 anche dalla via di somministrazione e dalla forma di dosaggio. Quantità e intervallo di dosaggio possono essere regolati singolarmente per fornire livelli plasmatici del composto attivo che siano sufficienti a mantenere gli effetti terapeutici desiderati.

#### COMPOSTI CITOTOSSICI

La presente invenzione si riferisce a composti citotossici descritti in questo contesto [(*ad es.* i composti di  
formula (I), (III) e (IV)]. I composti citotossici della presente invenzione non includono alcuno dei composti descritti in  
25 U.S. 2010/0203007, come quelli specificamente esclusi nella condizione che segue.

In una forma di realizzazione specifica, l'invenzione fornisce un composto citotossico comprendente un gruppo legante con un gruppo reattivo legato a esso in grado di legare covalentemente il composto citotossico a un agente legante cellulare (CBA), in cui detto composto citotossico è rappresentato da una delle seguenti formule (I), (III) o (IV):



5

o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è assente e Y è -H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio e quando è un singolo legame, X è -H, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso o una frazione protettiva dell'ammina; preferibilmente, la doppia

10

linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un doppio legame;

Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

- Y è -H o un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (ad es. piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina, ecc.), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido, in cui M è -H o un catione; come Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>. Preferibilmente, M è -H o Na<sup>+</sup>. Preferibilmente, Y è scelto tra -SO<sub>3</sub>M, -OH, -OMe, -OEt o -NHOH. Più preferibilmente, Y è -SO<sub>3</sub>M o -OH; oppure, Y è un solfito (HSO<sub>3</sub>, HSO<sub>2</sub> o un sale di HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> o HSO<sub>2</sub> formato con un catione), metabisolfito (N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), mono-, di-, tri- e tetra-tiofosfato (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub> o un sale di PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, POS<sub>3</sub><sup>3-</sup> o PS<sub>4</sub><sup>3-</sup> formato con un catione), estere tiofosfato (R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>S-, R<sup>i</sup>SO, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub> tiosolfato (HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), ditionite (HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), fosforoditioato (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH) o un suo sale formato con un catione), acido idrossamico (R<sup>k</sup> C(=O)NOH o un sale formato con un catione), formaldeide solfossilato (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup> o un sale di HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup> formato con un catione, come HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>·Na<sup>+</sup>) o una loro miscela, in cui R<sup>i</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 10 atomi di carbonio ed è sostituito con almeno un sostituyente scelto tra -N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H e -PO<sub>3</sub>H; R<sup>j</sup> può essere inoltre opzionalmente sostituito con un sostituyente per un alchile descritto in questo contesto; R<sup>j</sup> è un alchile lineare o modificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio; R<sup>k</sup> è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile, eterociclice o eteroarile; preferibilmente, Y è un addotto di un bisolfito, un idrosolfito o un metabisolfito, o loro sali (come sale sodico);
- R, per ciascuna occorrenza, è indipendentemente scelto dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo o un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- R' e R'' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, un alchile, alchenile

- o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$  e un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- $\text{R}^c$  è -H o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio o il gruppo legante
- 5 con il gruppo reattivo legato a esso;
- $n$  è un numero intero compreso tra 1 e 24;
- $W$  è scelto tra C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO e SO<sub>2</sub>;
- $X'$  è scelto dal gruppo costituito da -H, -OH, un gruppo protettivo dell'ammina, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi
- 10 di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^c$ , un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio (ad es. fenile), un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo e un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P. Preferibilmente,  $X'$  è -H, -OH, -Me o il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso. Più preferibilmente,  $X'$  è -H;
- 15  $Y'$  è scelto dal gruppo costituito da -H, un gruppo osso, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile avente da 6 a 18 elementi opzionalmente sostituito, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo, un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi. Preferibilmente,  $Y'$  è scelto tra -H o osso.
- 20 Più preferibilmente,  $Y'$  è -H;
- $R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3'$  e  $R_4'$  sono ciascuno indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{R}^c$ , alogeno, guanidinio  $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, un solfato -OSO<sub>3</sub>
- 25 M<sup>+</sup>, una solfonammide rappresentata da -SO<sub>2</sub>NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e il gruppo legante

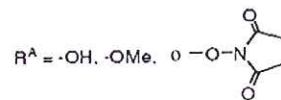
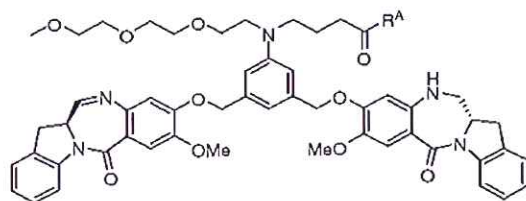
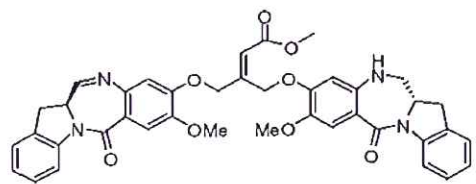
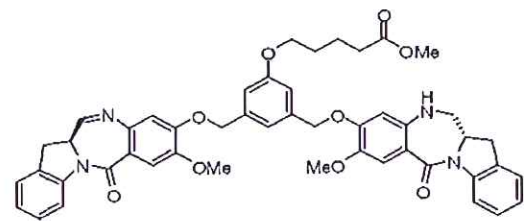
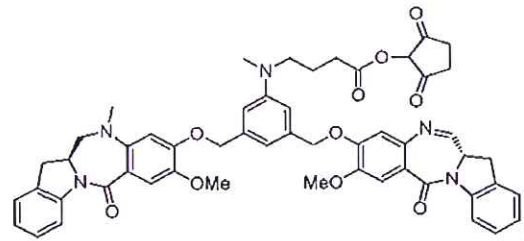
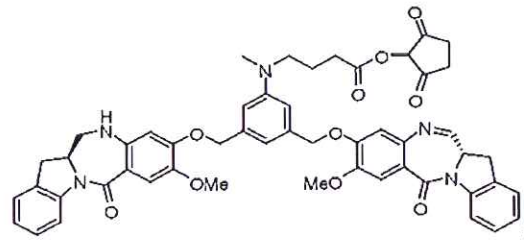
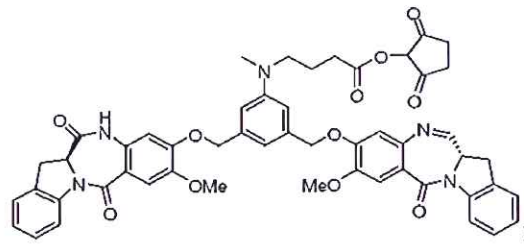


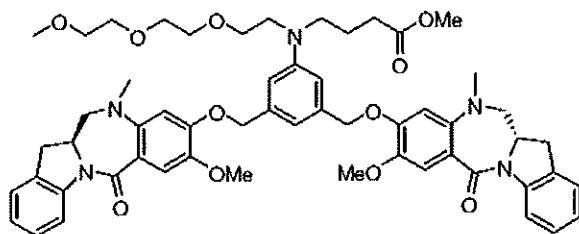
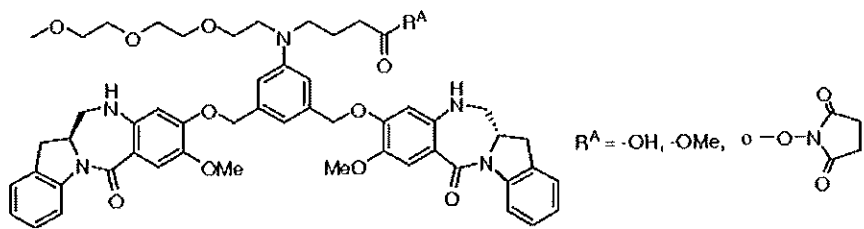
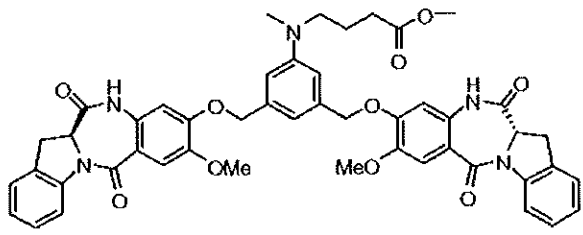
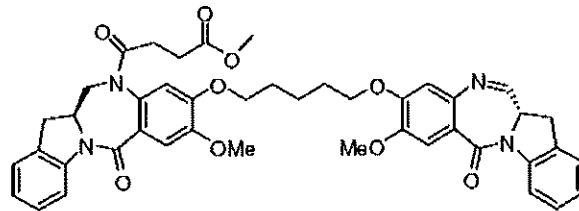
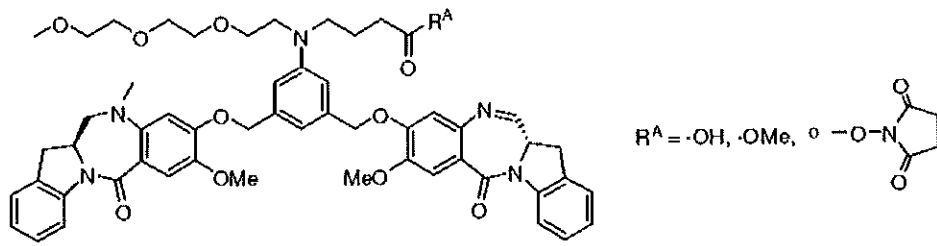
- con il gruppo reattivo legato a esso. Preferibilmente, uno di  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_2'$  e  $R_3'$  è il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso e il resto è -H;
- $R_6$  è -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, alogeno, è il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, -OR<sup>c</sup> o -SR<sup>c</sup>, in cui R<sup>c</sup> è -H, un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio. Preferibilmente,  $R_6$  è -OMe o -SMe. Ancora
- 5 più preferibilmente,  $R_6$  è -OMe;
- Z e Z' sono indipendentemente scelti tra  $-(CH_2)_{n'}$ -,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-$ ,  $(CH_2)_{na'}$ -,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{na'}$ -,  $-(CH_2)_{n'}-O-$ ,  $(CH_2)_{na'}$ - e  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{na'}$ ;
- $n'$  e  $na'$  sono uguali o diversi e sono scelti tra 0, 1, 2 e 3;
- $R_7$  e  $R_8$  sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', un'unità
- 10 polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , un amminoacido, un'unità peptidica recante da 2 a 6 amminoacidi, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;
- $R_9$  è indipendentemente scelto tra -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;
- A e A' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra -O-, oxo (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -
- 15  $N(R_5)$ - e  $-CRR'N(R_5)$ -. Preferibilmente, A e A' sono uguali o diversi e sono scelti tra -O- e -S-. Più preferibilmente, A e A' sono -O-;
- $R_5$  per ciascuna occorrenza è indipendentemente -H o un alchile lineare o ramificato opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;
- D e D' sono uguali o diversi e sono indipendentemente assenti o scelti dal gruppo costituito da un amminoacido, un
- 20 peptide recante da 2 a 6 amminoacidi e un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, in cui l'alchile, alchenile o alchinile sono opzionalmente sostituiti con uno o più (*ad es.* 2, 3, 4, 5, 6 o più) sostituenti indipendentemente scelti dal gruppo costituito da alogeno, -OR, -NR'COR'', -SR e -COR';
- Preferibilmente, D e D' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra alchile, alchenile o alchinile lineare,
- 25 ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio. Più preferibilmente, D e D' sono alchile lineare o ramificato

recante da 1 a 4 atomi di carbonio. Ancora più preferibilmente, D e D' sono uguali o diversi e sono scelti tra un alchile lineare avente da 1 a 4 atomi di carbonio;

L è assente, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, un'unità polietilenglicolica  $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ , un alchile o alchenile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio (ad es. 1-6 atomi di carbonio), un gruppo fenile, un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi o un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P, in cui l'alchile o alchenile è opzionalmente sostituito con il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso; il fenile o l'anello eterociclico o eteroarilico possono essere opzionalmente sostituiti, in cui il sostituito può essere il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, purché il composto non sia uno dei composti descritti immediatamente di seguito.

10 I composti citotossici della presente invenzione non sono alcuno dei seguenti composti:





In alcune forme di realizzazione, X non è il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso. In alcune forme di realizzazione, la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame, Y non è -H.

5 In alcune forme di realizzazione, Y è -H o un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (*ad es.* piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina, *ecc.*), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido. Preferibilmente, Y è addotto bisolfito di sodio, addotto idrosolfito di sodio o addotto metabisolfito di sodio. In alcune forme di realizzazione, Y non è -H.

10 In alcune forma di realizzazione, L è assente o è scelto da un gruppo fenile opzionalmente sostituito e un gruppo piridile opzionalmente sostituito, in cui il gruppo fenile e piridile reca il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, o L è un gruppo amminico recante il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso [(*vale a dire*, -N(gruppo legante)-) o L è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio e recante il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso.

15 In una seconda forma di realizzazione specifica, per i dimeri citotossici (I), (III) e (IV), le variabili sono come descritto di seguito:

la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un doppio legame;

Y è -H;

W è C=O;

20 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>4</sub> e R<sub>4</sub>' sono -H;

uno di R<sub>3</sub> o R<sub>3</sub>' è opzionalmente un gruppo legante e l'altro è -H;

R<sub>6</sub> è -OMe;

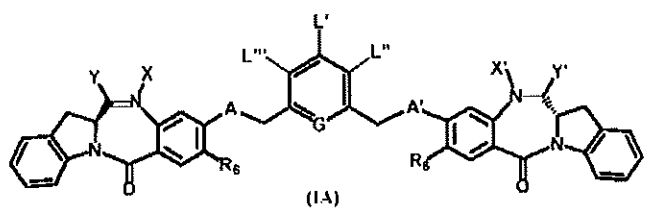
Z e Z' sono -CH<sub>2</sub>-;

X' è -H;

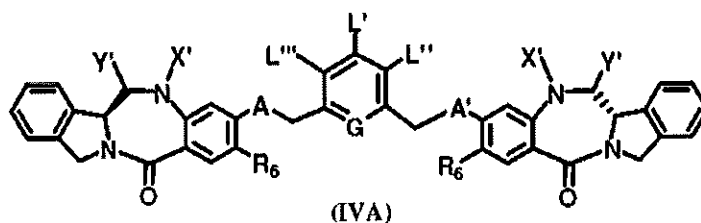
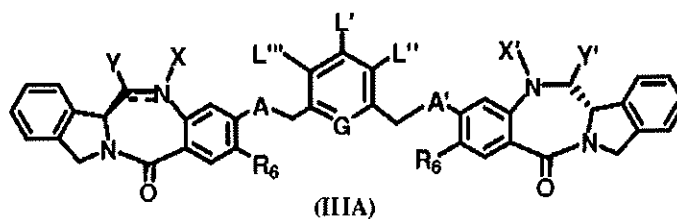
Y' è -H;

A e A' sono -O-; e il resto delle variabili è come descritto nella prima forma di realizzazione specifica.

In una terza forma di realizzazione specifica, i dimeri citotossici di formula (I), (III) e (IV) sono rappresentati dalle seguenti formule:



5



in cui:

la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è assente e Y è -H e quando è un singolo legame, X è scelto tra -H, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso o un gruppo protettivo dell'ammina (preferibilmente, X è -H);

10



- Y è scelto tra -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R'', -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>2</sub>M, o -OSO<sub>3</sub>M, in cui M è -H o un catione come Na<sup>+</sup>. K<sup>+</sup>. Preferibilmente, Y è scelto tra -OH, -OMe, -OEt, -NHOH o -SO<sub>3</sub>M. Ancora più preferibilmente, Y è -OH o -SO<sub>3</sub>M, preferibilmente M è -H o Na<sup>+</sup>;
- R è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio o un gruppo PEG -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, in cui n è un numero intero compreso tra 1 e 24 e R<sup>c</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio;
- R' e R'' sono uguali o diversi e sono scelti tra -H, -OH, -OR, -NRR<sup>g'</sup>, -COR, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi scelti tra O, S, N e P, un gruppo PEG-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, in cui n è un numero intero compreso tra 1 e 24, preferibilmente, n è 2, 4 o 8; e R<sup>g'</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio o un gruppo PEG- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>;
- X' è scelto dal gruppo costituito da -H, -OH, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, fenile e un gruppo protettivo dell'ammina. Preferibilmente, X' è -H, -OH o -Me. Più preferibilmente, X' è -H;
- Y' è scelto dal gruppo costituito da -H, un gruppo osso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio. Preferibilmente, Y' è scelto tra -H o -Me. Più preferibilmente, Y' è -H;
- R<sub>6</sub> è -OR<sup>c</sup> o -SR<sup>c</sup>, in cui R<sup>c</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio. Preferibilmente, R<sub>6</sub> è -OMe o -SMe. Ancora più preferibilmente, R<sub>6</sub> è -OMe;
- A e A' sono scelti tra -O- e -S-. Preferibilmente, A e A' sono -O-;
- L', L'' e L''' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, alogeno, guanidinio [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NR'COR'', -SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, un solfato -OSO<sub>3</sub><sup>+</sup>M<sup>+</sup>, una

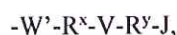
solfonammide rappresentata da  $\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ , ciano, un azido,  $-\text{COR}'$ ,  $-\text{OCOR}'$ ,  $-\text{OCONR}'\text{R}''$  e il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, purché solo uno di  $\text{L}'$ ,  $\text{L}''$  e  $\text{L}'''$  sia il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso. Preferibilmente,  $\text{L}'$  è il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso. In alternativa, uno di  $\text{L}'$ ,  $\text{L}''$  o  $\text{L}'''$  è il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, mentre gli altri sono  $-\text{H}$ . Più preferibilmente,  $\text{L}'$  è il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso e  $\text{L}'$  e  $\text{L}''$  sono  $-\text{H}$ ;

$\text{G}$  è scelto tra  $-\text{CH}-$  o  $-\text{N}-$ ; e il resto delle variabili è come descritto nella prima forma di realizzazione specifica.

In alcune forme di realizzazione,  $\text{X}$  non è il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso. In alcune forme di realizzazione, la doppia linea  $\equiv$  tra  $\text{N}$  e  $\text{C}$  rappresenta un singolo legame,  $\text{Y}$  non è  $-\text{H}$ .

In alcune forme di realizzazione,  $\text{A}$  e  $\text{A}'$  sono entrambi  $-\text{O}-$ ,  $\text{R}_6$  è  $-\text{OMe}$  e  $\text{G}$  è  $-\text{CH}-$ .

10 In una quarta forma di realizzazione specifica, per i dimeri citotossici di formula (IA), (IIIA) o (IVA)  $\text{L}'$  è rappresentato dalla formula:



in cui:

$\text{W}'$  e  $\text{V}$  sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente assenti o scelti tra  $-\text{CR}^e\text{R}^{e'}$ -,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SO}-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$ ,  $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-$ ,  $-\text{SS}-$  o  $-\text{C}(=\text{O})-$  o un amminoacido o un peptide avente da 2 a 8 amminoacidi;

$\text{R}^x$  e  $\text{R}^y$  sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente assenti o un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile recante da 6 a 10 atomi di carbonio o un anello eterociclico avente da 3 a 8 elementi recante da 1 a 3 eteroatomi scelti tra  $\text{O}$ ,  $\text{N}$  o  $\text{S}$ ;

$\text{R}^e$  e  $\text{R}^{e'}$  sono uguali o diversi e sono scelti tra  $-\text{H}$ , un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ , in cui  $\text{R}^k$  è  $-\text{H}$ , un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante un gruppo amminico secondario (*ad es.*  $-\text{NHR}^{101}$ ) o amminico terziario ( $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ ) o un eterociclo con 5 o 6 elementi contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui  $\text{R}^{101}$  e  $\text{R}^{102}$  sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio.

Preferibilmente, R<sup>101</sup> e R<sup>102</sup> sono ciascuno indipendentemente un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

n è un numero intero compreso tra 1 e 24; e

J comprende il gruppo reattivo legato a esso ed è scelto tra una maleimmide, un aloacetammido, -SH, -SSR<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>SH, -

5 CH(Me)SH, -C(Me)<sub>2</sub>SH, -NHR<sup>e1</sup>, -CH<sub>2</sub>NHR<sup>e1</sup>, -NR<sup>e1</sup>NH<sub>2</sub>, -COOH e -COE, in cui -COE rappresenta un estere reattivo scelto tra, tuttavia senza limitazione, N-idrossisuccinimmide estere, N-idrossisolfosuccinimmide estere, nitrofenile (*ad es.* 2 o 4-nitrofenil)estere, dinitrofenile (*ad es.* 2,4-dinitrofenil)estere, solfo-tetrafluorfenile (*ad es.* 4-solfo-2,3,5,6-tetrafluorfenil)estere e pentafluorofenilestere e in cui R<sup>e1</sup> è -H o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito

10 R<sup>d</sup> è scelto tra fenile, nitrofenile (*ad es.* 2 o 4-nitrofenile), dinitrofenile (*ad es.* 2 or 4-nitrofenile), carbossinitrofenile (*ad es.* 3-carbossi-4-nitrofenile), piridile o nitropiridile (*ad es.* 4-nitropiridile).

In alcune forme di realizzazione, J è -SH, -SSR<sup>d</sup>, una maleimmide o un N-idrossisuccinimmide estere.

In alcune forme di realizzazione, R<sup>e</sup> è -H o -Me; R<sup>e</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>; n è un numero intero compreso tra 2 e 8; preferibilmente, R<sup>k</sup> è -H, -Me o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub>

15 e il resto delle variabili è come descritto in precedenza nella quarta forma di realizzazione specifica.

In alcune forme di realizzazione, V è un amminoacido o un peptide avente da 2 a 8 amminoacidi. In alcune forme di realizzazione, V è valina-citrullina, gly-gly-gly o ala-leu-ala-leu.

In alcune forme di realizzazione,

W' è -O-, -N(R<sup>e</sup>)- o -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-;

20 R<sup>e</sup> è H, un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio oppure -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>;

R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

V è assente, -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-;

R<sup>y</sup> è assente o è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; e

J è -SH, -SSR<sup>d</sup> or -COE (preferibilmente, N-idrossisuccinimmide estere). Il resto delle variabili è come descritto nella

25 quarta forma di realizzazione specifica.

In alcune forme di realizzazione,

W' è -O-, -N(R<sup>e</sup>)- o -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-;

R<sup>e</sup> è H, Me o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-Me;

n è un intero compreso tra 2 e 6;

5 R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato recante da 1 a 6 atomi di carbonio;

V e R<sup>y</sup> sono assenti; e

J è -COE, preferibilmente N-idrossisuccinimide estere. Il resto delle variabili è come descritto nella quarta forma di realizzazione specifica.

In una quinta forma di realizzazione specifica, L' è rappresentato dalla seguente formula:

10 
$$-W'-[CR_1^aR_2^a]_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_3^bR_4^b]_b-COE,$$

in cui:

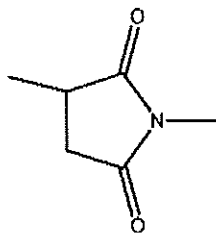
R<sub>1</sub><sup>a</sup>, R<sub>2</sub><sup>a</sup> e R<sub>3</sub><sup>b</sup> sono ciascuno indipendentemente -H o un alchile lineare o ramificato recante da 1 a 4 atomi di carbonio, preferibilmente -Me;

15 R<sub>4</sub><sup>b</sup> è -H, un alchile lineare o ramificato recante da 1 a 4 atomi di carbonio (preferibilmente -Me), -SO<sub>3</sub>H o -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>, in cui M<sup>+</sup> è un catione farmaceuticamente accettabile;

a è un numero intero compreso tra 0-5 (*ad es.* da 0 a 2, 3, 4 o 5) e b è un numero intero compreso tra 0-6 (*ad es.* da 0 a 3, 4, 5 o 6); e,

Cy è un anello eterociclico a 5 elementi opzionalmente sostituito recante un eteroatomo N, preferibilmente, Cy è

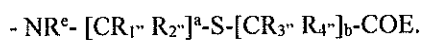
In alcune forme di realizzazione, W' è -N(R<sup>e</sup>)-.



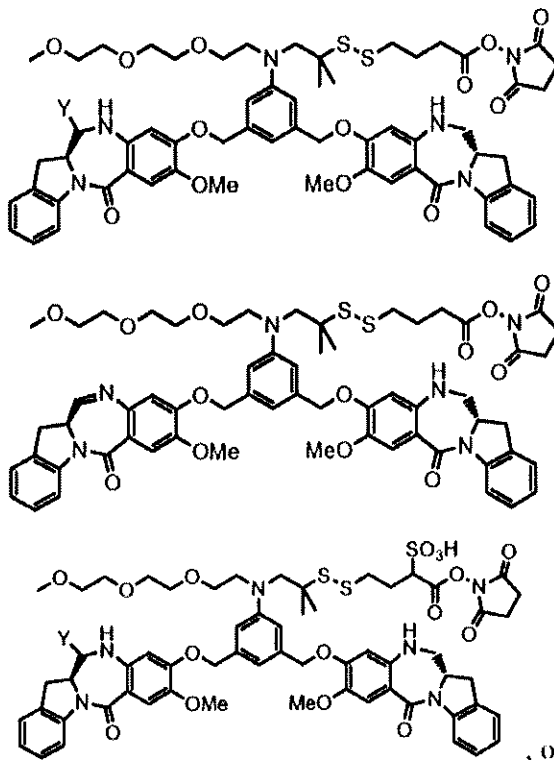
In alcune forme di realizzazione, come la quarta e/o la quinta forma di realizzazione specifica, R<sup>e</sup> è -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>2-6</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

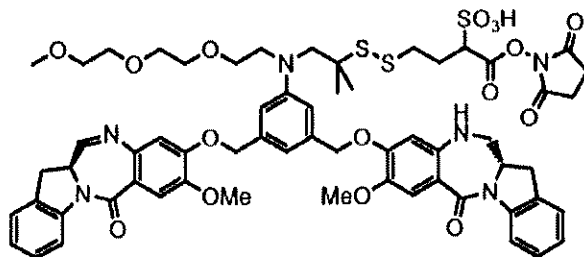
In alcune forme di realizzazione, come la quarta e/o la quinta forma di realizzazione specifica, V è -S- or -SS-.

5 In una sesta forma di realizzazione specifica, come la quarta e/o la quinta forma di realizzazione specifica, L' è rappresentato dalla seguente formula:



In alcune forme di realizzazione, il composto è qualsiasi dei seguenti:

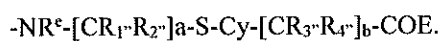




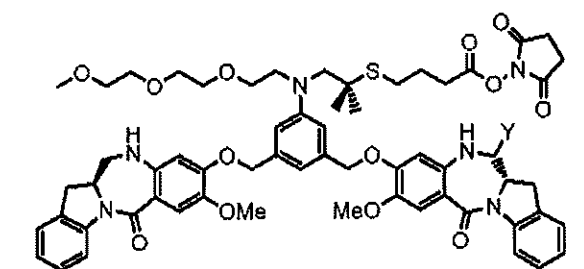
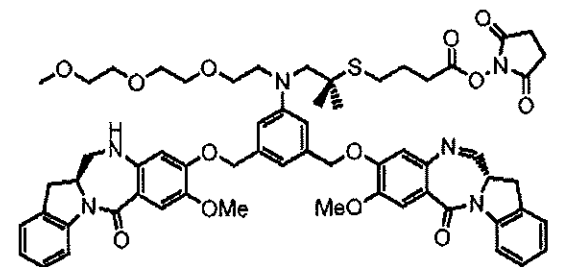
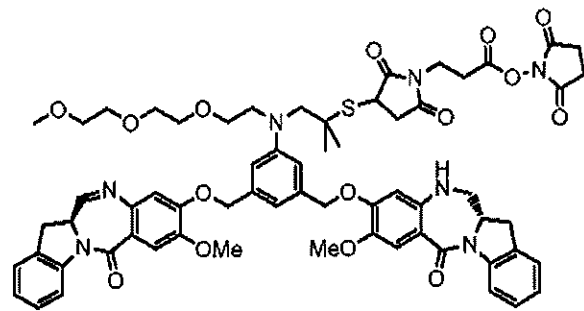
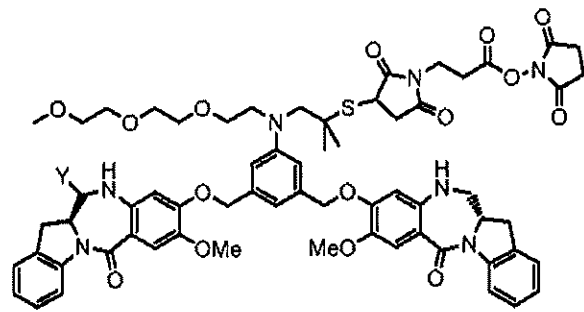
in cui Y è -H o -SO<sub>3</sub>M e M è -H o un catione farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, Y è -SO<sub>3</sub>M.

In una settima forma di realizzazione specifica, come la quarta e/o la quinta forma di realizzazione specifica, L' è rappresentato dalla seguente formula:

5

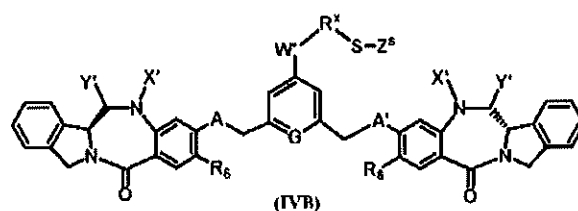
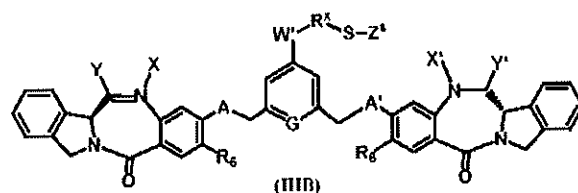
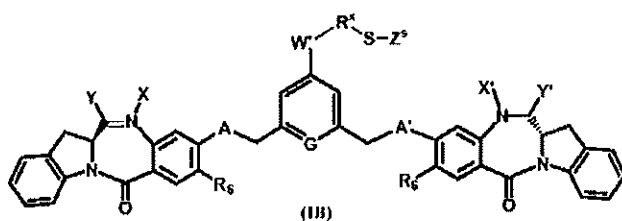


In certe forme di realizzazione, il composto è uno qualsiasi dei seguenti:



in cui Y è -H -SO<sub>3</sub>M e M è -H o un catione farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, Y è -SO<sub>3</sub>M.

In un'ottava forma di realizzazione specifica, i dimeri citotossici di formula (I), (III) e (IV) sono rappresentati dalle seguenti formule:



5 in cui:

W' è assente o scelto tra -O-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -S- o -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-;

R<sup>x</sup> è assente o scelto tra un alchile lineare, ramificato, o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

R<sup>e</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante

10 un gruppo amminico secondario (*ad es.* -NHR<sup>101</sup>) o amminico terziario (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>) o un eterociclo con 5 o 6 elementi contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui R<sup>101</sup> e R<sup>102</sup> sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile



o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio. Preferibilmente,  $R^{101}$  e  $R^{102}$  sono ciascuno indipendentemente un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

$Z^s$  è -H, -SR<sup>m</sup>;

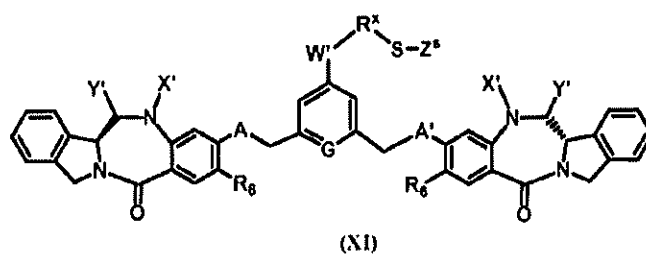
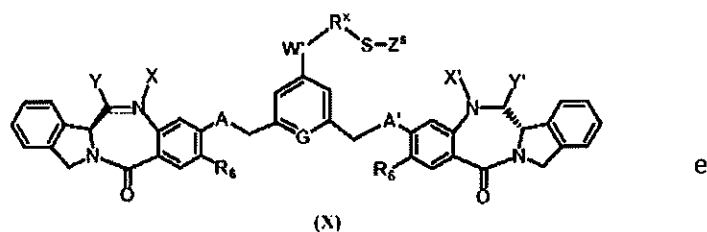
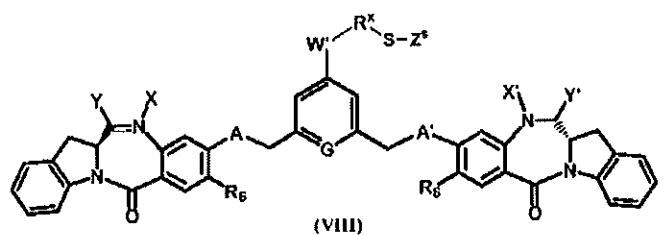
5  $R^m$  è R<sup>d</sup> o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio recante un estere reattivo, scelto tra N- idrossisuccinimmide esteri, N-idrossifalimmide esteri, N-idrossisolfo-succinimmide esteri, para-nitrofenilesteri, dinitrofenilesteri, pentafluorofenilesteri;

R<sup>d</sup> è scelto tra fenile, nitrofenile, dinitrofenile, carbossinitrofenile, piridile o nitropiridile; e,

n è un numero intero compreso tra 1 e 24; e il resto delle variabili è come descritto in precedenza nella terza forma di realizzazione specifica.

10 Preferibilmente, R<sup>k</sup> è -H o -Me e n è un numero intero compreso tra 2 e 8. Preferibilmente, R<sup>s</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio; e il resto delle variabili è come descritto in precedenza nella terza, quarta e/o quinta forma di realizzazione specifica.

In una nona forma di realizzazione specifica, i dimeri citotossici di formula (I), (III) e (IV) sono rappresentati dalle seguenti formule:

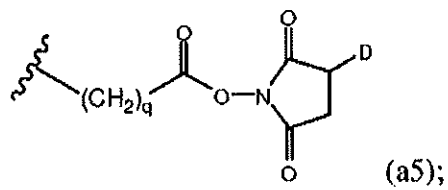
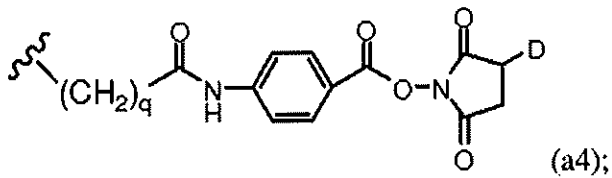
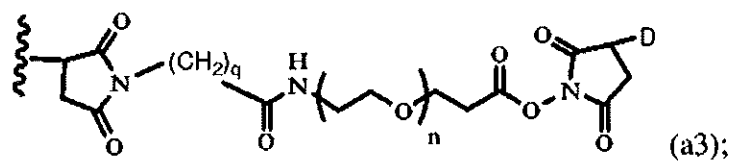
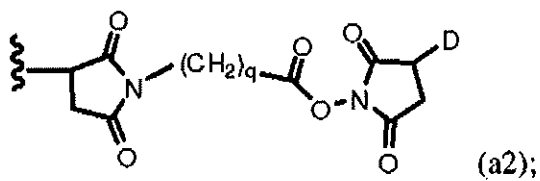
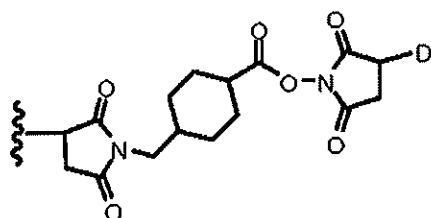


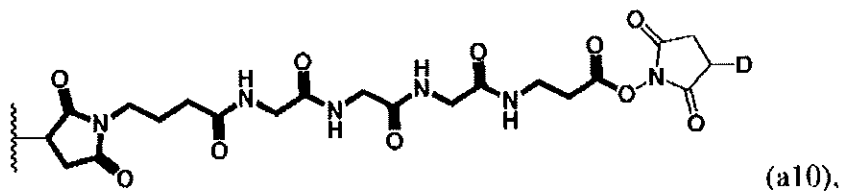
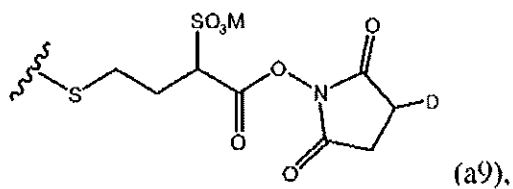
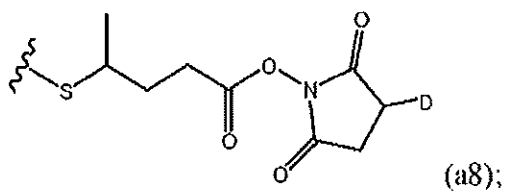
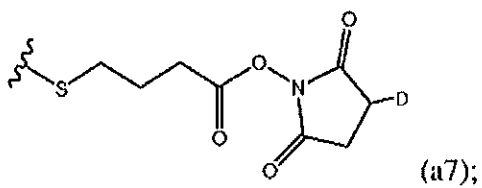
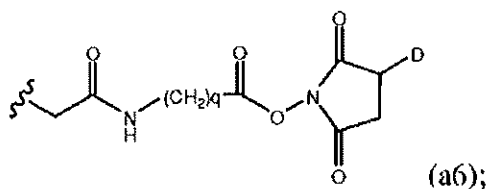
in cui:

la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è assente e Y è -H e quando è un singolo legame, X è scelto tra -H, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso o un gruppo protettivo dell'ammina (preferibilmente, X è -H o un gruppo protettivo dell'ammina; più preferibilmente, X è -H);

Y è scelto tra -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>2</sub>M o -OSO<sub>3</sub>M (ad es. Y è -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," -

- SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>2</sub>M o -OSO<sub>3</sub>M), in cui M è -H o un catione come Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>;
- R è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio o un gruppo PEG -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, in cui n è un numero intero compreso tra 1 e 24 e R<sup>c</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio;
- 5 R' e R'' sono uguali o diversi e sono scelti tra -H, -OH, -OR, -NRR<sup>g</sup>, -COR, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi scelti tra O, S, N e P, un gruppo PEG-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, in cui n è un numero intero compreso tra 1 e 24, preferibilmente, n è 2, 4 o 8; e R<sup>g</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente
- 10 sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio o un gruppo PEG- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>;
- X' è scelto dal gruppo costituito da -H, -OH, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, fenile e un gruppo protettivo dell'ammina;
- Y' è scelto dal gruppo costituito da -H, un gruppo osso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;
- 15 A e A' sono scelti tra -O- e -S-;
- W' è assente o scelto tra -O-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -S- o -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-;
- R<sup>x</sup> è assente o scelto tra un alchile lineare, ramificato, o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;
- R<sup>e</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o - (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante
- 20 un gruppo amminico secondario (*ad es.* -NHR<sup>101</sup>) o amminico terziario (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>) o un eterociclo con 5 o 6 elementi contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui R<sup>101</sup> e R sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;
- G è scelto tra -CH- o -N-;
- Z<sup>s</sup> è -H o è scelto tra qualsiasi delle seguenti formule:





in cui:

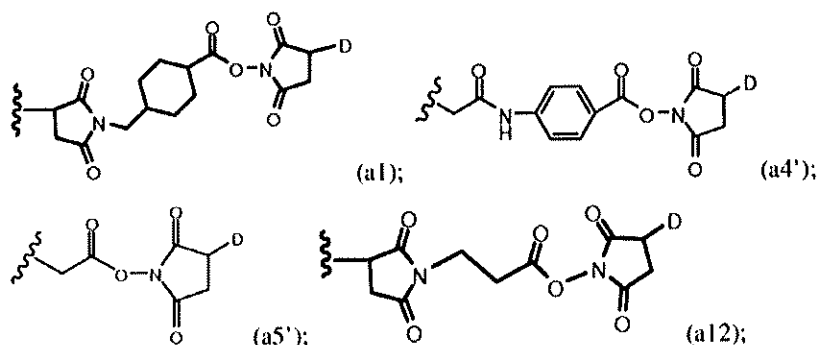
q è un numero intero compreso tra 1 e 5;

n è un numero intero compreso tra 2 e 6;

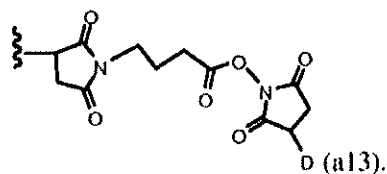
D è -H o -SO<sub>3</sub>M;

M è -H o un catione, come Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

In alcune forme di realizzazione, Zs è rappresentato da qualsiasi delle seguenti formule:



5



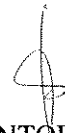
In alcune forme di realizzazione, W' è -N(R<sup>e</sup>)-.

In alcune forme di realizzazione, R<sup>e</sup> è -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

10 In alcune forme di realizzazione, R<sup>k</sup> è -H o -Me, n è 4 e q è 2.

In alcune forme di realizzazione, R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

In alcune forme di realizzazione, R<sup>x</sup> può essere -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-, in cui R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono ciascuno indipendentemente scelti tra H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; e p è 0, 1, 2 o 3.



In alcune forme di realizzazione, R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono uguali o diversi e sono scelti tra -H e -Me; e p è 1.

In una decima forma di realizzazione specifica, i composti di formula (VIII), (X) e (XI) descritti nella nona forma di realizzazione specifica, le variabili sono come descritto di seguito:

la doppia linea == tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è

5 assente e Y è -H e quando è un singolo legame, X è -H; Y è -H, -OH o -SO<sub>3</sub>M;

M è -H o un catione farmaceuticamente accettabile (*ad es.* Na<sup>+</sup>);

X' e Y' sono entrambi -H;

A e A' sono entrambi -O-;

R<sub>6</sub> è -OMe; e

10 R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

In una forma di realizzazione correlata, Y è -OH o -SO<sub>3</sub>M.

In un'altra forma di realizzazione, i composti di formula (VIII), (X) e (XI) descritti nella nona forma di realizzazione specifica, le variabili sono come descritto di seguito:

W' è -O-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(COR<sup>e</sup>)-, -S- o -CH<sub>2</sub>-S-;

15 R<sup>x</sup> è assente o scelto tra un alchile lineare, ramificato, o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

R<sup>e</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-

R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante un gruppo amminico primario, secondario o terziario o un eterociclo a 5 o 6 elementi contenente azoto, come piperidina o morfolina;

20 n è un numero intero compreso tra 1 e 24; e il resto delle variabili è come descritto in precedenza nella nona forma di realizzazione specifica.

Preferibilmente, R<sup>k</sup> è -H o -Me e n è un numero intero compreso tra 2 e 8. Preferibilmente, R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

25 Preferibilmente, R<sup>x</sup> è -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-, in cui R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono ciascuno indipendentemente scelti tra H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; p è 0, 1, 2 o 3. Più preferibilmente, R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono uguali o diversi e

sono scelti tra -H e -Me; e p è 1.

In un'altra forma di realizzazione preferita, il linker è rappresentato da una qualsiasi delle formule scelte tra le formule (a1), (a4), (a5), (a10) e (a11) mostrate in precedenza; e il resto delle variabili è come descritto in precedenza nella decima forma di realizzazione specifica.

5 In una undicesima forma di realizzazione specifica, per i composti di formula (IB), (IIIB) e (IVB) descritti nell'ottava forma di realizzazione specifica, le variabili sono come descritto di seguito:

la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è assente e Y è -H e quando è un singolo legame, X è -H; Y è -H, -OH o -SO<sub>3</sub>M (ad es. Y è -OH o -SO<sub>3</sub>M);

M è -H o Na<sup>+</sup>;

10 X' e Y' sono entrambi -H;

A e A' sono entrambi -O-;

R<sub>6</sub> è -OMe;

R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio; e il resto delle variabili è come descritto in precedenza nella terza, quarta o quinta forma di realizzazione specifica.

15 Preferibilmente, R<sup>x</sup> è -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-, in cui R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono ciascuno indipendentemente scelti tra H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; p è 0, 1, 2 o 3. Più preferibilmente, R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono uguali o diversi e sono scelti tra -H e -Me; e p è 1.

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche precedenti (*ad es.* dalla prima all'11<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica), la doppia linea  $\equiv$  tra N e C può rappresentare un legame doppio.

20 In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche precedenti (*ad es.* dalla prima all'11<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica), la doppia linea  $\equiv$  tra N e C può rappresentare un singolo legame, X è -H, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso o un gruppo protettivo dell'ammina (*ad es.* X è -H o un gruppo protettivo dell'ammina); e Y è scelto tra -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>2</sub>M e un solfato -OSO<sub>3</sub>M (*ad es.* Y è -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente

sostituito contenente azoto,  $-\text{SO}_3\text{M}$ ,  $-\text{SO}_2\text{M}$  e un solfato  $-\text{OSO}_3\text{M}$ ).

In alcune forme di realizzazione, Y è scelto tra -H,  $-\text{SO}_3\text{M}$ , -OH, -OMe, -OEt o -NHOH (*ad es.* Y è  $-\text{SO}_3\text{M}$ , -OH, -OMe, -OEt o -NHOH).

In alcune forme di realizzazione, Y è -H,  $-\text{SO}_3\text{M}$  o -OH (*ad es.* Y è  $-\text{SO}_3\text{M}$  o -OH).

5 In alcune forme di realizzazione, M è -H,  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ .

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche precedenti (*ad es.* dalla prima all'11<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica), W, quando presente, è C=O.

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche precedenti (*ad es.* dalla prima all'11<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica), Z e Z', quando presenti, sono  $-\text{CH}_2$ .

10 In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche precedenti (*ad es.* dalla prima all'11<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica), X' è scelto dal gruppo costituito da -H, -OH, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, fenile, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso e un gruppo protettivo dell'ammina.

In alcune forme di realizzazione, X' è -H, -OH, -Me o il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso.

15 In alcune forme di realizzazione, X' è -H.

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche precedenti (*ad es.* dalla prima all'11<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica), Y' è scelto dal gruppo costituito da -H, un gruppo osso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio.

In alcune forme di realizzazione, Y' è -H o osso.

20 In alcune forme di realizzazione, Y' è -H.

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche precedenti (*ad es.* dalla prima all'11<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica), A e A' sono uguali o diversi e sono scelti tra O, S,  $\text{NR}_3$  e osso (C=O). A e A' sono uguali o diversi e sono scelti tra -O- e -S-. Preferibilmente, sia A sia A' sono -O-.

25 In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche precedenti (*ad es.* dalla prima all'11<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica), D e D', quando presenti, sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente scelti tra un'unità



polietilenglicolica  $(-OCH_2CH_2)_n$ , in cui  $n$  è un numero intero compreso tra 1 e 24, un amminoacido, un peptide recante da 2 a 6 amminoacidi o un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, in cui l'alchile, alchenile o alchinile sono opzionalmente sostituiti con uno o più sostituenti indipendentemente scelti dal gruppo costituito da alogeno,  $-OR$ ,  $-NR'COR''$ ,  $-SR$  e  $-COR'$ . Preferibilmente,  $D$  e  $D'$  sono alchile lineare o ramificato recante da 1 a 4 atomi di carbonio.

In una dodicesima forma di realizzazione, il composto citotossico della presente invenzione come descritto nella prima, terza e nona forma di realizzazione è rappresentato dal seguente:

la doppia linea  $=$  tra  $N$  e  $C$  rappresenta un doppio legame;

$Y$  è  $-H$ ;

10  $W$  è  $C=O$ ;

$R_1, R_2, R_1', R_2', R_4$  e  $R_4'$  sono  $-H$ ;

uno di  $R_3$  o  $R_3'$  è opzionalmente un gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso e l'altro è  $-H$ ;

$R_6$  è  $-OMe$ ;

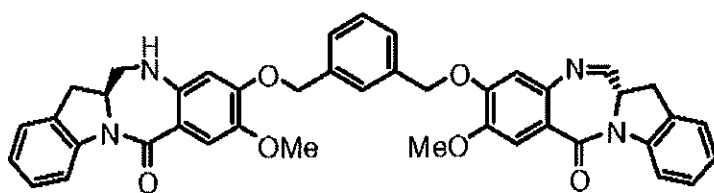
$Z$  e  $Z'$  sono  $-CH_2$ ;

15  $X'$  è  $-H$ ;

$Y'$  è  $-H$ ; e

$A$  e  $A'$  sono  $-O-$ .

In una tredicesima forma di realizzazione preferita, il composto citotossico della presente invenzione comprende:



(composto 29b),

20 o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

In una forma di realizzazione, il composto 29b può essere utilizzato nei metodi della presente invenzione descritti

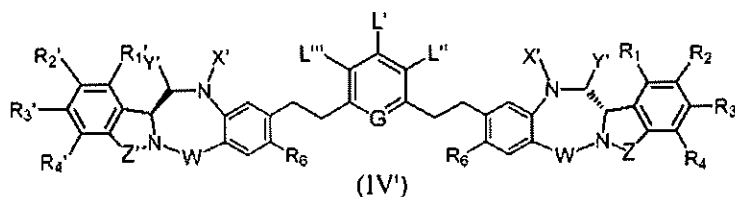
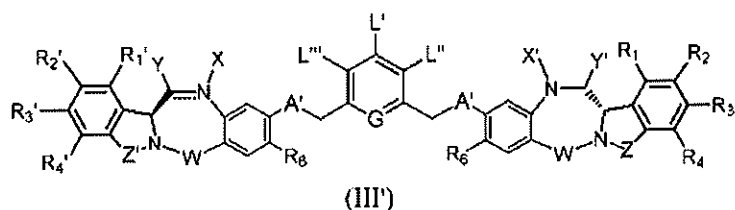
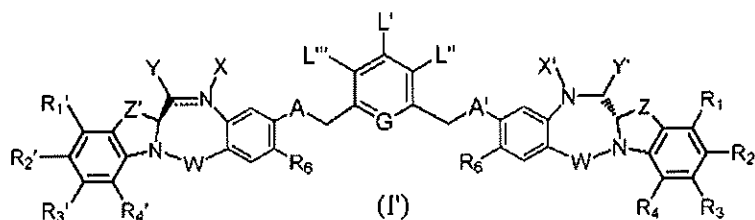
in questo contesto. In una forma di realizzazione preferita, il composto 29b può essere utilizzato per il trattamento di un disturbo proliferativo, come il cancro.

In un'altra forma di realizzazione, il composto 29b può essere utilizzato per lo screening di linee cellulari per identificare linee cellulari che sono sensibili a composti benzodiazepinici, quali i derivati delle benzodiazepine descritti in questo contesto.

#### COMPOSTI A BASE DI FARMACI E COMPOSTI A BASE DI FARMACI-LINKER

I composti citotossici descritti in precedenza comprendono un gruppo legante con un gruppo reattivo legato a esso, i quali composti possono essere ottenuti facendo reagire un reagente reticolante bifunzionale con composti "privi di linker" per formare i cosiddetti composti a base di farmaci-linker. In alternativa, in questo contesto sono anche descritti composti a base di farmaci che sono altrimenti identici ai composti a base di farmaci-linker, ma senza la frazione linker.

Pertanto, in questo contesto vengono descritti composti citotossici senza gruppi leganti ma che possono essere in grado di reagire con un agente reticolante bifunzionale per formare un composto dell'invenzione, come una qualsiasi dalla 1<sup>a</sup> alla 12<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica descritta in precedenza; o per formare un coniugato di agente legante cellulare dell'invenzione (come quelli descritti di seguito). Un composto citotossico privo di linker esemplificativo dell'invenzione include il composto 29b della 13<sup>a</sup> forma di realizzazione specifica precedente. I composti citotossici privi di linker dell'invenzione sono rappresentati da una qualsiasi delle seguenti formule (I'), (III') o (IV'):



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

la doppia linea = tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è assente e Y è -H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio e quando è un singolo legame, X è -

- 5 H o una frazione protettiva dell'ammina; preferibilmente, la doppia linea = tra N e C rappresenta un doppio legame; Y è -H o un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (*ad es.* piperidina, tetraidropirrololo, pirazolo, morfolina, *ecc.*), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M,



- SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido, in cui M è -H o un catione; come Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup>. Preferibilmente, M è -H o Na<sup>+</sup>. Preferibilmente, Y è scelto tra -SO<sub>3</sub>M, -OH, -OMe, -OEt o -NHOH. Più preferibilmente, Y è -SO<sub>3</sub>M o -OH; o, Y è un solfito (HSO<sub>3</sub>, HSO<sub>2</sub> o un sale di HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> o HSO<sub>2</sub><sup>-</sup> formato con un catione), metabisolfito (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), mono-, di-, tri- e tetra- tiosolfato (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub> o un sale di PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, POS<sub>3</sub><sup>3-</sup> o PS<sub>4</sub><sup>3-</sup> formato con un catione), estere tiosolfato (R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>S-, R<sup>i</sup>SO, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub> tiosolfato (HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), ditionite (HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> formato con un catione) fosforoditioato (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH) o un suo sale formato con un catione), acido idrossamico (R<sup>k</sup> C(=O)NOH o un sale formato con un catione), formaldeide solfosilato (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> o un sale di HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup> formato con un catione, come HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) o una loro miscela, in cui R<sup>l</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 10 atomi di carbonio ed è
- 5  
10  
15  
20  
25
- sostituito con almeno un sostituito scelto tra -N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H e -PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup> può essere inoltre opzionalmente sostituito con un sostituito per un alchile descritto in questo contesto; R<sup>j</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio; R<sup>k</sup> è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile, eterociclice o eteroarile; preferibilmente, Y è un addotto di un bisolfito, un idrosolfito o un metabisolfito, o loro sali (come sale sodico);
- R, per ciascuna occorrenza, è indipendentemente scelto dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo o un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- R' e R'' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup> e un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- R<sup>c</sup> è -H o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio;

- n è un numero intero compreso tra 1 e 24;
- W è scelto tra C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO e SO<sub>2</sub>;
- X' è scelto tra -H, -OH, un gruppo protettivo dell'ammina, il gruppo legante, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -
- 5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio (ad esempio un fenile), un anello eteroarilico con da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo e un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P. Preferibilmente, X' è -H, -OH o -Me. Più preferibilmente, X' è -H;
- Y' è scelto dal gruppo costituito da -H, un gruppo osso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico
- 10 opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile con da 6 a 18 elementi opzionalmente sostituito, un anello eteroarilico con da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo, un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi. Preferibilmente, Y' è scelto tra -H o osso. Più preferibilmente, Y' è -H;
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>' , R<sub>2</sub>' , R<sub>3</sub>' e R<sub>4</sub>' sono ciascuno indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile
- 15 o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, alogeno, guanidina [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, un solfato -OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, una solfonammide rappresentata da -SO<sub>2</sub>NR'R'', ciano, un azido -COR', -OCOR', e -OCONR'R''. Preferibilmente, 1, 2, 3 o tutti R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>' e R<sub>3</sub>' sono -H;
- 20 R<sub>6</sub> è -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, alogeno, -OR<sup>c</sup> o -SR<sup>c</sup> in cui R<sup>c</sup> è -H, un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio. Preferibilmente, R<sub>6</sub> è -OMe o -SMe. Ancora più preferibilmente, R<sub>6</sub> è -OMe;
- Z e Z' sono indipendentemente scelti tra -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>'-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>'-CR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>- (CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>'-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>'-NR<sub>9</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>'-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>'- e -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>'-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>na</sub>'-;
- n' e na' sono uguali o diversi e sono scelti tra 0, 1, 2 e 3;
- 25 R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', un'unità



polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , un amminoacido, un'unità peptidica recante da 2 a 6 amminoacidi, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

$R_9$  è indipendentemente scelto tra -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

5 A e A' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra -O-, oxo ( $-C(=O)-$ ), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N( $R_5$ )- e -CRR'N( $R_5$ )-. Preferibilmente, A e A' sono uguali o diversi e sono scelti tra -O- e -S-. Più preferibilmente, A e A' sono -O-;

$R_5$  per ciascuna occorrenza è indipendentemente -H o un alchile lineare o ramificato opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

10 L', L'' e L''' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra -H, alogeno, un alchile, aloalchile, alcossi, aloalcossi lineare, ramificata o ciclico opzionalmente sostituito, -NO<sub>2</sub> o -CN;

G è scelto tra -CH- o -N-.

In alcune forme di realizzazione, la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame, Y non è -H.

15 In certe forme di realizzazione, la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un legame singolo o un legame doppio, a condizione che, quando esso è un doppio legame, X è assente ed Y è -H, e quando è un legame singolo, X è selezionato da -H o un gruppo ammino-protettivo (preferibilmente X è -H); W è C=O;  $R_1, R_2, R_3, R_4, R_1', R_2', R_3'$ , ed  $R_4$  sono -H; Z e Z' sono -CH<sub>2</sub>-; A e A' sono entrambi -O-; W è ( $-C=O$ )-; G è -CH-;  $R_6$  è -H, o alchile C1-C10 lineare, alchile C1-C10 ramificato o alchile C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> ciclico, -O-alchile o -O- alo-alchile opzionalmente sostituito, come -OMe; X' è selezionato dal gruppo costituito da -H, -OH, alchile, alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico, sostituito o non sostituito, 20 avente da 1 a 10 atomi di carbonio, fenile, e un gruppo ammino-protettivo; ed Y' è selezionato dal gruppo costituito da -H, un gruppo osso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico, sostituito o non sostituito, avente da 1 a 10 atomi di carbonio.

Preferibilmente, quando Y non è -H, Y è scelto tra -OR, -OCOR', -SR, -NR'R'', -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>2</sub>M, o -OSO<sub>3</sub>M, in cui M è -H o un catione come Na<sup>+</sup>. K<sup>+</sup>. Preferibilmente, Y è selezionato da -H, -OH, -OMe, -OEt, -NHOH o -SO<sub>3</sub>M (ad

*esempio* Y è -OH, -OMe, -OEt, -NHOH o -SO<sub>3</sub>M). Ancora più preferibilmente, Y è -H, -OH o -SO<sub>3</sub>M (*ad esempio* Y è -OH o -SO<sub>3</sub>M), preferibilmente M è -H o Na<sup>+</sup>.

In certe forme di realizzazione, la doppia linea == tra N e C rappresenta un legame singolo o un legame doppio, a condizione che, quando esso è un doppio legame, X è assente ed Y è -H, e quando è un legame singolo, X è selezionato da -H, o un gruppo ammino-protettivo (preferibilmente X è -H); W è C=O; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>', R<sub>4</sub>', X' ed Y' sono -H; Z e Z' sono -CH<sub>2</sub>-; A e A' sono entrambi -O-; W è -(C=O)-; G è -CH-; R<sub>6</sub> è -H, alchile C1-C10 lineare opzionalmente sostituito, alchile C1-C10 o alchile ciclico C3-C7, -O-alchile o -O-alo-alchile, come -OMe.

Gli agenti reticolanti bifunzionali possono essere qualsiasi linker bifunzionale noto nella tecnica. Ad esempio, i linker bifunzionali che possono essere usati per realizzare i composti farmaco-linker sono quelli che formano legami disolfuro, legami tioetere, legami acido labili, legami fotolabili, legami peptidasi labili e legami esterasi labili con i composti citotossici (si vedano ad esempio i brevetti U.S. 5.208.020, 5.475.092, 6.441.163, 6.716.821, 6.913.748, 7.276.497, 7.276.499, 7.368.565, 7.388.026 e 7.414.073. Preferibilmente, gli agenti reticolanti bifunzionali sono quelli che formano legami disolfuro, tioetere e legami peptidasi-labili con i composti citotossici. Altri agenti reticolanti bifunzionali che possono essere usati nella presente invenzione includono linker non scindibili, come quelli descritti nella pubblicazione U.S. numero U.S. 2005/0169933 o linker carichi o linker idrofili e sono descritti in U.S. 2009/0274713, U.S. 2010/01293140 e WO 2009/134976. Gli agenti reticolanti bifunzionali che possono essere utilizzati per realizzare i composti (farmaco-linker) della presente invenzione includono anche quelli descritti in *Thermo Scientific Pierce Crosslinking Technical Handbook*.

#### SINTESI DI COMPOSTI CITOTOSSICI

Processi rappresentativi per preparare composti dimerici citotossici della presente invenzione sono mostrati nelle FIGG. 1-11. I dimeri sono stati preparati facendo reagire un monomero con composti linker che possiedono due gruppi uscenti come alogeno, triflato, mesilato o tosilato come descritto per la sintesi di 1c in FIG. 1. La sintesi di dimeri rappresentativi che recano una frazione disolfuro o tiolo per consentire il legame agli agenti leganti cellulari tramite legami riducibili o non riducibili è mostrata nelle FIGG. 1-5; 7; 8; e 10. Nella FIG. 1 un linker contenente una frazione corta di polietilenglicole e un disolfuro alchilico è stato preparato mediante amminazione riduttiva di 1a. La conversione

di 1b al suo mesilato corrispondente e l'accoppiamento con l'unità monomerica IBD (indolinobenzodiazepina) ha dato il dimero 1c che è stato ridotto alla monoimmuna, convertito in tiolo libero e accoppiato a 2 a dare il composto 1g della presente invenzione. Nella FIG. 3, è stata preparata una forma modificata di monomero IBD e accoppiata a dare un dimero della presente invenzione in cui l'immuna ridotta è stata convertita in un linker. La FIG. 4 descrive un dimero avente una  
5 frazione corta di polietilenglicole e un disolfuro ammidico che è stato ridotto in tiolo 4c e convertito in un estere reattivo. La FIG. 5 descrive la sintesi di disolfuro piridile contenente il linker 5e che è stato convertito in tiolo monoimmuna 5i della presente invenzione, prima di essere convertito in un estere reattivo. Le sintesi di dimeri rappresentativi che possiedono linker in grado di reagire con agenti leganti cellulari vengono preparate convertendo gli esteri metilici nei corrispondenti esteri reattivi di un gruppo uscente quale, tuttavia senza limitazione, esteri N-idrossisuccinimide, esteri  
10 N-idrossifalimmide, esteri N-idrossi-solfo-succinimide, esteri paranitrofenile, esteri pentafluorofenile sono mostrate nelle FIGG. 6, 9 e 11.

Processi rappresentativi per preparare i composti dimerici citotossici della presente invenzione adatti per la coniugazione in una fase con un agente legante cellulare sono mostrati nelle FIGG. 1 e 12-19. In tutti questi esempi, un dimero contenente una frazione tiolica viene fatto reagire con un reagente reticolante bifunzionale avente un gruppo  
15 reattivo come, tuttavia senza limitazione, un tiopiridile, una maleimmide, ioduro, bromuro o tosilato da un lato, e un sostituente reattivo adatto per la reazione con un agente legante cellulare come, tuttavia senza limitazione, esteri N-idrossisuccinimide, esteri N-idrossifalimmide, esteri N-idrossi-solfo-succinimide, esteri paranitrofenile, esteri pentafluorofenile.

Processi di sintesi alternativi per preparare composti dimerici citotossici rappresentativi della presente  
20 invenzione sono mostrati nelle FIGG. 20-21. Nella FIG. 20, la sintesi del dimero mono-ridotto (ovvero avente un gruppo imminico) viene condotta attraverso un metodo di accoppiamento in due passaggi, in cui una forma ridotta del monomero è inizialmente accoppiata al linker per poi procedere con l'accoppiamento con il monomero IBD, oppure il dimero viene preparato usando una miscela sia del monomero ridotto sia del monomero IBD durante l'accoppiamento con il linker reattivo. Sebbene il dimero bi-ridotto sia potenzialmente un sottoprodotto della seconda via sintetica descritta in  
25 precedenza, una via più diretta è mostrata nella FIG. 21, in cui il monomero ridotto è accoppiato a entrambi con il linker

in modo diretto.

#### AGENTI LEGANTI CELLULARI

L'efficacia dei coniugati dell'invenzione come agenti terapeutici dipende dalla selezione accurata di un agente legante cellulare appropriato. Gli agenti leganti cellulari possono essere di qualsiasi tipo attualmente noto, oppure che  
5 diventi noto e includa peptidi e non-peptidi. Generalmente, questi possono essere anticorpi (soprattutto anticorpi monoclonali), linfocine, ormoni, fattori di crescita, vitamine (come folato ecc., che possono legarsi a un recettore di superficie cellulare, ad esempio un recettore del folato), molecole di trasporto di nutrienti (come transferrina) o qualsiasi altra molecola o sostanza legante cellulare.

In alcune forme di realizzazione, gli agenti leganti cellulari sono proteine o polipeptidi o composti comprendenti  
10 proteine o polipeptidi. Preferibilmente, le proteine o i polipeptidi comprendono uno o più residui di Lys con gruppi  $-NH_2$  di catena laterale. In alternativa o in aggiunta, le proteine o i polipeptidi comprendono uno o più residui di Cys. Il gruppo  $-SH$  di catena laterale dei residui Cys possono essere intatti o possono essere in un legame disolfuro che può essere ridotto. Preferibilmente, la riduzione del legame o legami disolfuro non influisce significativamente negativamente sulla funzione legante cellulare dei polipeptidi o proteine (*ad es.* nel caso dell'anticorpo o della sua porzione antigene-legante, la  
15 riduzione dei legami disolfuro non aumenta sostanzialmente la dissociazione di catene leggere/catene pesanti).

I gruppi  $-NH_2$  di catena laterale Lys e/o i gruppi  $-SH$  di catena laterale Cys possono essere covalentemente legati ai linker, che sono a loro volta legati ai composti dimerici dell'invenzione, coniugando in tal modo gli agenti leganti cellulari ai composti dimerici dell'invenzione. Ciascun agente legante cellulare a base di proteine può contenere più gruppi  $-NH_2$  di catena laterale di Lys e/o gruppi  $-SH$  di catena laterale di Cys disponibili per legare i composti dell'invenzione  
20 attraverso i reticolanti bifunzionali.

Esempi più specifici di agenti leganti cellulari che possono essere utilizzati includono:

anticorpi policlonali;

anticorpi monoclonali;

frammenti di anticorpi come Fab, Fab', e  $F(ab')_2$ , Fv, minicorpi, diacorpi, tricorpi, tetracorpi [Parham, *J. Immunol.*

25 131:2895-2902 (1983); Spring *et al. J. Immunol.* 113:470-478 (1974); Nisonoff *et al. Arch. Biochem. Biophys.* 89:230-

- 244 (1960), Kim *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, 7: 2486-2497 (2008), Carter, *Nature Revs.*, 6 : 343-357 (2006));  
interferoni (ad es.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ );  
linfocine quali IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;  
ormoni come insulina, TRH (ormone di rilascio della tiotropina), MSH (ormone melanocito-stimolante), ormoni  
5 steroidei, come androgeni ed estrogeni;  
fattori di crescita e fattori di stimolazione delle colonie come EGF, TGF- $\alpha$ , FGF, VEGF, G-CSF, M-CSF e GM-CSF  
(Burgess, *Immunology Today* 5:155-158 (1984));  
transferrina (O'Keefe *et al. J. Biol. Chem.* 260:932-937 (1985));  
vitamine, come folato;
- 10 Strutture proteiche basate su una sequenza consenso delle ripetizioni di fibronectina di tipo III (FN3) (anche note come centirine; vedere la pubblicazione di brevetto US 2010/0255056.  
Proteine progettate con ripetizione di anchirina (DARPin; domande di brevetto US n. 20040132028; 20090082274; 20110118146; 20110224100, C. Zahnd *et al.* 2010, *Cancer Res.*, 70; 1595-1605, le proteine strutturali del dominio di fibronectina (adnectine: domande di brevetto US nn. 20070082365; 20080139791.
- 15 Le tecniche con anticorpo monoclonale consentono la produzione di agenti leganti cellulari estremamente specifici sotto forma di anticorpi monoclonali specifici. In particolare, sono ben note nella tecnica le tecniche per la creazione di anticorpi monoclonali prodotti immunizzando topi, ratti, criceti o qualsiasi altro mammifero con l'antigene di interesse come la cellula bersaglio intatta, antigeni isolati dalla cellula bersaglio, l'intero virus, l'intero virus attenuato e proteine virali quali proteine di rivestimento virali. È possibile utilizzare anche cellule umane sensibilizzate. Un altro  
20 metodo per la creazione di anticorpi monoclonali è l'uso delle librerie fagiche di scFv (regione variabile a catena singola), in particolare scFv umano (si vedano ad es. Griffiths *et al.*, brevetti U.S. nn. 5.885.793 e 5.969.108; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; Liming *et al.*, WO 99/06587). Inoltre, possono anche essere utilizzati gli anticorpi sottoposti a resurfacing descritti nel brevetto U.S. n. 5.639.641, così come gli anticorpi chimerici e gli anticorpi umanizzati. La selezione dell'agente legante cellulare appropriato è una questione di scelta che dipende dalla popolazione cellulare specifica da  
25 bersagliare, ma in generale gli anticorpi monoclonali umani sono preferiti, se ne è disponibile uno appropriato.

Ad esempio, l'anticorpo monoclonale MY9 è un anticorpo IgG1 murino che si lega in particolare all'antigene CD33 {J.D. Griffin *et al* 8 Leukemia Res., 521 (1984)} e può essere utilizzato se le cellule bersaglio esprimono il CD33 come nella patologia della leucemia mielogeno acuta (AML). L'agente legante cellulare può essere qualsiasi composto in grado di legare una cellula, in modo specifico o non specifico. Generalmente, questi possono essere anticorpi (soprattutto anticorpi monoclonali e frammenti di anticorpo), interferoni, linfocine, ormoni, fattori di crescita, vitamine, molecole di trasporto di nutrienti (come transferrina) o qualsiasi altra molecola o sostanza legante cellulare.

Laddove l'agente legante cellulare è un anticorpo, esso si lega a un antigene che è un polipeptide e può essere una molecola transmembrana (*ad es.* recettore) o un ligando come un fattore di crescita. Antigeni esemplificativi comprendono molecole come renina; un ormone della crescita, tra cui ormone della crescita umano e ormone della crescita bovina; fattore di rilascio dell'ormone della crescita; ormone paratiroideo; ormone stimolante la tiroide; lipoproteine; alfa-1-antitripsina; catena A dell'insulina A; catena B dell'insulina B; proinsulina; ormone follicolo stimolante; calcitonina; ormone luteinizzante; glucagone; fattori di coagulazione come fattore vmc, fattore IX, fattore tissutale (TF) e fattore di von Willebrand; anti-fattori di coagulazione come proteina C; fattore natriuretico atriale; tensioattivo polmonare; un attivatore del plasminogeno come urochinasi o attivatore del plasminogeno di tipo urinario o tissutale (t-PA) di essere umano; bombesina; trombina; fattore di crescita ematopoietico; fattore di necrosi tumorale-alfa e -beta; encefalinasi; RANTES (*Regulated on Activation Normally T-cell Expressed and Secreted*); proteina infiammatoria di macrofagi di essere umano (MIP-1-alfa); un'albumina di siero come albumina di siero umano; sostanza inibente mulleriana; catena A della relaxina; catena b della relaxina; prorelaxina; peptide associato alle gonadotropine di topo; una proteina microbica come beta-lattamasi; DNasi; IgE; un antigene associato ai linfociti T citotossici (CTLA) come CTLA-4; inibina; activina; fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF); recettori di ormoni e fattori di crescita; proteina A o D; fattori reumatoidi; un fattore neurotrofico di derivazione ossea come fattore neurotrofico di derivazione cerebrale (BDNF, *Brain Derived Neurotrophic Factor*), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT4, NT-5 o NT-6), o un fattore di crescita nervosa, come NGF-3; fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF); fattore di crescita di fibroblasti come aFGF e bFGF; recettore 2 del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR2), fattore di crescita dell'epidermide (EGF); fattore di crescita trasformante (TGF) come TGF-alfa e TGF-beta, tra cui TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 o TGF- $\beta$ 5; fattore di crescita



insulino-simile I e II (IGF-I ed IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebrale), proteine leganti fattori di crescita insulino-simili, melanotransferrina, EpCAM, GD3, FLT3, PSMA, PSCA, MUC1, MUC16, STEAP, CEA, TENB2, recettori EphA, recettori EphB, recettore dei folati, FOLR1, mesotelina, cripto, integrine alfa<sub>v</sub>beta<sub>6</sub>, VEGF, VEGFR, EGFR, un recettore della transferrina, IRTA1, IRTA2, IRTA3, IRTA4, IRTA5; proteine CD come CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 o un anticorpo che si lega a uno o più antigeni tumore-associati o ai recettori di superficie cellulare descritti nella pubblicazione US n. 20080171040 o nella pubblicazione US n. 20080305044; eritropoietina; fattori osteoinduttivi; immunotossine; una proteina ossea morfogenetica (BMP, *Bone Morphogenetic Protein*); un interferone come interferone-alfa, -beta, e -gamma; fattori stimolanti le colonie (CSF, *Colony Stimulating Factor*), ad esempio M-CSF, GM-CSF e G-CSF; interleuchine (IL), ad esempio IL-1 a IL-10; superossido dismutasi; recettori di cellule T; proteine di membrana superficiale; fattore di accelerazione del decadimento; antigene virale come ad esempio una porzione dell'involuppo di HIV; proteine di trasporto; recettori di localizzazione; addressine; proteine di regolazione; integrine come CD11a, CD11c, CD11b, CD18, ICAM, VLA-4 e VCAM; un antigene tumore-associato come recettore HER2, HER3 e HER4; endogлина, c-Met, c-kit, IGF1R, PSGR, NGEP, PSMA, PSCA, LGR5, B7H4, e frammenti di qualsiasi dei polipeptidi sopra elencati.

Inoltre, GM-CSF, che si lega a cellule mieloidi, può essere utilizzato come un agente legante cellulare a cellule affette da leucemia mielogenica acuta. IL-2 che si lega a cellule T attivate, può essere utilizzato per la prevenzione di rigetto di trapianto, per la terapia e la prevenzione di patologia di rigetto contro l'ospite e per il trattamento di leucemia a cellule T acuta. MSH, che si lega a melanociti, può essere utilizzato per il trattamento di melanoma, così come gli anticorpi diretti contro melanomi. L'acido folico può essere utilizzato per bersagliare il recettore del folato espresso sui tumori ovarici e di altro tipo. Il fattore di crescita dell'epidermide può essere utilizzato per bersagliare cancri squamosi, come quelli del polmone, della testa e del collo. Le somatostatine possono essere utilizzate per bersagliare neuroblastomi e altri tipi di tumori.

Il cancro della mammella e dei testicoli può essere bersagliato correttamente con estrogeno (o analoghi di estrogeno) o androgeno (o analoghi di androgeno), rispettivamente, come agenti leganti cellulari.



In una forma di realizzazione, l'agente legante cellulare è costituito da anticorpi monoclonali umanizzati. In un'altra forma di realizzazione, l'agente legante cellulare è huMy9-6 o altri anticorpi correlati, che sono descritti nel brevetto US nn. 7.342.110 e 7.557.189. In un'altra forma di realizzazione, l'agente legante cellulare è un anticorpo anti-recettore dei folati descritto nella domanda provvisoria US 61/307.797, 61/346.595, 61/413,172 e domanda US n. 13/033.723 (pubblicata come US 2012-0009181 A1).

In certe forme di realizzazione, l'agente legante cellulare può essere un anticorpo monoclonale o loro porzioni leganti l'antigene che condividono sequenze che sono critiche per il legame all'antigene con un anticorpo qui descritto, come huMy9-6 o rispettivi anticorpi correlati descritti nel brevetto US nn. 7.342.110 e 7.557.189. Questi anticorpi derivati possono avere (1) regioni CDR3 di catena leggera e/o catena pesante; (2) e/o regioni CDR1, CDR2 e CDR3 di catena pesante; o (3) regioni di catena leggera e/o catena pesante sostanzialmente uguali o identiche rispetto a un anticorpo qui descritto. Sequenze all'interno di queste regioni possono contenere sostituzioni conservative di amminoacido, ivi incluse sostituzioni all'interno delle regioni CDR. Preferibilmente, non vi sono più di 1, 2, 3, 4 o 5 sostituzioni conservative. In certe forme di realizzazione, gli anticorpi derivati hanno una regione di catena leggera e/o una regione di catena pesante che è almeno 90%, 95%, 99% o 100% circa identica a quella di un anticorpo qui descritto. Questi anticorpi derivati possono avere sostanzialmente la stessa specificità di legame e/o affinità per l'antigene bersaglio rispetto a un anticorpo qui descritto. Preferibilmente, i valori di  $K_d$  e/o  $k_{off}$  degli anticorpi derivati sono entro 10 volte (maggiore o minore), 5 volte (maggiore o minore), 3 volte (maggiore o minore), o 2 volte (valore maggiore o minore) di un anticorpo qui descritto. Questi anticorpi derivati possono essere anticorpi completamente umani, o anticorpi umanizzati o anticorpi chimerici. Gli anticorpi derivati possono essere prodotti secondo qualsiasi dei metodi riconosciuti nel ramo.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo è un anticorpo umanizzato anti-recettore dei folati o suo frammento di legame all'antigene, che si lega specificatamente a un recettore dei folati di essere umano 1, in cui l'anticorpo comprende: (a) una CDR1 di catena pesante comprendente GYFMN (SEQ ID NO: 1); una CDR2 di catena pesante comprendente RIHPYDGDTFYNQXaa<sub>1</sub>FXaa<sub>2</sub>Xaa<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 2); e una CDR3 di catena pesante comprendente YDGSRAMDY (SEQ ID NO: 3); e (b) una CDR1 di catena leggera comprendente KASQSVSFAGTSLMH (SEQ ID NO: 4); e una CDR2 di catena leggera comprendente RASNLEA (SEQ ID NO: 5); e una CDR3 di catena leggera comprendente QQSREYPYT



(SEQ ID NO: 6); in cui Xaa<sub>1</sub> è scelto tra K, Q, H e R; Xaa<sub>2</sub> è scelto tra Q, H, N e R; e Xaa<sub>3</sub> è scelto tra G, E, T, S, A e V. Preferibilmente, la sequenza CDR2 di catena pesante comprende RIHPYDGDTFYNQKFQG (SEQ ID NO: 7).

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo antri recettori dei folati è un anticorpo umanizzato o suo frammento legante l'antigene che lega specificamente il recettore dei folati di essere umano 1 comprendente la catena pesante avente

5 la sequenza amminoacidica di

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGGKATLTV  
DKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG  
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP  
KSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
10 PREEQYNSTYRVSVLTVHLQDNLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV  
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNH  
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 8).

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo antifolato è un anticorpo umanizzato o un suo frammento antigene-  
legante codificato dal DNA plasmidico depositato all'ATCC il 7 aprile 2010 e avente nn. di deposito ATCC PTA-10772  
15 e PTA-10773 o 10774.

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo dei recettori antifolato è un anticorpo umanizzato o suo frammento  
antigene-legante che lega specificamente il recettore del folato umano 1 comprendente la catena leggera avente la  
sequenza amminoacidica di

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDF  
20 TLNISPVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
ID NO:9); oppure

DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQPQGGQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDF  
TLTISPVEAEDAATYYCQSQSREYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
25 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ



ID NO:10).

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo dei recettori antifolato è un anticorpo umanizzato o suo frammento antigene-legante che lega specificamente il recettore del folato umano 1 comprendente la catena pesante avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 8, e la catena leggera avendo la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 9 o  
5 SEQ ID NO: 10. Preferibilmente, l'anticorpo comprende la catena pesante avente la sequenza di amminoacidi di SEQ ID NO: 8, e la catena leggera avente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 10 (hu FOLR1).

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo antifolato è un anticorpo umanizzato o un suo frammento antigene-legante codificato dal DNA plasmidico depositato all'ATCC il 7 aprile 2010 e avente nn. di deposito ATCC PTA-10772 e PTA- 10773 o 10774.

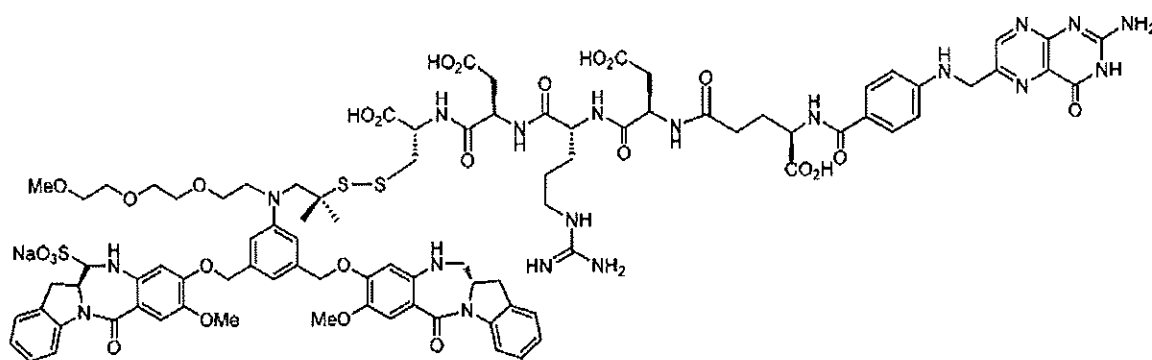
10 In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo dei recettori antifolato è un anticorpo umanizzato o suo frammento antigene-legante comprendente un dominio variabile di catena pesante che ha almeno il 90%, 95%, 99% o 100% circa di omologia di sequenza con  
QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKFQGKATLTV  
DKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 11) e un dominio di catena  
15 leggera che ha almeno il 90%, 95%, 99% o 100% circa di omologia di sequenza con  
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDF  
TLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:12); o  
DIVLTQSPLSLAVSLGQPAISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDF  
TLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 13).

20 CONIUGATI AGENTE LEGANTE CELLULARE-FARMACO

La presente invenzione fornisce inoltre coniugati agente legante cellulare-farmaco comprendenti un agente legante cellulare collegato a uno o più composti citotossici della presente invenzione attraverso una varietà di linker, tra cui, ma senza limitazioni, linker disolfuro, linker tioetere, linker a legame ammidico, linker labili alle peptidasi, linker labili ad acido, linker labili alle esterasi.

25 Coniugati rappresentativi dell'invenzione sono anticorpo/composto citotossico, frammento di

5 anticorpo/composto citotossico, fattore di crescita dell'epidermide (EGF)/composto citotossico, ormone stimolante i melanociti (MSH)/composto citotossico, ormone stimolante la tiroide (TSH)/composto citotossico, somatostatina/composto citotossico, folato/ composto citotossico, estrogeno/composto citotossico, analogo estrogenico/composto citotossico, androgeno/composto citotossico e analogo androgenico/composto citotossico. Un coniugato rappresentativo di folato/composto citotossico è raffigurato a seguire, con l'opzionale addotto - SO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> sul legame imminico di uno dei due monomeri del farmaco. Uno schema di sintesi rappresentativo di questo coniugato è mostrato nella Figura 54.



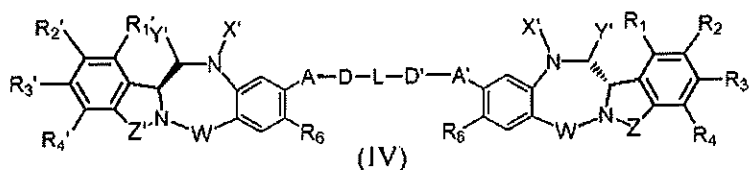
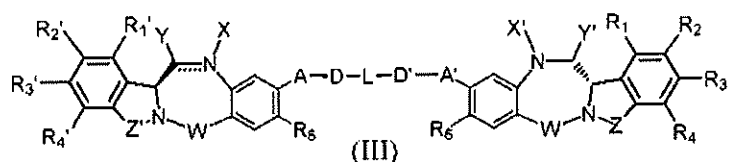
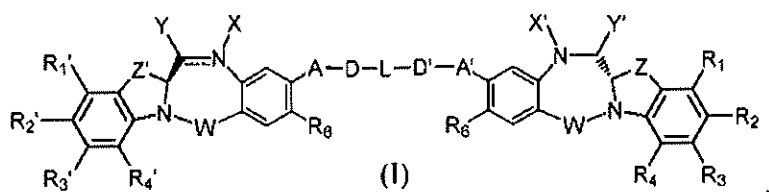
coniugato folato/composto citotossico

10 In una forma di realizzazione preferita, la presente invenzione fornisce pertanto coniugati comprendenti un composto di dimero di indolinobenzodiazepina (ad esempio i composti delle formule (I)-(IV), (IA)-(IVA) e (IB)-(IVB)) e l'agente legante cellulare legato attraverso un legame covalente. Il linker può essere tagliato nel sito del tumore/in corrispondenza di cellule proliferanti indesiderate per rilasciare l'agente citotossico al suo bersaglio in una pluralità di modi. Il linker può essere tagliato, ad esempio, con un pH basso (idrazone), ambiente riduttivo (disolfuro), proteolisi  
 15 (legame ammidico/peptidico), o attraverso una reazione enzimatica (esterasi/glicosidasi).

In un aspetto preferito, coniugati citotossici rappresentativi dell'invenzione sono un composto dimerico anticorpo/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico frammento di anticorpo/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico fattore di crescita dell'epidermide (EGF)/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico ormone stimolante i

melanociti (MSH)/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico ormone stimolante la tiroide (TSH)/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico somatostatina/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico folato/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico estrogeno/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico analogo estrogenico/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico inibitore dell'antigene prostata-specifico di membrana (PSMA)/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico inibitore di matriptasi/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico proteine progettate con ripetizione di anchirina (DARPin)/indolinobenzodiazepina, un composto dimerico androgeno/indolinobenzodiazepina e un composto dimerico analogo androgenico/indolinobenzodiazepina.

In particolare, nella quattordicesima forma di realizzazione specifica, l'invenzione fornisce un coniugato comprendente: un composto citotossico e un agente legante cellulare (CBA), in cui il composto citotossico comprende un gruppo legante che lega covalentemente il composto citotossico al CBA e in cui il composto citotossico è rappresentato da una qualsiasi delle seguenti formule:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è assente e Y è -H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio e quando è un singolo legame, X è -H, il gruppo legante o una frazione protettiva dell'ammina;

- 5 Y è -H o un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', -OCOOR', - OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (*ad es.* piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido; oppure
- 10 Y è un solfito (HSO<sub>3</sub>, HSO<sub>2</sub> o un sale di HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> o HSO<sub>2</sub> formato con un catione), metabisolfito (N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), mono-, di-, tri- e tetra-tiofosfato (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub> o un sale di PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, POS<sub>3</sub><sup>3-</sup> o PS<sub>4</sub><sup>3-</sup> formato con un catione), estere tiofosfato (R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>S-, R<sup>i</sup>SO, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>tiosolfato (HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), ditionite (HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), fosforoditioato (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH) o un suo sale formato con un catione), acido idrossamico (R<sup>k</sup> C(=O)NOH o un sale formato con un catione), formaldeide solfosilato (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> o un sale di HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup> formato con un catione, come HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>·Na<sup>+</sup>) o una loro miscela, in cui R<sup>l</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 10 atomi di carbonio ed è sostituito con almeno un sostituito scelto tra -N(R<sup>j</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, e -PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup> può essere inoltre opzionalmente sostituito con un sostituito per un alchile descritto in questo contesto; R<sup>j</sup> è un alchile lineare o modificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio; R<sup>k</sup> è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio,
- 15 arile, eterociclice o eteroarile; preferibilmente, Y è un addotto di un bisolfito, un idrosolfito o un metabisolfito, o loro sali (come sale sodico);
- M è -H oppure un catione;
- R, per ciascuna occorrenza, è indipendentemente scelto dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -
- 25 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5

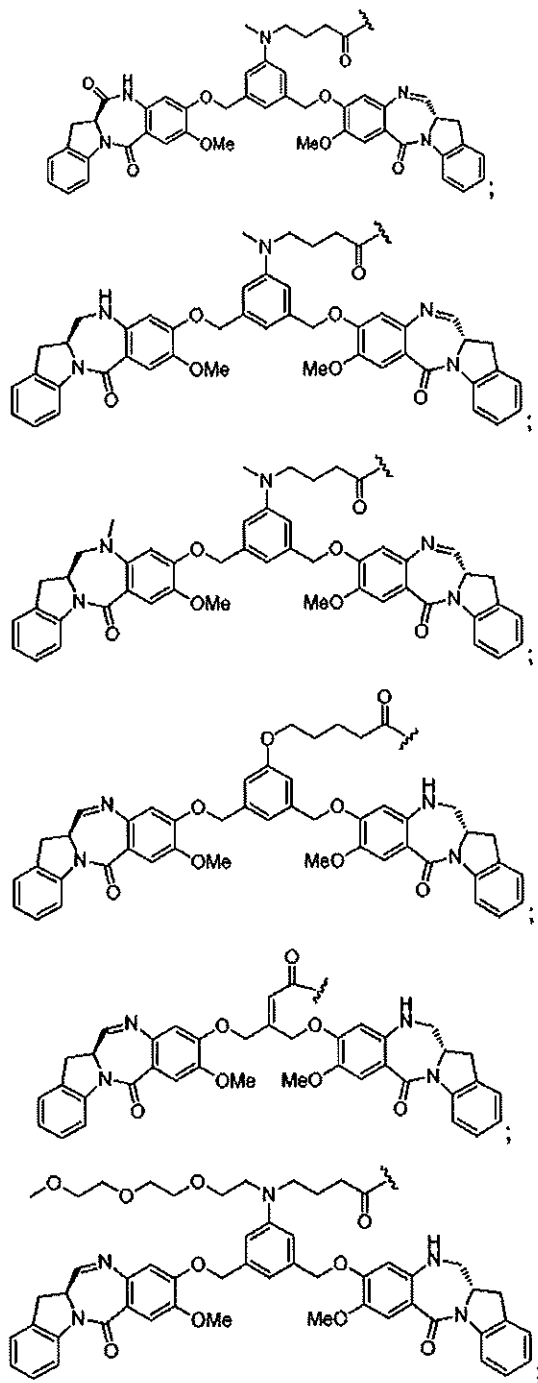


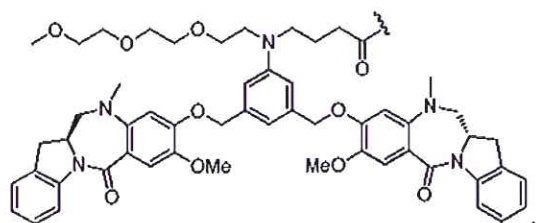
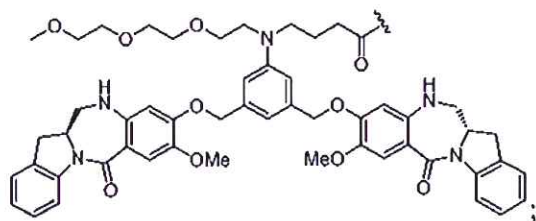
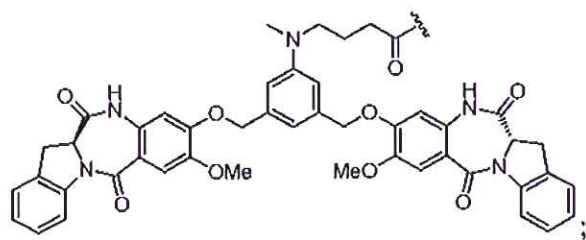
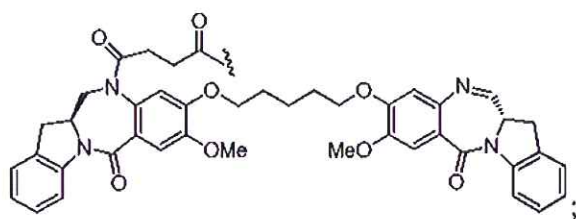
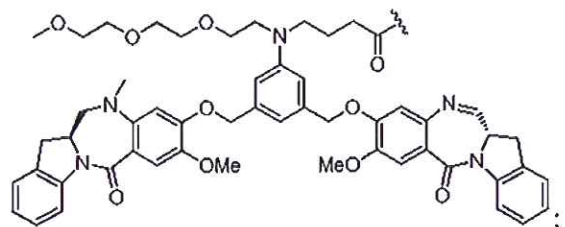
- a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo o un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- R' e R'' sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, un alchile, alchenile o alchinile
- 5 lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup> e un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- R<sup>c</sup> -H o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio o il gruppo legante; n è un numero intero compreso tra 1 e 24;
- 10 W è scelto tra C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO e SO<sub>2</sub>;
- X' è scelto tra -H, un gruppo protettivo dell'ammina, il gruppo legante, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo e un anello
- 15 eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- Y' è scelto tra -H, un gruppo osso, il gruppo legante, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile con da 6 a 18 elementi opzionalmente sostituito, un anello eteroarilico con da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente
- 20 scelti tra azoto, ossigeno e zolfo, un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi;
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' e R<sub>4</sub>' sono ciascuno indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, alogeno, guanidina [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, -NR'COR'', -
- 25 SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato-SO<sub>3</sub> M<sup>+</sup>, un solfato -OSO<sub>3</sub>



- $M^+$ , una solfonammide rappresentata da  $-SO_2NR'R''$ , ciano, un azido,  $-COR'$ ,  $-OCOR'$ ,  $-OCONR'R''$  e il gruppo legante;  
 $R_6$  è  $-H$ ,  $-R$ ,  $-OR$ ,  $-SR$ ,  $-NR'R''$ ,  $-NO_2$ , alogeno o il gruppo legante;  
 $Z$  e  $Z'$  sono indipendentemente scelti tra  $-(CH_2)_{n'}$ ,  $-(CH_2)_n-CR_7R_8-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_n-NR_9-(CH_2)_{na'}$ ,  $-(CH_2)_n-O-(CH_2)_{na'}$  e  $-(CH_2)_n-S-(CH_2)_{na'}$ ;
- 5  $n'$  e  $na'$  sono uguali o diversi e sono scelti tra 0, 1, 2 e 3;  
 $R_7$  e  $R_8$  sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente scelti tra  $-H$ ,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$ ,  $-NHR'$ , un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n$ , un amminoacido, un'unità peptidica recante da 2 a 6 amminoacidi, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;  
 $R_9$  è indipendentemente scelto tra  $-H$ , un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10
- 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n$ ;  
 $A$  e  $A'$  sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra  $-O-$ , osso  $(-C(=O)-)$ ,  $-CRR'O-$ ,  $-CRR'-$ ,  $-S-$ ,  $-CRR'S-$ ,  $-NR_5$  e  $-CRR'N(R_5)-$ ;  
 $R_5$  per ciascuna occorrenza è indipendentemente  $-H$  o un alchile lineare o ramificato opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;
- 15  $D$  e  $D'$  sono uguali o diversi e sono indipendentemente assenti o scelti dal gruppo costituito da un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un amminoacido, un peptide recante da 2 a 6 amminoacidi e un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n$ ;  
 $L$  è assente, il gruppo legante, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n$ , un alchile o alchenile lineare, ramificato, ciclico o lineare avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un gruppo fenile, un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi o un anello
- 20 eteroarilico con da 5 a 18 elementi avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P, in cui l'alchile o alchenile è opzionalmente sostituito con il gruppo legante; il fenile o l'anello eterociclico o eteroarilico possono essere opzionalmente sostituiti, in cui il sostituito può essere il gruppo legante, in cui il composto non è uno dei composti descritti immediatamente di seguito.

Il composto non è alcuno dei seguenti composti:

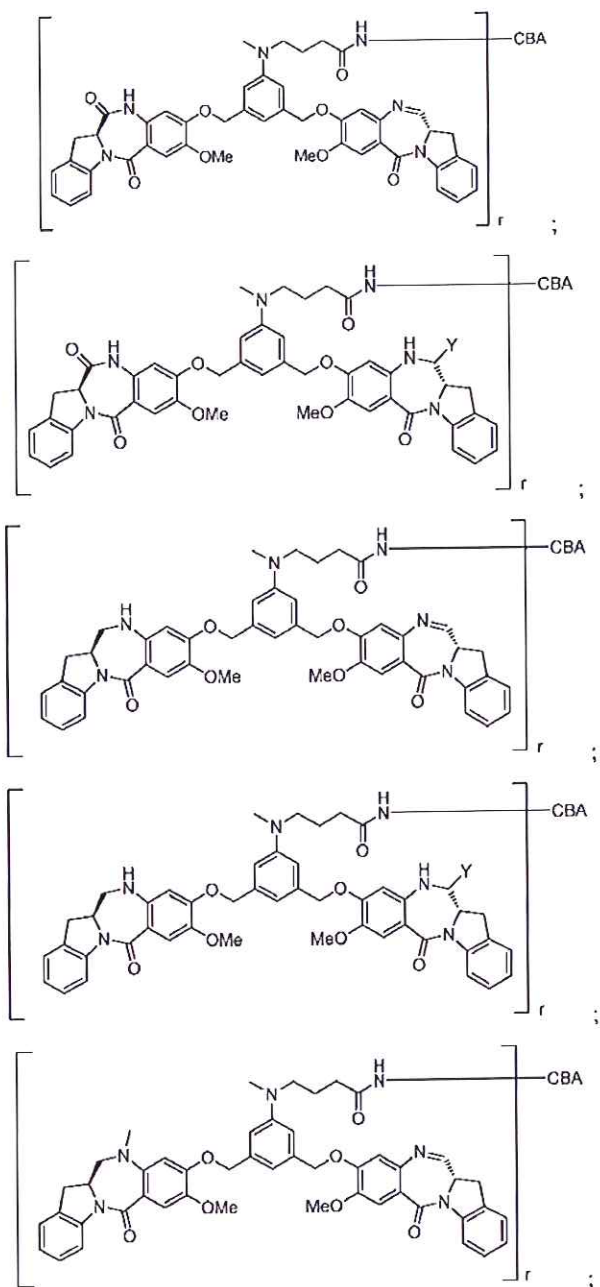


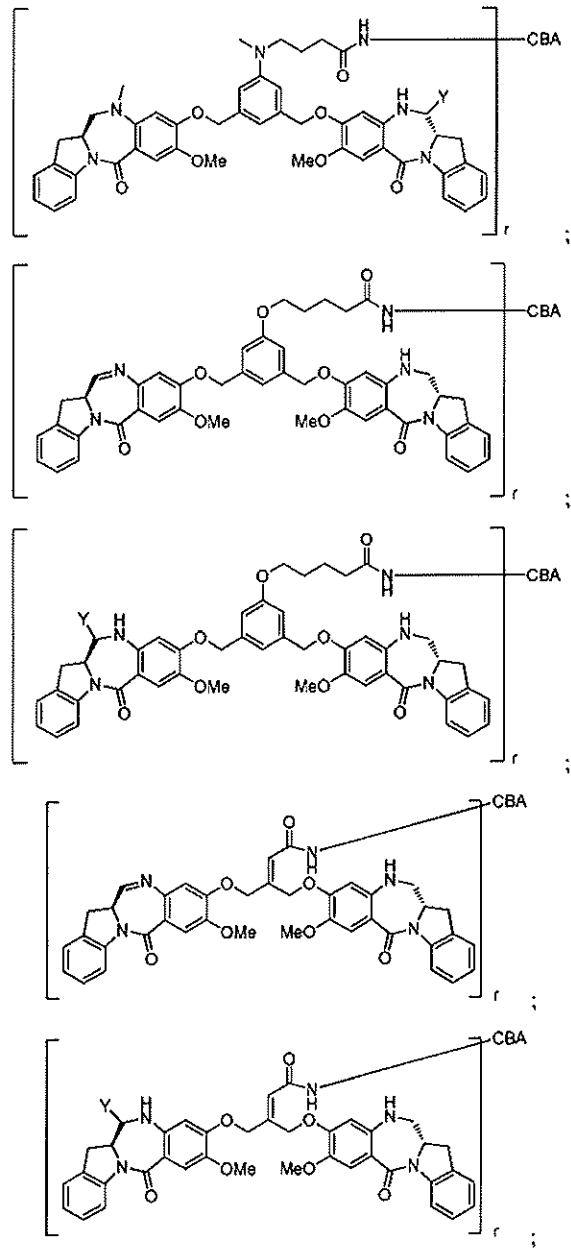


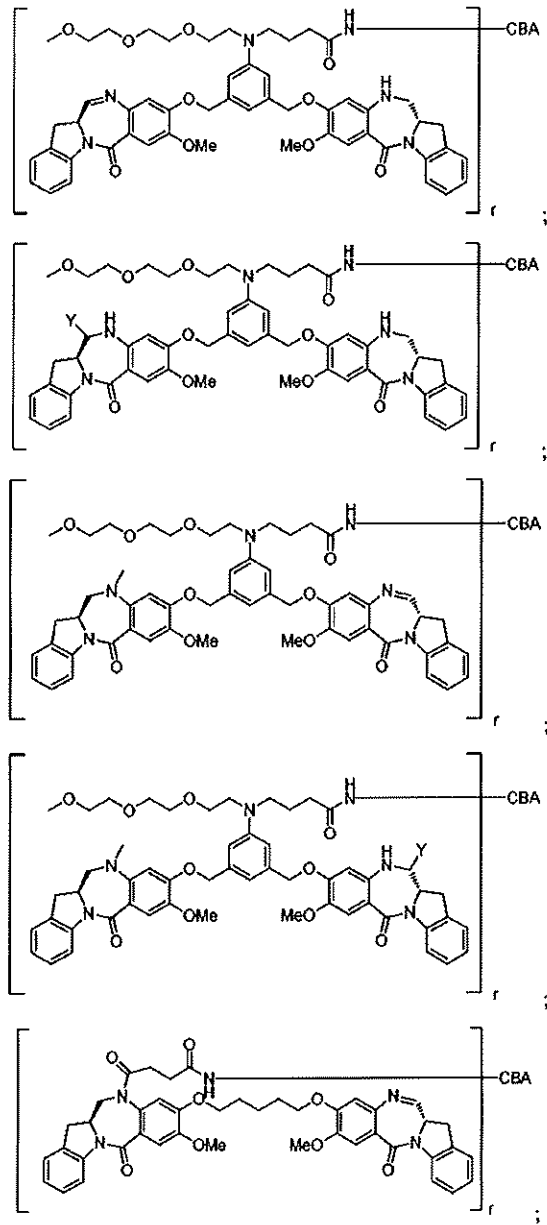
In alcune forme di realizzazione, X non è il gruppo legante. In alcune forme di realizzazione, la doppia linea == tra N e C rappresenta un singolo legame, Y non è -H.

In alcune forme di realizzazione, Y è un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', - OCOOR', -OCONR'R'', - NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (*ad es.* piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina, *ecc.*), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido.

In alcune forme di realizzazione, i coniugati dell'invenzione comprendono quanto segue:







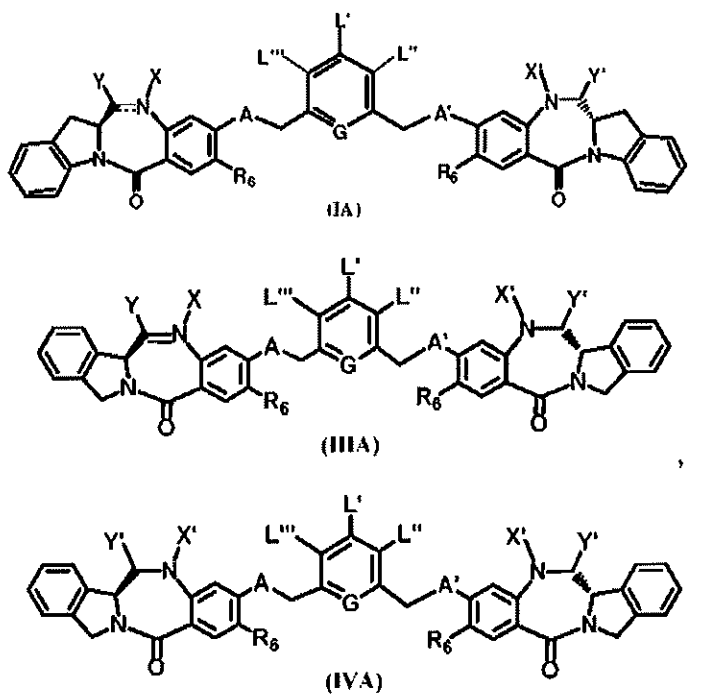


in cui:

CBA è l'agente legante cellulare, r è un intero da 1 a 10, Y è -H, un addotto di un bisolfito, un idrosolfito o un metabisolfito, o loro sali, oppure -SO<sub>3</sub>M, ed M è -H o un catione farmaceuticamente accettabile.

In alcune forme di realizzazione, L è assente o è scelto da un gruppo fenile opzionalmente sostituito e un gruppo piridile opzionalmente sostituito, in cui il gruppo fenile e piridile reca il gruppo legante, o L è un gruppo amminico recante il gruppo legante (*vale a dire*, -N(gruppo legante)-) o L è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio e recante il gruppo legante.

Nella quindicesima forma di realizzazione specifica, il composto è rappresentato da qualsiasi delle seguenti formule:



in cui:

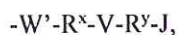
L', L'' e L''' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-R}^c$ , alogeno, guanidina  $[-\text{NH}(\text{C}=\text{NH})\text{NH}_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NR'COR'', -SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>M, un solfato -OSO<sub>3</sub>M-, una solfonammide rappresentata da SO<sub>2</sub>NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e il gruppo legante, purché solo uno di L', L'' e L''' sia il gruppo legante; e

G è scelto tra -CH- o -N-. I gruppi rimanenti sono come descritti nella quattordicesima forma di realizzazione specifica di cui sopra.

10 In alcune forme di realizzazione, uno di L', L'' o L''' è il gruppo legante, mentre gli altri sono -H. Preferibilmente, L' è il gruppo legante e L' e L'' sono -H.

In alcune forme di realizzazione, A e A' sono entrambi -O-, R<sub>6</sub> è -OMe e G è -CH-.

In una sedicesima forma di realizzazione specifica, L' è rappresentato dalla seguente formula:



15 in cui:

W' e V sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente assenti o scelti tra -CR<sup>e</sup>R<sup>e'</sup>-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -SO<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -C(=O)-N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)O-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -SS- o -C(=O)- o un amminoacido o un peptide avente da 2 a 8 amminoacidi;

20 R<sup>x</sup> e R<sup>y</sup> sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente assenti o un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un anello eterociclico avente da 3 a 8 elementi recante da 1 a 3 eteroatomi scelti tra O, N o S;

R<sup>e</sup> e R<sup>e'</sup> sono uguali o diversi e sono scelti tra -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o  $-(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_n\text{-R}^k$ , in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi

25 di carbonio, opzionalmente recante un gruppo amminico secondario (*ad es.* -NHR<sup>101</sup>) o amminico terziario (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>)

o un eterociclo con 5 o 6 elementi contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui  $R^{101}$  e  $R^{102}$  sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio; preferibilmente,  $R^{101}$  e  $R^{102}$  sono ciascuno indipendentemente un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

- 5  $n$  è un numero intero compreso tra 1 e 24; e  
 $J$  è legato in modo covalente al CBA, ed è selezionato da una succinimide, un acetammido, -S-, -SS-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH(Me)S-, -C(Me)<sub>2</sub>S-, -NR<sup>cl</sup>-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>cl</sup>-, -NR<sup>cl</sup>N- e -C(=O)-, in cui R<sup>cl</sup> è -H o un alchile lineare o ramificato, sostituito o non sostituito, avente da 1 a 4 atomi di carbonio.

In certe forme di realizzazione,  $J$  è -S-, -SS-, una succinimide o -C(=O)-.

- 10 In alcune forme di realizzazione, R<sup>e</sup> è -H o -Me; R<sup>e</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>;  $n$  è un numero intero compreso tra 2 e 8; e R<sup>k</sup> è -H, -Me o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub> e il resto delle variabili è come descritto in precedenza nella quindicesima forma di realizzazione specifica.

In alcune forme di realizzazione, V è un amminoacido o un peptide avente da 2 a 8 amminoacidi.

In alcune forme di realizzazione, V è valina-citrullina, gly-gly-gly o ala-leu-ala-leu.

- 15 In alcune forme di realizzazione,

W' è -O-, -N(R<sup>e</sup>)- o -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-;

R<sup>e</sup> è H, un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio oppure -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>;

R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

V è assente, -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-;

- 20 R<sup>y</sup> è assente o è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; e

$J$  è -S-, -SS- o -C(=O)-, e i gruppi rimanenti sono come definiti nella sedicesima forma di realizzazione specifica.

In alcune forme di realizzazione,

W' è -O-, -N(R<sup>e</sup>)- o -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-;

R<sup>e</sup> è H, Me o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-Me;

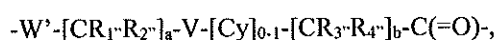
- 25  $n$  è un numero intero compreso tra 2 e 6;

R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato recante da 1 a 6 atomi di carbonio;

V e R<sup>y</sup> sono assenti; e

J è -C(=O)-. I gruppi rimanenti sono come definiti nella sedicesima forma di realizzazione specifica.

5 In una diciassettesima forma di realizzazione specifica, L' della sedicesima forma di realizzazione specifica è rappresentato dalla seguente formula:



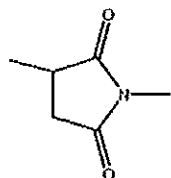
in cui:

R<sub>1</sub><sup>o</sup>, R<sub>2</sub><sup>o</sup>, e R<sub>3</sub> sono ciascuno indipendentemente -H o un alchile lineare o ramificato recante da 1 a 4 atomi di carbonio, preferibilmente -Me;

10 R<sub>4</sub><sup>o</sup> è -H, un alchile lineare o ramificato recante da 1 a 4 atomi di carbonio (preferibilmente -Me), -SO<sub>3</sub>H o -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, in cui M<sup>+</sup> è un catione farmaceuticamente accettabile;

a è un numero intero compreso tra 0 e 5 (*ad es.* da 0 a 2, 3, 4 o 5) e b è un numero intero compreso tra 0 e 6 (*ad es.* da 0 a 3, 4, 5 o 6); e,

Cy è un anello eterociclico a 5 elementi opzionalmente sostituito recante un eteroatomo N, preferibilmente, Cy è



15

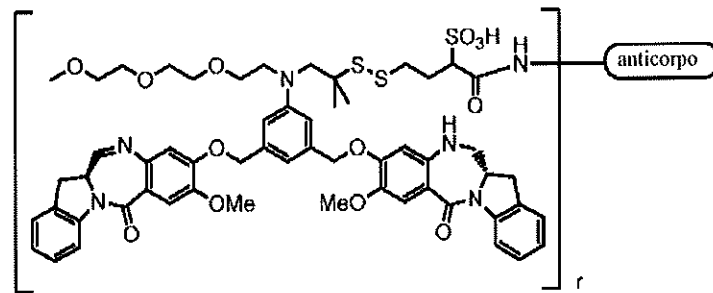
In alcune forme di realizzazione, come la sedicesima e/o la diciassettesima forma di realizzazione specifica, W' è -N(R<sup>e</sup>)-.

In alcune forme di realizzazione, come la sedicesima e/o la diciassettesima forma di realizzazione specifica, R<sup>e</sup> è -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>2-6</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

20

In alcune forme di realizzazione, come la sedicesima e/o la diciassettesima forma di realizzazione specifica, V è -S- or -SS-.

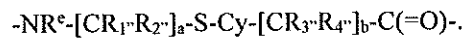




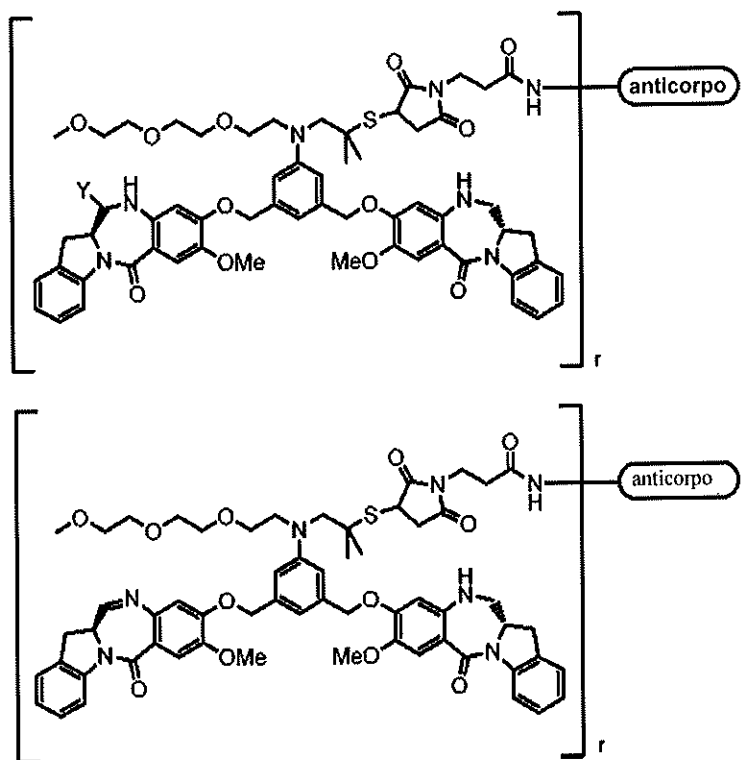
in cui  $r$  è un numero intero da 1 a 10,  $Y$  è  $-H$  o  $-SO_3M$  (ad es.  $Y$  è  $-SO_3M$ ), e  $M$  è  $-H$  o un suo catione farmaceuticamente accettabile.

5 In certe forme di realizzazione, come dalla sedicesima alla diciottesima forma di realizzazione specifica, l'anticorpo è huMy9-6.

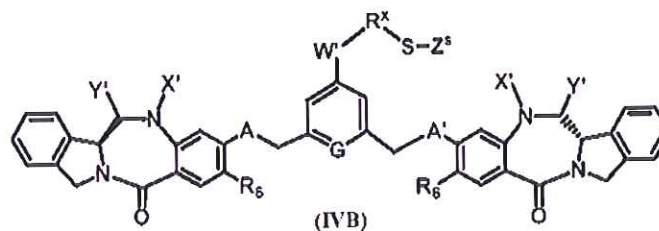
In una diciannovesima forma di realizzazione specifica,  $L'$  della sedicesima o diciassettesima forma di realizzazione specifica è rappresentato dalla seguente formula:



10 In certe forme di realizzazione, come nella sedicesima, nella diciassettesima e nella diciannovesima forma di realizzazione specifica, il coniugato è:







in cui:

W' è assente o scelto tra -O-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -S-, -CH<sub>2</sub>-S- o -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-;

5 R<sup>x</sup> è assente o scelto tra un alchile lineare, ramificato, o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

R<sup>e</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o - (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante un gruppo amminico secondario (*ad es.* -NHR<sup>101</sup>) o amminico terziario (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>) o un eterociclo con 5 o 6 elementi contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui R<sup>101</sup> e R sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile o

alchilile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

Z<sup>s</sup> è collegato al CBA, ed è un legame o -SR<sup>m</sup>-;

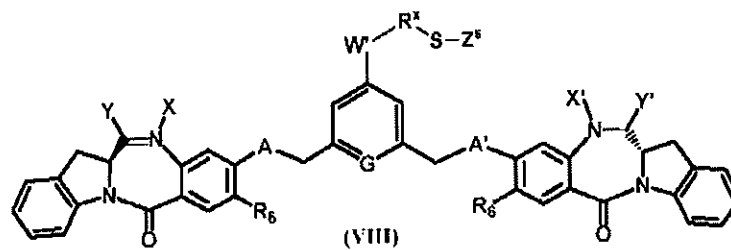
R<sup>m</sup> è R<sup>d</sup> o un alchile lineare o ramificato sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio recante un estere reattivo, scelto tra N-idrossisuccinimide esteri, N-idrossifalimide esteri, N-idrossisolfo-succinimide esteri, para-nitrofenilesteri, dinitrofenilesteri e pentafluorofenilesteri;

5

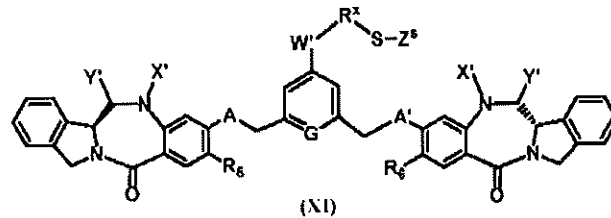
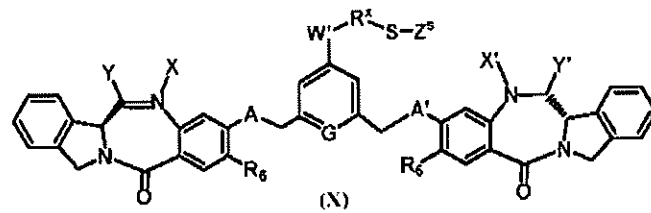
R<sup>d</sup> è scelto tra fenile, nitrofenile, dinitrofenile, carbossinitrofenile, piridile o nitropiridile; e,

n è un numero intero compreso tra 1 e 24; e il resto delle variabili è come descritto in precedenza nell'ottava o nella quindicesima forma di realizzazione specifica.

In una ventunesima forma di realizzazione specifica, il composto è rappresentato dalla seguente formula:



10



in cui:

W' è assente o scelto tra -O-, -N(R<sup>c</sup>)-, -N(R<sup>c</sup>)-C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>c</sup>)-, -S-, -CH<sub>2</sub>-S- o -CH<sub>2</sub>NR<sup>c</sup>-;

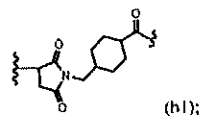
R<sup>x</sup> è assente o scelto tra un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

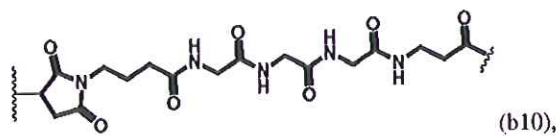
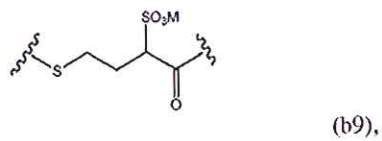
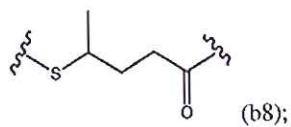
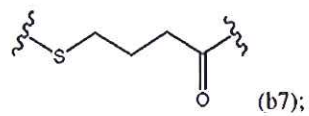
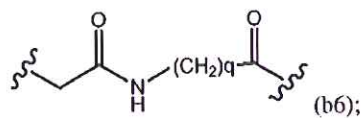
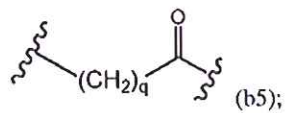
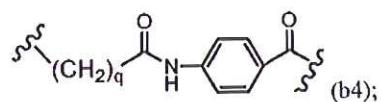
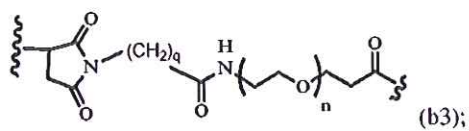
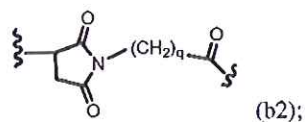
- 5 R<sup>c</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o - (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante un gruppo amminico secondario (ad es. -NHR<sup>101</sup>) o amminico terziario (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>) o un eterociclo con 5 o 6 elementi contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui R<sup>101</sup> e R<sup>102</sup> sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

- 10 n è un numero intero compreso tra 2 e 6;

Z<sup>s</sup> è collegato al CBA, ed è selezionato da:

un legame;



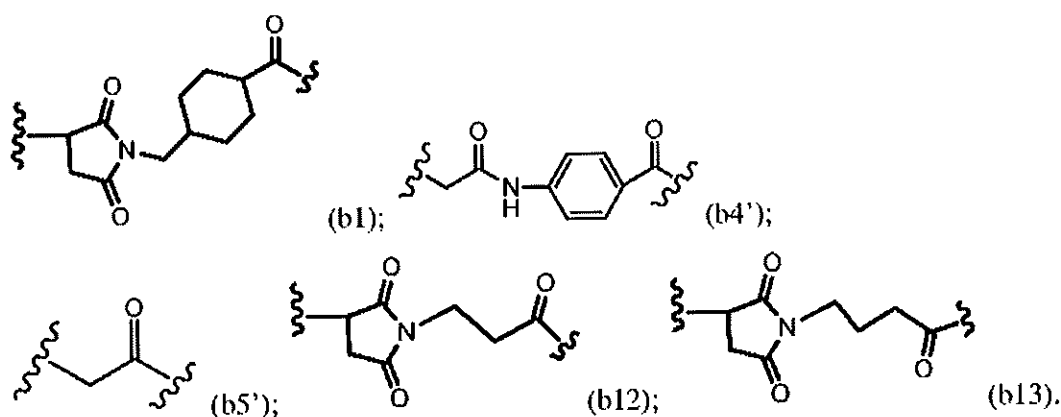


in cui:

q è un numero intero compreso tra 1 e 5; e

M è -H o un catione, come Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

In alcune forme di realizzazione, Z<sup>s</sup> è rappresentato da qualsiasi delle seguenti formule:



5

In alcune forme di realizzazione, W' è -N(R<sup>c</sup>)-.

In alcune forme di realizzazione, R<sup>c</sup> è -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

In alcune forme di realizzazione, R<sup>k</sup> è -H o -Me, n è 4 e q è 2.

10

In alcune forme di realizzazione, R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

In alcune forme di realizzazione, R<sup>x</sup> può essere -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-, in cui R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono ciascuno indipendentemente scelti tra H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; e p è 0, 1, 2 o 3.

In alcune forme di realizzazione, R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono uguali o diversi e sono scelti tra -H e -Me; e p è 1.

15

In una ventiduesima forma di realizzazione specifica, i composti di formula (VIII), (X) e (XI) descritti nella ventunesima forma di realizzazione specifica, le variabili sono come descritto di seguito:

la doppia linea = tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X è



assente e Y è -H e quando è un singolo legame, X è -H; Y è -H, -OH o -SO<sub>3</sub>M (*ad es.* Y è -OH o -SO<sub>3</sub>M);

M è -H o un catione farmaceuticamente accettabile (*ad es.* Na<sup>+</sup>);

X' e Y' sono entrambi -H;

A e A' sono entrambi -O-;

5 R<sub>6</sub> è -OMe; e

R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

In una ventitreesima forma di realizzazione specifica, per i composti di formula (IB), (IIIB) e (IVB) descritti nella ventesima forma di realizzazione specifica, le variabili sono come descritto di seguito:

la doppia linea = tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X sia

10 assente e Y sia -H e quando è un singolo legame, X sia -H; Y è -H, -OH o -SO<sub>3</sub>M (*ad es.* Y è -OH o -SO<sub>3</sub>M);

M è -H o Na<sup>+</sup>;

X' e Y' sono entrambi -H;

A e A' sono entrambi -O-;

R<sub>6</sub> è -OMe;

15 R<sub>X</sub> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

Preferibilmente, R<sup>x</sup> è -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(CR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>)-, in cui R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; p è 0, 1, 2 o 3. Più preferibilmente, R<sup>f</sup> e R<sup>g</sup> sono uguali o diversi e sono scelti tra -H e -Me; e p è 1.

20 In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche per il coniugato dell'invenzione illustrate sopra, come le forme di realizzazione specifiche dalla quattordicesima alla ventitreesima, la doppia linea = tra N e C può rappresentare un legame doppio.

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche del coniugato dell'invenzione di cui sopra, come dalla quattordicesima alla ventitreesima forma di realizzazione specifica, la linea doppia = tra N e C può rappresentare un legame singolo, X è -H, il gruppo di collegamento o un gruppo ammino-protettivo (*ad esempio* X è -H); e Y è -H o

selezionato da -OR, -OCOR', -SR, -NR'R'', un eterociclo contenente azoto di 5 o 6 componenti opzionalmente sostituito, -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>2</sub>M e un solfato -OSO<sub>3</sub>M. In alcune forme di realizzazione, Y non è -H.

In alcune forme di realizzazione, Y è scelto tra -H, -SO<sub>3</sub>M, -OH, -OMe, -OEt o -NHOH (*ad es.* Y è -SO<sub>3</sub>M, -OH, -OMe, -OEt o -NHOH).

5 In alcune forme di realizzazione, Y è -H, -SO<sub>3</sub>M o -OH (*ad es.* Y è -SO<sub>3</sub>M o -OH).

In alcune forme di realizzazione, M è -H, Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche per il coniugato dell'invenzione illustrate sopra, come le forme di realizzazione specifiche dalla quattordicesima alla ventitreesima, W, quando presente, è C=O.

10 In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche del coniugato dell'invenzione di cui sopra, come dalla quattordicesima alla ventitreesima forma di realizzazione specifica, Z e Z', quando presenti, sono -CH<sub>2</sub>-.

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche per il coniugato dell'invenzione illustrate sopra, come le forme di realizzazione specifiche dalla quattordicesima alla ventitreesima, X' è scelto dal gruppo costituito da -H, -OH, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, fenile, il gruppo legante e un gruppo protettivo dell'ammina.

15 In alcune forme di realizzazione, X' è -H, -OH, -Me o il gruppo legante.

In alcune forme di realizzazione, X' è -H.

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche per il coniugato dell'invenzione illustrate sopra, come le forme di realizzazione specifiche dalla quattordicesima alla ventitreesima, Y' è scelto dal gruppo costituito da -H, un gruppo osso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio.

20

In alcune forme di realizzazione, Y' è -H o osso.

In alcune forme di realizzazione, Y' è -H.

In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche per il coniugato dell'invenzione illustrate sopra, come le forme di realizzazione specifiche dalla quattordicesima alla ventitreesima, A e A' sono uguali o diversi e sono scelti tra O-, -S-

25 , -N(R<sub>5</sub>)- e osso (C=O).

In alcune forme di realizzazione, A e A' sono uguali o diversi e sono scelti tra -O- e -S-.

In alcune forme di realizzazione, A e A' sono -O-;

5 In qualsiasi delle forme di realizzazione specifiche per il coniugato dell'invenzione illustrate sopra, come le forme di realizzazione specifiche dalla quattordicesima alla ventitreesima, D e D', quando presenti, sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente scelti tra un'unità polietilenglicolica  $(-OCH_2CH_2)_n$ , in cui n è un numero intero compreso tra 1 e 24, un amminoacido, un peptide recante da 2 a 6 amminoacidi o un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, in cui l'alchile, alchenile o alchinile sono opzionalmente sostituiti con uno o più sostituenti indipendentemente scelti dal gruppo costituito da alogeno, -OR, -NR'COR'', -SR e -COR'.

In alcune forme di realizzazione, D e D' sono un alchile lineare o ramificato recante da 1 a 4 atomi di carbonio.

10 In una ventiquattresima forma di realizzazione specifica, il coniugato della presente invenzione come descritto nella quattordicesima, quindicesima o ventunesima forma di realizzazione specifica è rappresentato dal seguente:

la doppia linea = tra N e C rappresenta un doppio legame;

Y è -H;

W è C=O;

15 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>4</sub> e R<sub>4</sub>' sono -H;

uno di R<sub>3</sub> o R<sub>3</sub>' è opzionalmente un gruppo legante e l'altro è -H;

R<sub>6</sub> è -OMe;

Z e Z' sono -CH<sub>2</sub>;

X' è -H;

20 Y' è -H; e

A e A' sono -O-.

25 In certe forme di realizzazione, il coniugato di una qualsiasi delle forme di realizzazione descritte, come dalla quattordicesima alla ventiquattresima forma di realizzazione specifica, può comprendere 1-10 composti citotossici, 2- 9 composti citotossici, 3- 8 composti citotossici, 4- 7 composti citotossici o 5-6 prodotti citotossici, ciascun composto citotossico comprendente il gruppo di legame legante il composto citotossico al CBA, e ciascun composto citotossico sul

coniugato è il medesimo.

5 In qualsiasi delle forme di realizzazione del coniugati, come dalla quattordicesima alla ventiquattresima forma di realizzazione specifica, l'agente legante cellulare può legarsi a cellule bersaglio selezionate da cellule tumorali, cellule infettate da virus, cellule infettate da microrganismi, cellule infettate da parassiti, cellule autoimmuni, cellule attivate, cellule mieloidi, cellule T attivate, cellule B o melanociti; cellule esprimenti gli antigeni CD4, CD6, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, EpCAM, CanAg, CALLA o Her-2 ; antigeni Her-3; o cellule che esprimono il recettore del fattore di crescita insulinico, il recettore del fattore di crescita epidermico e il recettore dei folati.

10 In qualsiasi delle forme di realizzazione del coniugato, come dalla quattordicesima alla ventiquattresima forma di realizzazione specifica, l'agente legante cellulare può essere un anticorpo, un anticorpo a catena singola, un frammento di anticorpo che si lega specificatamente alla cellula bersaglio, un anticorpo monoclonale, un anticorpo monoclonale a catena singola o un frammento di un anticorpo monoclonale che si lega in modo specifico a una cellula bersaglio, un anticorpo chimerico, un frammento di anticorpo chimerico che si lega specificatamente alla cellula bersaglio, un frammento di anticorpo a dominio che si lega specificatamente alla cellula bersaglio, una linfocina, un ormone, una  
15 vitamina, un fattore di crescita, un fattore di stimolazione delle colonie, o una molecola di trasporto dei nutrienti.

L'anticorpo può essere un anticorpo sottoposto a resurfacing, un anticorpo a catena singola sottoposto a resurfacing o un frammento di anticorpo sottoposto a resurfacing.

L'anticorpo può essere un anticorpo monoclonale, un anticorpo monoclonale a catena singola, o un suo frammento di anticorpo monoclonale.

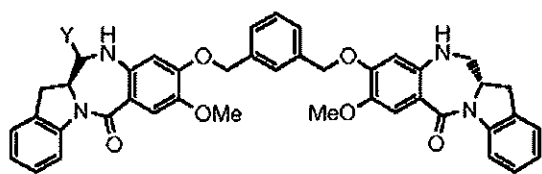
20 L'anticorpo può essere un anticorpo umanizzato, un anticorpo umanizzato a catena singola, o un frammento di anticorpo umanizzato.

L'invenzione fornisce ulteriormente una composizione farmaceutica comprendente qualsiasi dei coniugati descritti nel presente contesto e un supporto farmaceuticamente accettabile.

25 L'invenzione fornisce inoltre un composto farmaco-linker comprendente uno qualsiasi dei presenti composti legati in modo covalente a un linker bifunzionale.

L'invenzione fornisce inoltre un coniugato comprendente qualsiasi dei presenti composti o dei presenti composti farmaco-linker, legati a un agente legante cellulare.

L'invenzione comprende anche un composto come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10 , un coniugato come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 11-22 o un composto rappresentato dalla seguente formula:

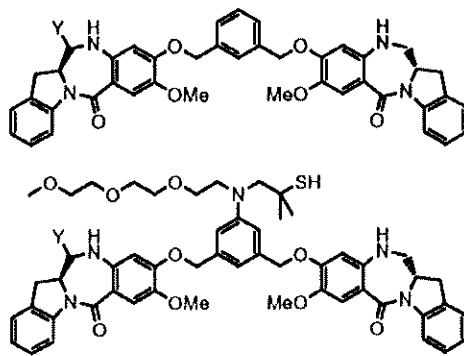


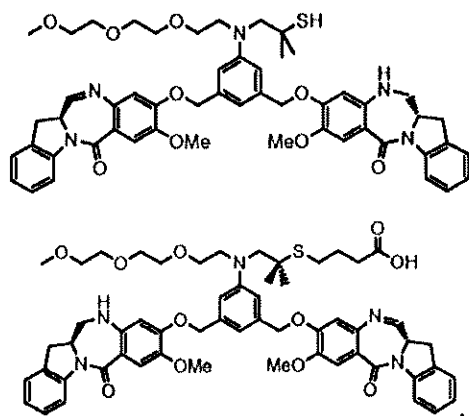
5

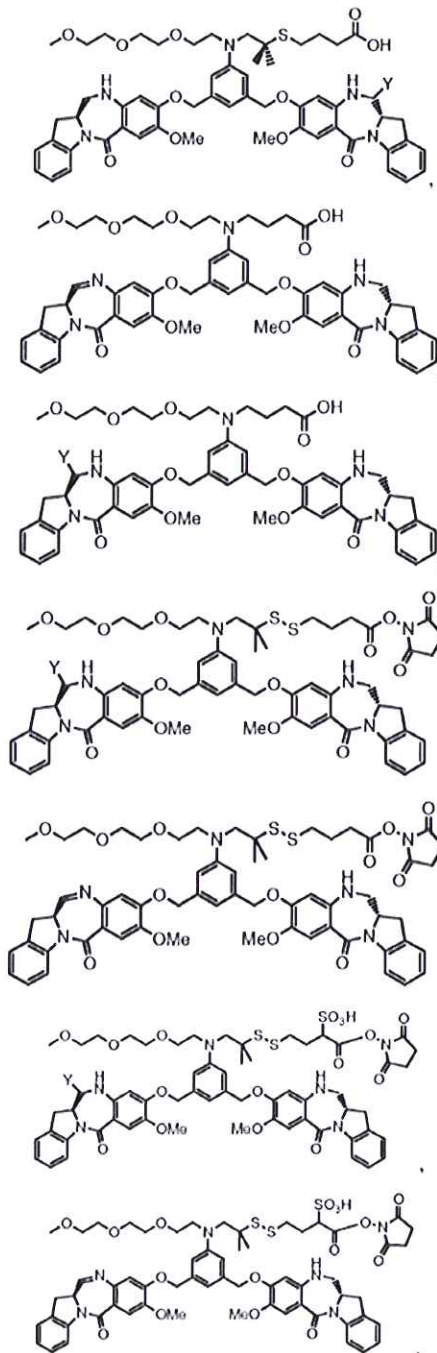
o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui Y è -H o -SO<sub>3</sub>M (*ad es.* Y è -SO<sub>3</sub>M), e M è -H o un suo catione farmaceuticamente accettabile, per l'uso in un metodo per inibire la crescita cellulare anomala o per trattare un disturbo proliferativo, una malattia autoimmune, un disturbo osseo-distruttivo, malattie infettive, malattie virali, malattie fibrotiche, disturbi neurodegenerativi, pancreatite o malattie renali in un mammifero comprendente la somministrazione a detto mammifero di una quantità terapeuticamente efficace di qualsiasi dei composti (con o senza un gruppo legante) o coniugati dell'invenzione e, opzionalmente, un secondo agente chemioterapico.

10

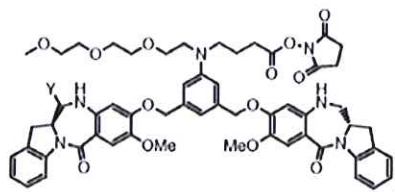
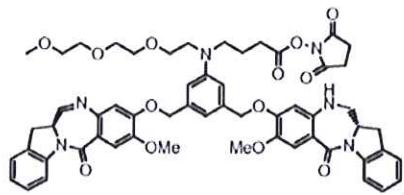
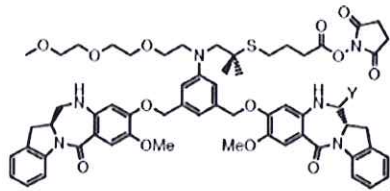
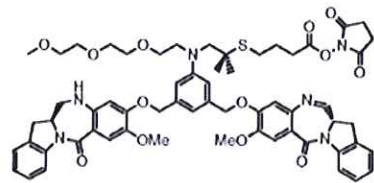
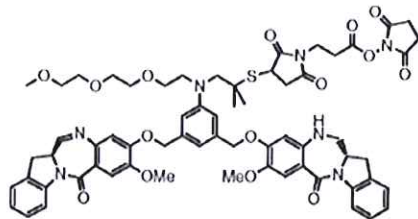
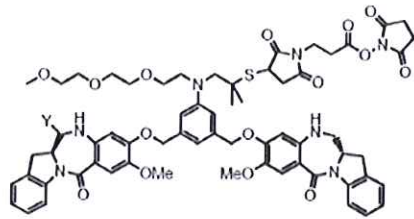
In alcune forme di realizzazione, il composto o coniugato è:



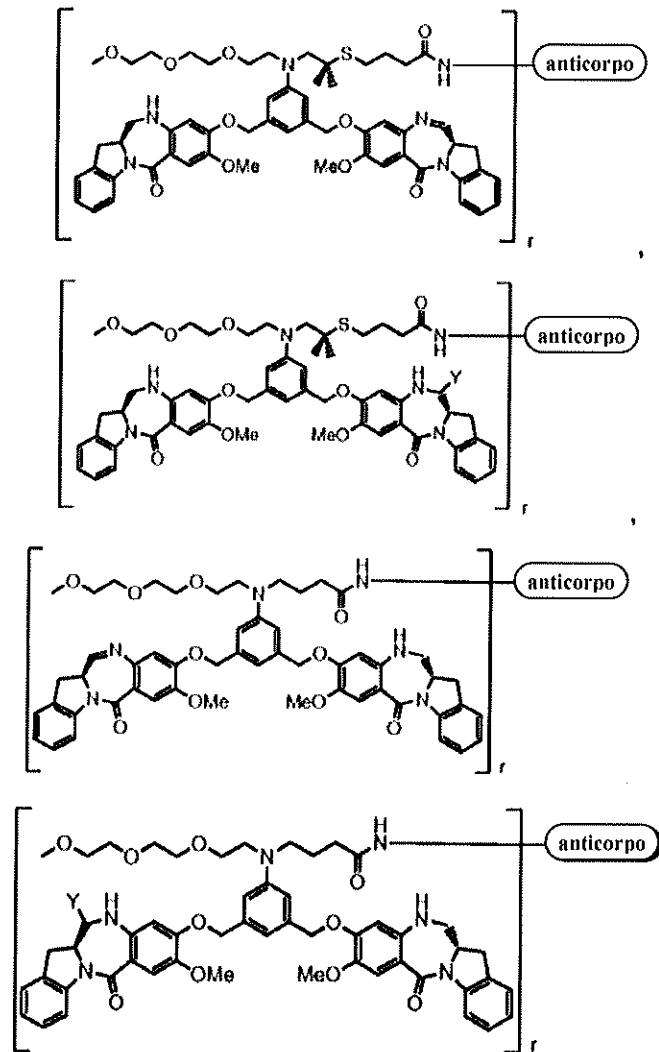




4









in cui r è un intero da 1 a 10, Y è -H o -SO<sub>3</sub>M (ad esempio Y è -SO<sub>3</sub>M), ed M è -H o un catione farmaceuticamente accettabile.

In certe forme di realizzazione, il secondo agente chemioterapico è per una somministrazione al mammifero, in sequenza o in maniera consecutiva.

5 In alcune forme di realizzazione, il metodo è utile per trattare affezioni quali cancro, artrite reumatoide, sclerosi multipla, malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), rigetto di trapianto, lupus, miosite, infezioni e deficienza immunitaria.

In certe forme di realizzazione, il metodo o il coniugato serve a trattare un cancro.

10 In alcune forme di realizzazione, il cancro è selezionato da cancro al seno, cancro del colon, cancro al cervello, cancro alla prostata, cancro del rene, cancro al pancreas, cancro ovarico, cancro della testa e del collo, melanoma, cancro coloretale, cancro gastrico, cancro squamoso, cancro del polmone a piccole cellule, cancro del polmone non a piccole cellule, cancro ai testicoli, carcinoma a cellule di Merkel, glioblastoma, neuroblastoma, cancri degli organi linfatici e malignità ematologica tra cui leucemia (leucemia linfoblastica acuta (ALL), leucemia mieloide acuta (AML), leucemia linfatica cronica (LLC) , leucemia mieloide cronica (LMC), leucemia acuta monocitica (AMOL), leucemia a cellule  
15 capellute (HCL), leucemia prolinfocitica a cellule T (T-PLL), leucemia granulosa a grandi cellule T, leucemia a cellule T adulte), linfoma (piccolo linfoma linfocitico (SLL), linfomi di Hodgkin (linfoma di Hodgkin a sclerosi nodulare, a cellularità mista, ricco in linfociti, con o senza linfocitopenia e a predominanza linfocitaria nodulare), linfomi non-Hodgkin (tutti i sottotipi), leucemia linfocitica cronica/piccolo linfoma linfocitico, leucemia prolinfocitica a cellule B, linfoma linfoplasmacitico (come macroglobulinemia di Waldenstrom), linfoma della zona marginale splenica, neoplasie  
20 delle plasmacellule (mieloma delle plasmacellule, plasmocitoma, malattie di deposito di immunoglobuline monoclonali, malattie delle catene pesanti), linfoma a cellule B della zona marginale extranodale (linfoma MALT), linfoma a cellule B della zona marginale nodale (NMZL), linfoma follicolare, linfoma delle cellule del mantello, linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma a grandi cellule B del mediastino (timo), linfoma intravascolare a grandi cellule B, linfoma a effusione primaria, linfoma/leucemia di Burkitt, leucemia prolinfocitica a cellule T, leucemia linfocitica granulosa a grandi cellule  
25 T, leucemia aggressiva a cellule NK, leucemia/ linfomi a cellule T adulte, linfoma a cellule NK/T extranodali (tipo nasale),

linfoma a cellule T tipo enteropatia, linfoma a cellule T epatosplenico, linfoma a cellule NK blastiche, micosi fungoide/sindrome di Sezary, disordini linfoproliferativi a cellule T primarie CD30-positivo cutanee, linfoma anaplastico a grandi cellule cutanee primarie, papulosi linfomatoide, linfoma a cellule T angioimmunoblastiche, linfoma periferico a cellule T (non specificate), linfoma anaplastico a grandi cellule), mieloma multiplo (mieloma delle plasmacellule o malattia di Kahler).

**PRODUZIONE DI CONIUGATI AGENTE LEGANTE CELLULARE-FARMACO**

Allo scopo di collegare i composti citotossici o loro derivato della presente invenzione all'agente legante cellulare, il composto citotossico può comprendere una porzione legante con un gruppo reattivo legato ad esso. In una forma di realizzazione, un reagente reticolante bifunzionale può essere prima fatto reagire con il composto citotossico per fornire il composto che porta una porzione legante con un gruppo reattivo legato ad esso (ovvero un composto farmaco-linker), che può quindi reagire con un agente legante cellulare. In alternativa, una estremità dell'agente reticolante bifunzionale può essere fatta reagire con il primo agente legante cellulare per fornire un agente legante cellulare recante una frazione linker con un gruppo reattivo legato ad esso, che può quindi reagire con un composto citotossico. La frazione legante può contenere un legame chimico che consente il rilascio della frazione citotossica in corrispondenza di un sito specifico. Legami chimici adatti sono ben noti nella tecnica e comprendono legami disolfuro, legami tioetere, legami acido labili, legami fotolabili, legami peptidasi labili e legami esterasi labili (si vedano ad esempio i brevetti U.S. 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 e 7.414.073). Sono preferiti i legami disolfuro, tioetere e i legami peptidasi-labili. Altri linker che possono essere usati nella presente invenzione includono linker non scindibili, come quelli descritti in dettaglio nella pubblicazione U.S. numero 2005/0169933 o linker carichi o linker idrofili e sono descritti in U.S. 2009/0274713, U.S. 2010/01293140 e WO 2009/134976.

I composti di formula (I), (II) & (IV), (IA), (IIA) & (IVA) e (IB), (IIB) & (IVB) possono essere collegati attraverso R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>', R<sub>4</sub>', L', L'', L''' o X (quando presenti). Di questi, i gruppi reticolabili preferiti sono R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>', R<sub>4</sub>', L', L'', L''', e i gruppi reticolabili preferiti in assoluto sono R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' ed L'. Esempi di gruppi di collegamento dei composti di formula I), (II) & (IV), (IA), (IIA) & (IVA) e (IB), (IIB) & (IVB) sono descritti sopra.

In una forma di realizzazione, una soluzione di un anticorpo in un tampone acquoso può essere incubata con un eccesso molare di un agente modificante anticorpi come N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) o con N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) per introdurre gruppi ditiopiridilici. L'anticorpo modificato viene poi fatto reagire con il composto citotossico contenente tiolo, come un composto 2a, allo scopo di produrre un coniugato dimerico anticorpo-indolinobenzodiazepina collegato via disolfuro. Il coniugato agente legante cellulare-farmaco può essere poi purificato usando qualsiasi metodo di purificazione noto nel ramo, come quelli descritti nel brevetto US n. 7.811.572 e nella pubblicazione US n. 2006/0182750. Ad esempio, il coniugato agente legante cellulare-farmaco può essere purificato mediante filtrazione a flusso tangenziale, cromatografia di adsorbimento, filtrazione di adsorbimento, precipitazione selettiva, filtrazione di non adsorbimento, o una loro combinazione. Preferibilmente, per la purificazione dei coniugati si usa una filtrazione a flusso tangenziale (TFF, anche nota come filtrazione a flusso trasversale, ultrafiltrazione e diafiltrazione) e/o resine di cromatografia di adsorbimento.

In alternativa, l'anticorpo può essere incubato con un eccesso molare di un agente modificante anticorpi, come 2-imminotiolano, L-omocisteinatiolettone (o derivati) o N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), allo scopo di introdurre gruppi solfidrilici. L'anticorpo modificato viene poi fatto reagire con l'opportuno agente citotossico contenente disolfuro, allo scopo di produrre un coniugato anticorpo-agente citotossico legato via disolfuro. Il coniugato anticorpo-agente citotossico può quindi essere purificato mediante i metodi descritti sopra. Il legame alla cellula può anche essere ingegnerizzato in modo da introdurre porzioni tiolo, come anticorpi ingegnerizzati con cisteina descritti nei brevetti US 7.772.485 e 7.855.275.

In un'altra forma di realizzazione, una soluzione di un anticorpo in un tampone acquoso può essere incubata con un eccesso molare di un agente modificante anticorpi, come N-succinimidil-4-(N-maleimmidometil)-cicloesan-1-carbossilato, per introdurre gruppi maleimmido, o con N-succinimidil-4-(iodoacetil)-amminobenzoato (SIAB) per introdurre gruppi iodoacetile. L'anticorpo modificato viene poi fatto reagire con l'agente citotossico contenente tiolo per produrre un coniugato anticorpo-citotossico collegato via tioetere. Il coniugato anticorpo-agente citotossico può quindi essere purificato mediante i metodi descritti sopra.

Il numero di molecole citotossiche legate per molecola di anticorpo può essere determinato misurando mediante

spettrofotometria il rapporto dell'assorbanza a 280 nm e a 330 nm. Una media di 1-10 molecole di composti citotossici/anticorpo possono essere legata mediante il metodo qui descritto. Il numero medio preferito di composti citotossici collegati per molecola di anticorpo è 2-5, è quello maggiormente preferito è 2,5 - 4,0.

5 Agenti citotossici contenenti linker che terminano con un N-idrossi-succinimidil (NHS) estere, come composti 1g e 10, possono reagire con l'anticorpo per produrre coniugati a legame ammidico diretti, come huMy9-6-SPDB-1f o huMy9-6-BMPS-1f. Il coniugato anticorpo-agente citotossico può essere quindi purificato mediante filtrazione su gel attraverso uno qualsiasi dei metodi descritti sopra.

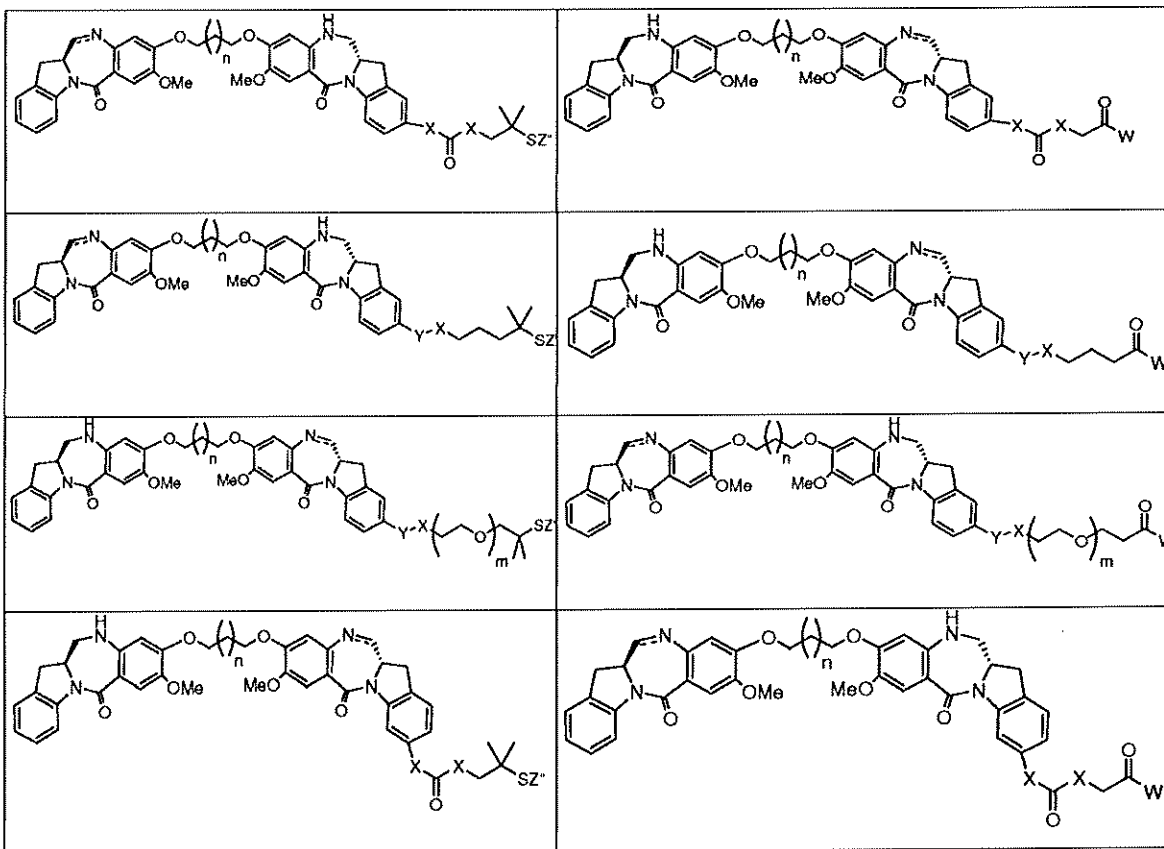
10 Processi rappresentativi per preparare coniugati agente legante cellulare-farmaco della presente invenzione sono mostrati nelle FIGG. 22 e 23. Un composto dimerico citotossico della presente invenzione può essere coniugato con un agente legante cellulare attraverso un metodo di coniugazione in un passaggio o in due passaggi. Nelle FIGG. 22a e 22b, sono descritti esempi rappresentativi, in cui un composto dimerico che possiede un linker, come un N-idrossisuccinimide estere, è posto direttamente in reazione con un agente legante cellulare, come un anticorpo, generando il coniugato desiderato. Nella FIG. 22c il dimero collegabile 1g è stato prima trattato con bisolfato di sodio per fornire un composto dimerico modificato 26, dopodiché è stato aggiunto l'anticorpo per formare il coniugato huMy9-6-  
15 SBDP-1f della presente invenzione.

Un esempio rappresentativo di un metodo di coniugazione bistadio è descritto nella FIG. 23, in cui un anticorpo viene dapprima modificato con un agente reticolante bifunzionale, producendo un anticorpo che possiede un numero desiderato di linker adatto per la reazione con un composto dimerico avente una porzione tiolo libera. In questo esempio, l'anticorpo huMy9-6 è stato in primis modificato con SPDB, fornendo un anticorpo con linker contenenti la porzione  
20 ditiopiridile. L'anticorpo modificato è stato poi esposto a un tiolo libero, come ad esempio 2a, generando il desiderato coniugato huMy9-6-SPDB-2a.

Processi per sintetizzare composti o coniugati farmaco-linker dell'invenzione sono anche descritti nella domanda provvisoria di brevetto US n. 61/443.092, depositata il 15 febbraio 2011, e nel modello di utilità statunitense che rivendica il beneficio della data di deposito del medesimo, e depositato nello stesso giorno della presente domanda, recante il titolo  
25 "METHODS OF PREPARATION OF CONJUGATES".

Le strutture dei composti e dei coniugati rappresentativi della presente invenzione sono mostrati nelle Tabelle 1-8. Questi composti e coniugati possono essere preparati secondo i metodi qui descritti.

Tabella 1. Strutture dei composti rappresentativi della presente invenzione.



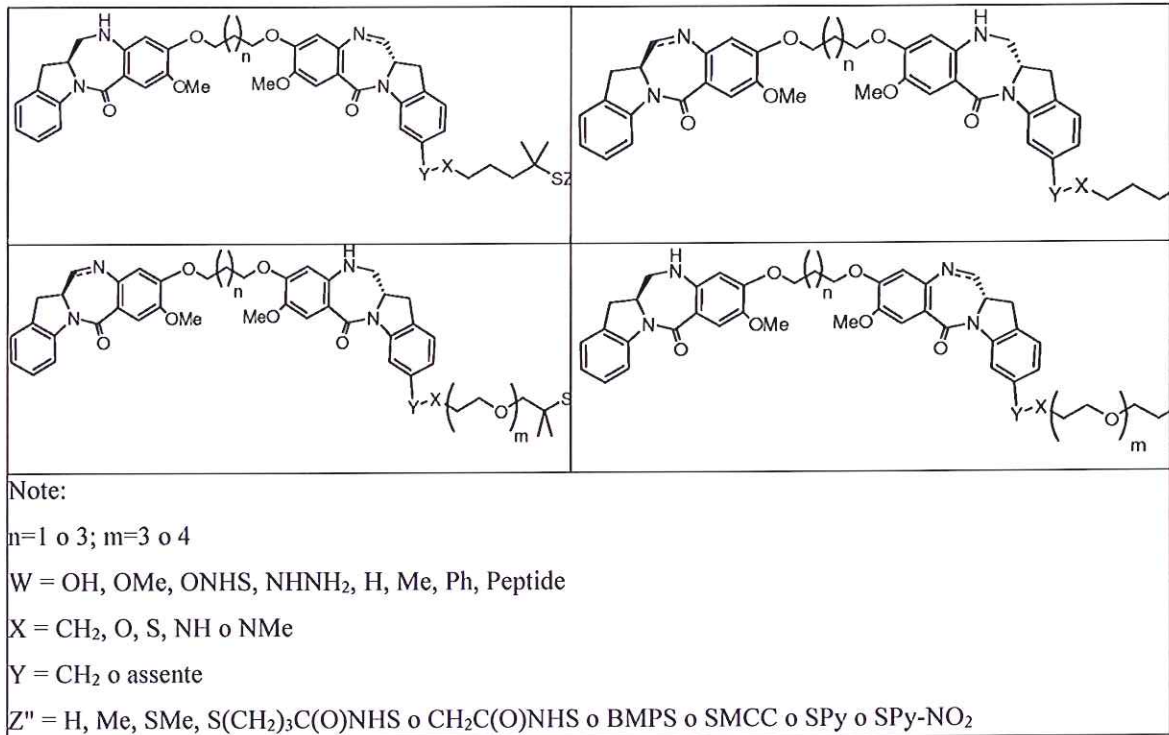
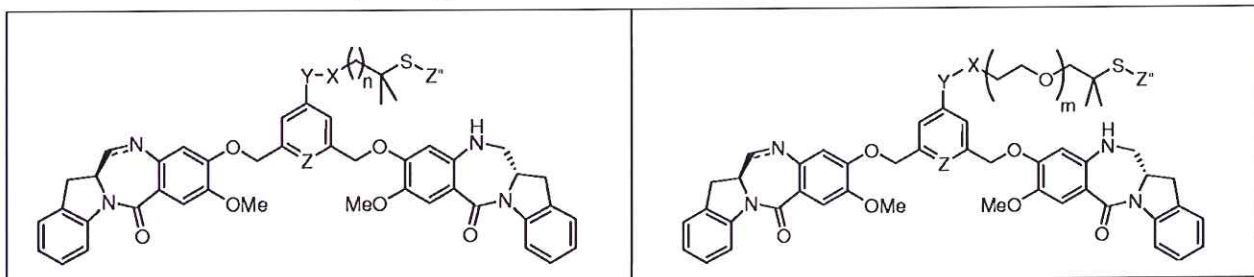
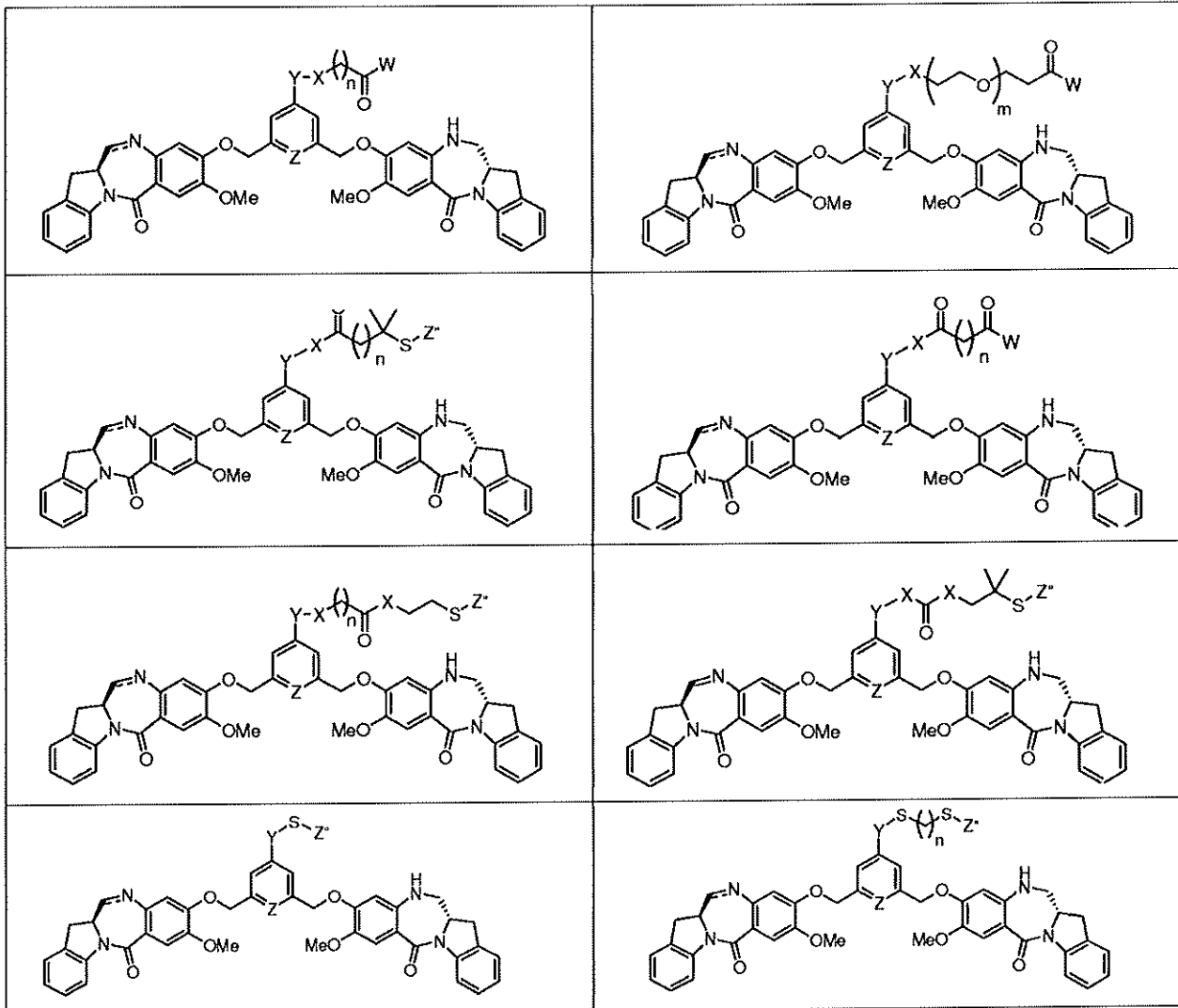


Tabella 2. Strutture dei composti rappresentativi della presente invenzione (continuazione).







Nota:

n = 1, 2 o 3

m = 3 o 4

W = OH, OMe, ONHS, NHNH<sub>2</sub>, H, Me, Ph, Peptide

X = CH<sub>2</sub>, O, S, NH, NMe

Y = assente o CH<sub>2</sub>

Z = CH o N

Z'' = H, Me, SMe, S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>C(O)NHS o CH<sub>2</sub>C(O)NHS o BMPS o SMCC o SPy o SPy-NO<sub>2</sub>

Tabella 3. Strutture dei composti rappresentativi della presente invenzione

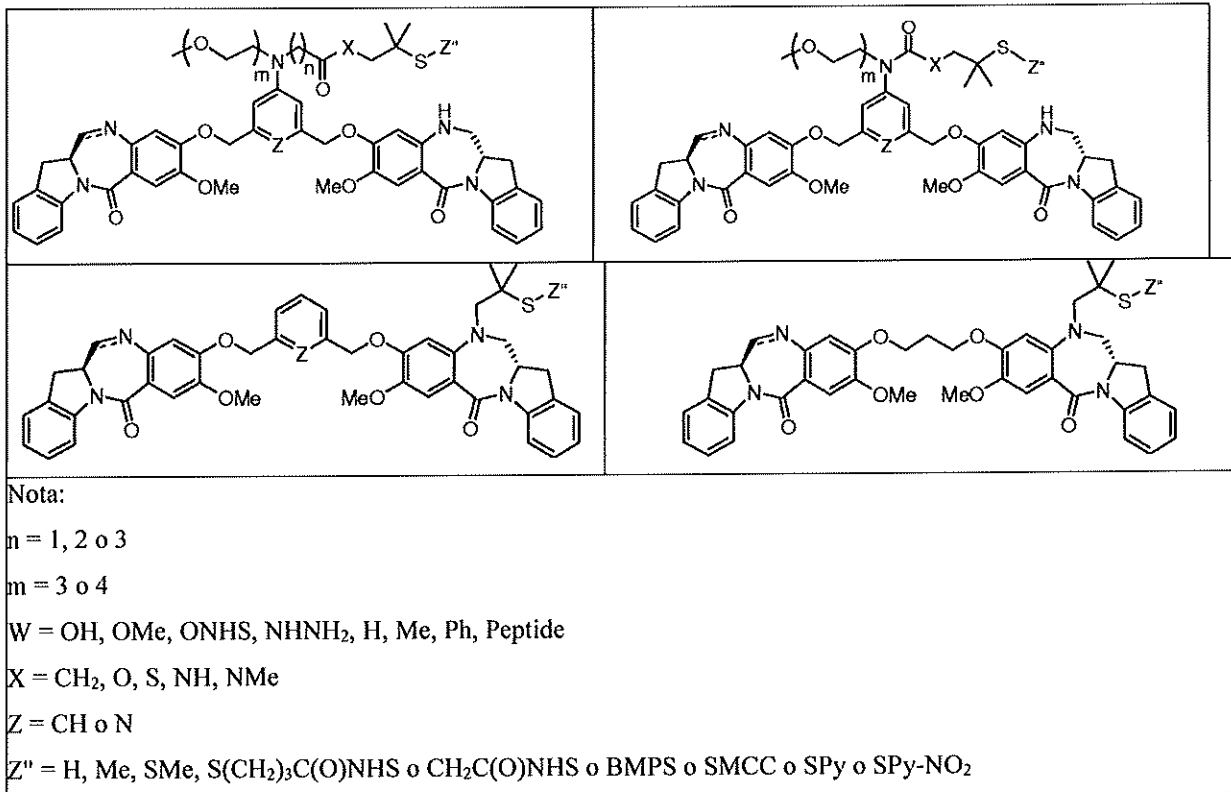
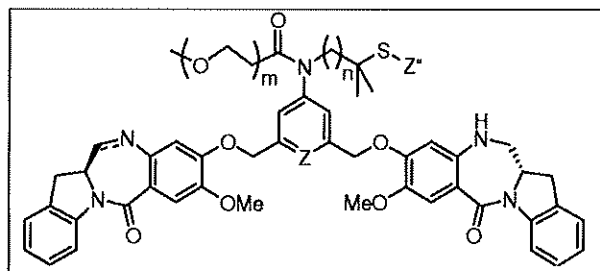
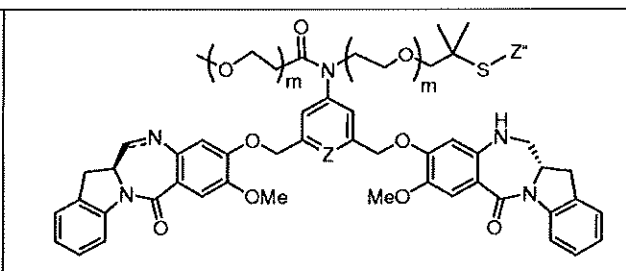
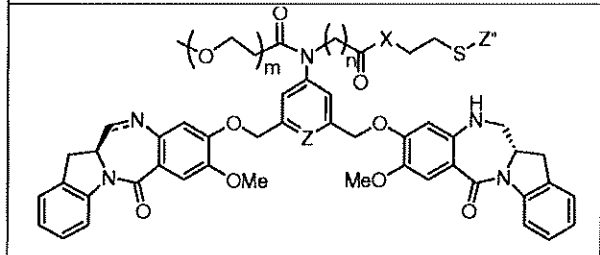
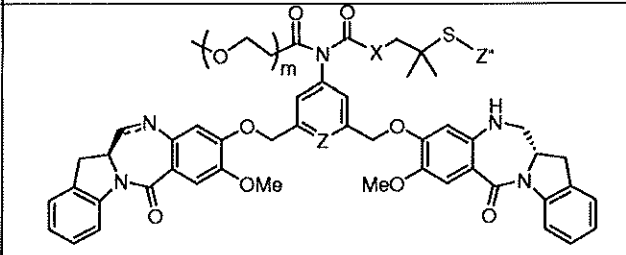
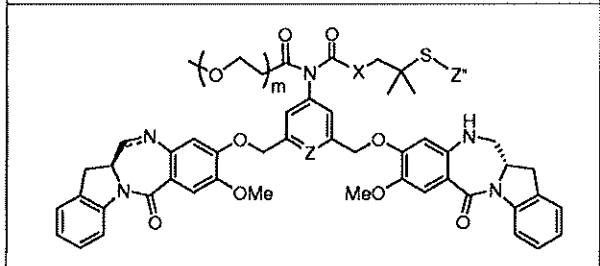
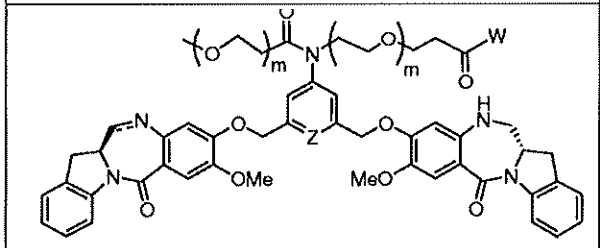
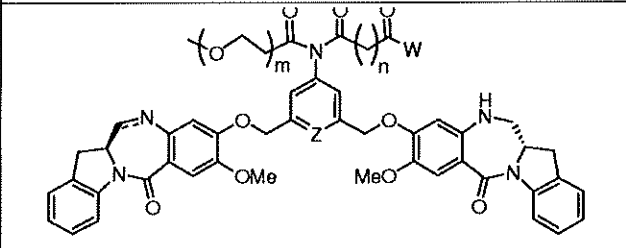
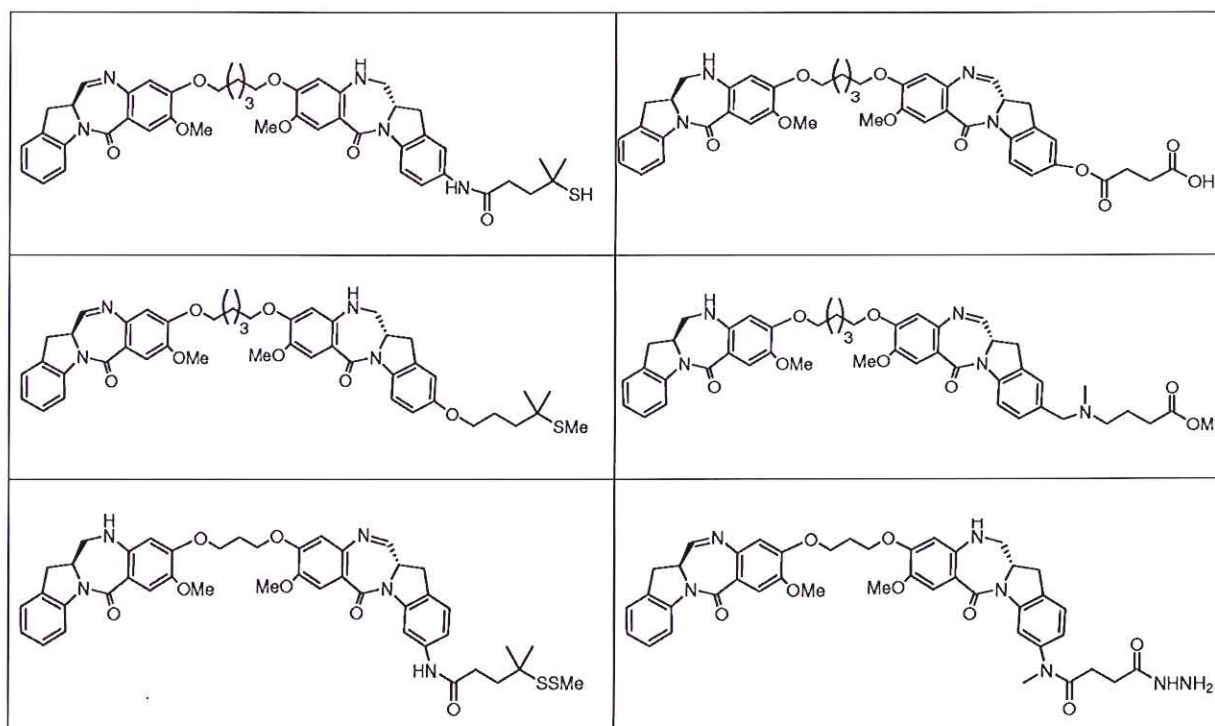



Tabella 4. Strutture dei composti rappresentativi della presente invenzione (continuazione).

Nota:  
 $n = 1, 2 \text{ o } 3$   
 $m = 3 \text{ o } 4$   
 $W = \text{OH, OMe, ONHS, NHNH}_2, \text{H, Me, Ph, Peptide}$   
 $X = \text{CH}_2, \text{O, S, NH, NMe}$   
 $Z = \text{CH o N}$   
 $Z'' = \text{H, Me, SMe, S(CH}_2)_3\text{C(O)NHS o CH}_2\text{C(O)NHS o BMPS o SMCC o SPy o SPy-NO}_2$

Tabella 5. Strutture dei composti rappresentativi della presente invenzione.



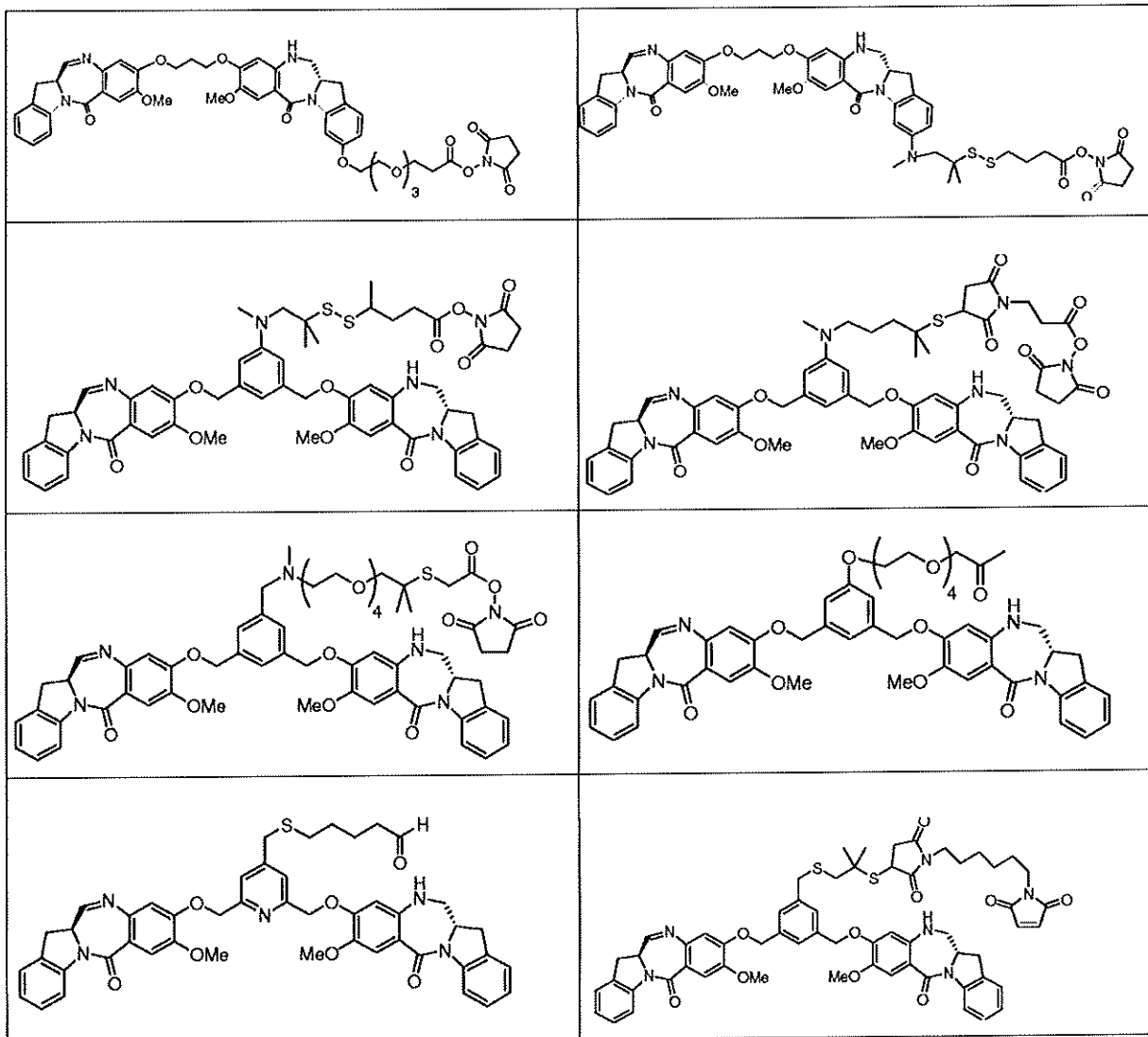
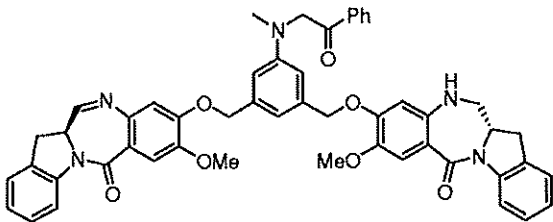
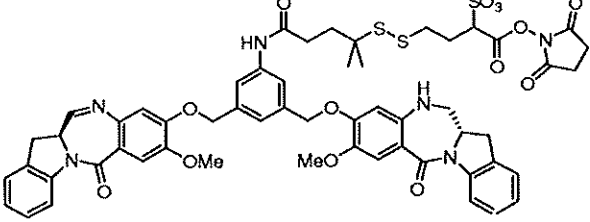
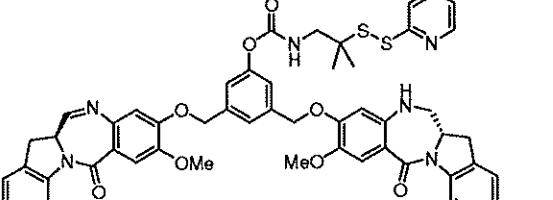
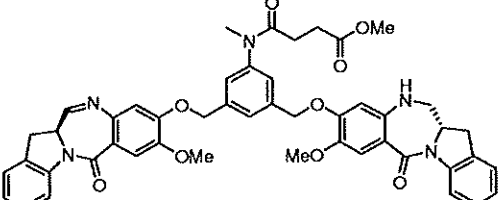
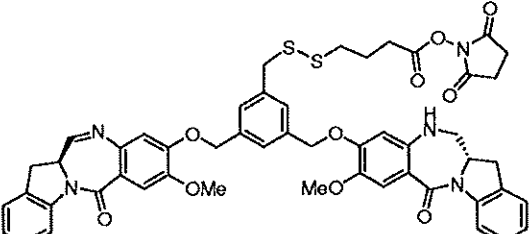
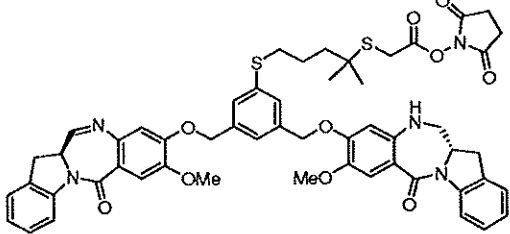
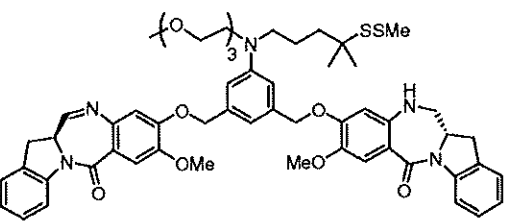
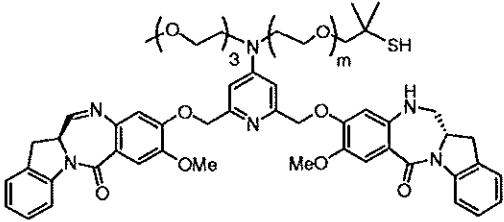


Tabella 6. Strutture dei composti rappresentativi della presente invenzione (continuazione).

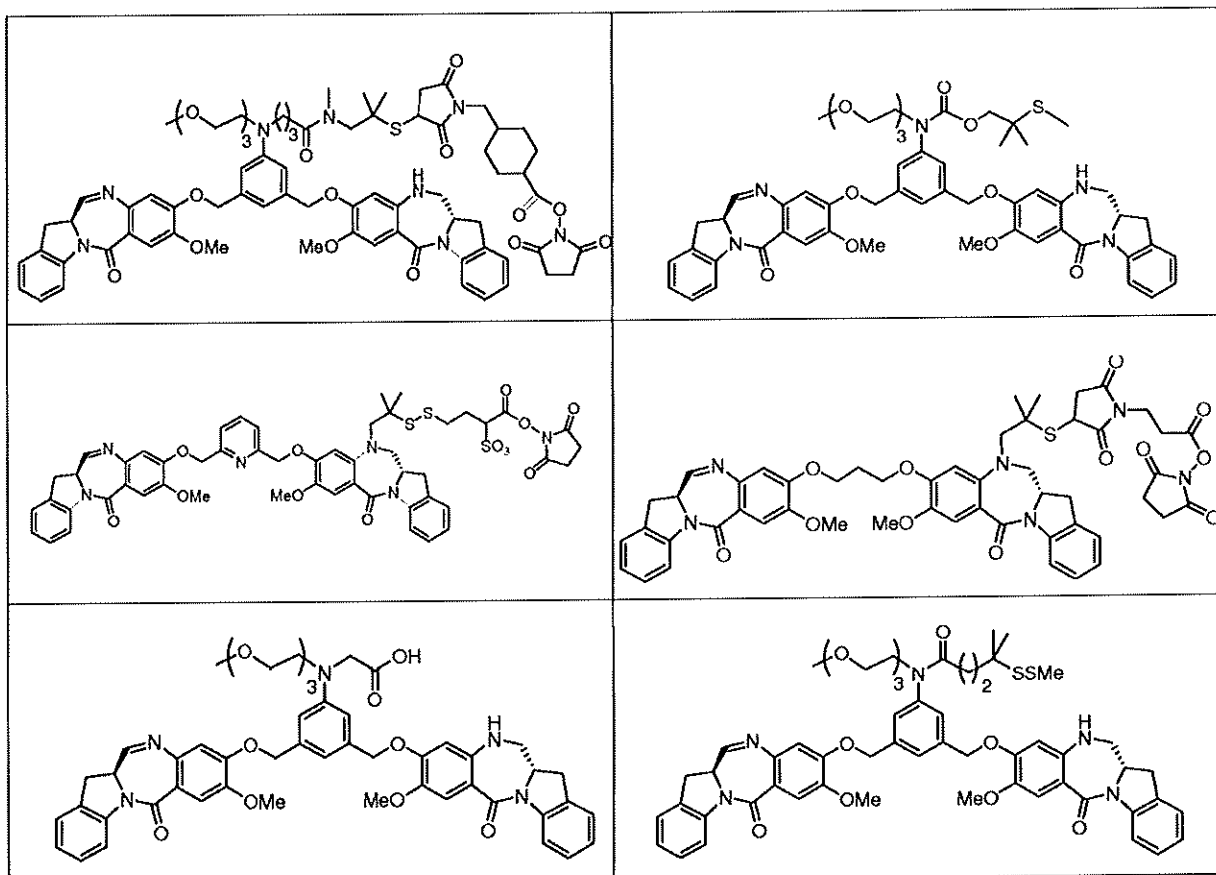


Tabella 7. Strutture dei composti rappresentativi della presente invenzione (continuazione).

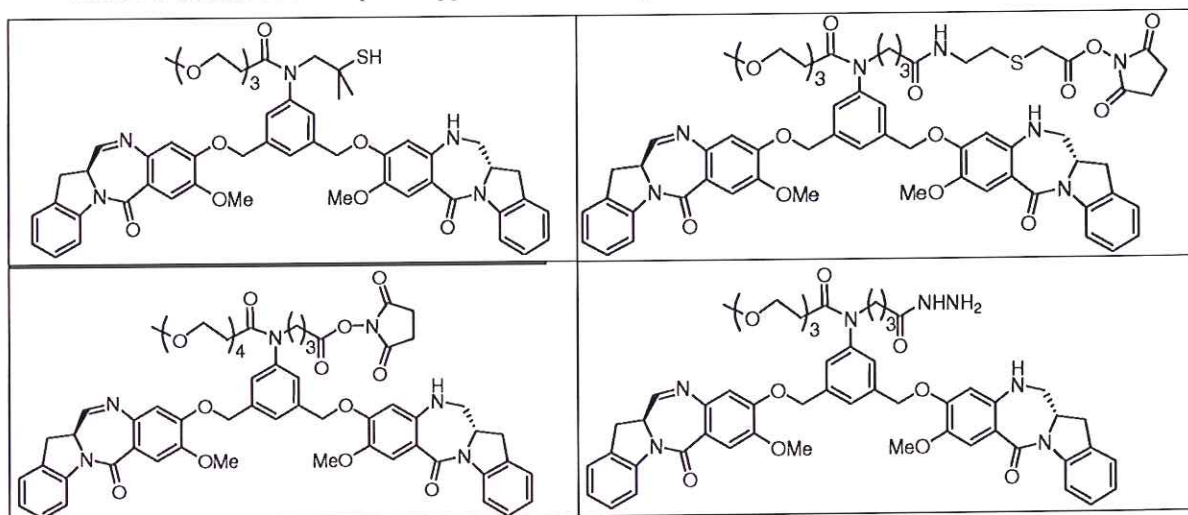
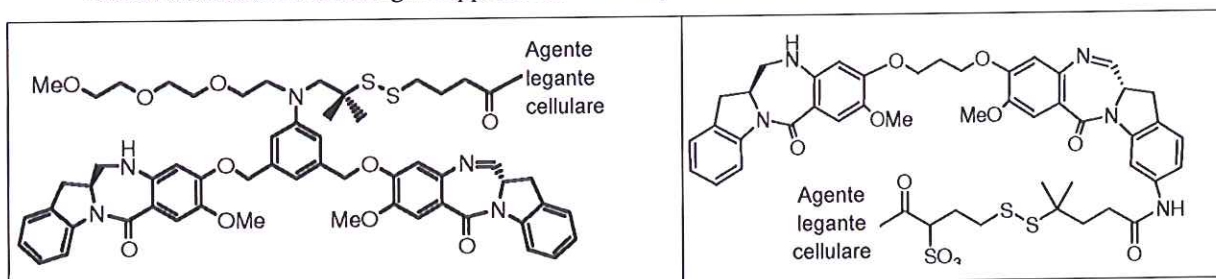
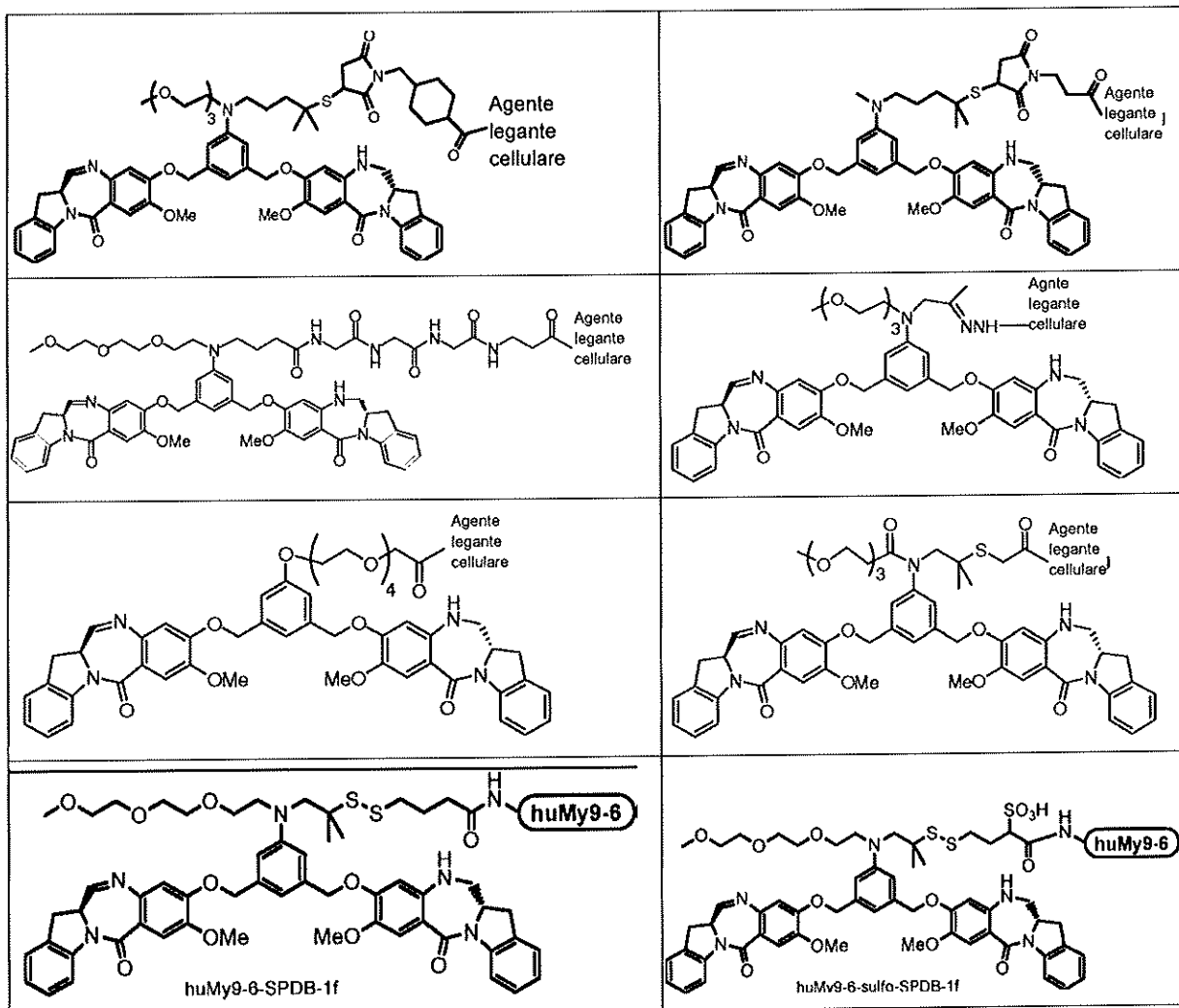
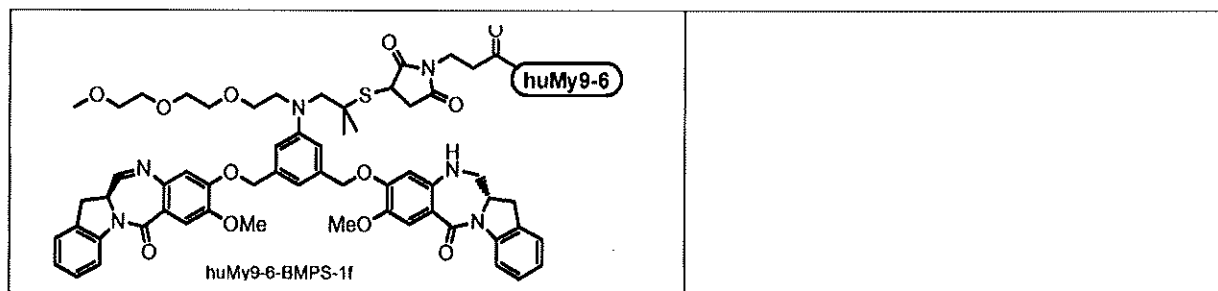


Tabella 8. Strutture dei coniugati rappresentativi della presente invenzione.







#### CITOTOSSICITÀ *IN VITRO* DI COMPOSTI E CONIUGATI

I composti citotossici e i coniugati agente legante cellulare-farmaco dell'invenzione possono essere valutati per la loro capacità di sopprimere la proliferazione di varie linee cellulari di cancro *in vitro*. Per esempio, linee cellulari come la linea di carcinoma del colon umano Colo 205, la linea cellulare di rhabdomyosarcoma RH-30 e la linea cellulare di mieloma multiplo MOLP-8 possono essere usate per la valutazione della citotossicità di questi composti e coniugati. Le cellule da valutare possono essere esposte ai composti per 1-5 giorni e le frazioni di sopravvivenza delle cellule misurate in saggi diretti mediante metodi noti. I valori di  $IC_{50}$  possono quindi essere calcolati dai risultati dei saggi. In alternativa o in aggiunta, uno screening di sensibilità su linea cellulare *in vitro*, come quello descritto dal National Cancer Institute statunitense (vedere Voskoglou-Nomikos *et al.*, 2003, *Clinical Cancer Res.* 9: 42227-4239), può essere usato quale guida per determinare i tipi di cancro che possono essere sensibili al trattamento con i composti o i coniugati dell'invenzione.

Esempi di potenza e di specificità per il bersaglio *in vitro* di coniugati anticorpo-agente citotossico della presente invenzione sono mostrati nelle FIGG. 25-26. Tutti i coniugati sono estremamente citotossici sulle cellule tumorali antigene-positive con una  $IC_{50}$  nel basso campo picomolare. Le linee cellulari antigene-negative rimanevano vitali quando esposte agli stessi coniugati. I dimeri di indolinobenzodiazepina presentavano una potenza bersaglio-specifica essendo 160 volte meno potenti quando bloccati con anticorpi non coniugati huMy9-6(anti-CD33) e 40 meno potenti quando bloccati con anticorpi anti-recettore dei folati FOLR1 (anticorpo anti-recettore dei folati). Ad esempio, il coniugato huMy9-6-SPDB-1f ha ucciso cellule HL60/QC antigene-positiva, con un valore di  $IC_{50}$  pari a 10,5 pM, mentre l'aggiunta di un eccesso di anticorpo non coniugato huMy9-6 riduceva tale effetto citotossico ( $IC_{50}$  =1,69 nM), dimostrando la specificità antigenica (FIG. 25A). Inoltre, il coniugato huMy9-6-SPDB-1f risultava inoltre altamente potente sia rispetto



alla linea cellulare HL60/ATCC, con un valore di  $IC_{50}$  pari a 21 pM, sia rispetto alla linea cellulare NB-4, con un valore di  $IC_{50}$  pari a 190 pM (FIGG. 25b e 25C).

Analogamente, il coniugato huFOLR1-SPDB-1f è risultato altamente potente, con un valore di  $IC_{50}$  pari a 55 pM per cellule KB antigene-positive (FIG. 26). L'aggiunta di un eccesso di anticorpo non coniugato huFOLR1 riduceva tale effetto citotossico >40 volte, dimostrando la specificità antigenica.

L'effetto della coniugazione sul legame dell'anticorpo è stata misurata confrontando il legame sia dell'anticorpo huMy9-6 non coniugato sia del coniugato huMy9-6-SPDB-1f rispetto alla linea cellulare HL60/QC (FIG. 27). Un'analisi FACS ha rivelato l'assenza di qualsiasi cambiamento nella capacità di legame del coniugato rispetto all'anticorpo nudo, indicando la non compromissione nel legame a causa della coniugazione tra l'agente citotossico e l'anticorpo.

In un esempio è stata misurata l'efficacia *in vivo* di un coniugato agente legante cellulare/agente citotossico. Topi nudi portatori di HL60/QC tumori umani sono stati trattati con il coniugato huMy9-6-SPDB-1f e una regressione tumorale significativa è stata osservata in corrispondenza di più dosi, mentre nei topi non trattati i tumori sono cresciuti rapidamente (FIG. 28). L'attività è stata osservata a dosi basse, nell'ordine di 20 µg/kg, che è almeno 35 volte minore della massima dose tollerata.

L'effetto di saturazione dell'immunità nei confronti della tollerabilità è mostrato nella Tabella 9. Il di-immunità huFOLR1-farmaco 1 è stato testato a più dosi, che si sono tutte dimostrate altamente tossiche, lasciando soggetti sopravvissuti soltanto nel gruppo alla dose più bassa testata di 50 µg/kg. Per contro, i coniugati parzialmente ridotti mono-immunità huFOLR1-farmaco 2 e huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1 -SPDB-1f) presentavano una tollerabilità significativamente migliore con il coniugato huFOLR1-SPDB-IGN (huFOLR1 -SPDB-1f), mostrando una sopravvivenza degli animali del 100% alle dosi più elevate testate di 560 µg/kg.

#### COMPOSIZIONI E METODI D'USO

La presente invenzione comprende anche una composizione (*ad es.* una composizione farmaceutica) comprendente nuovi composti benzodiazepinici qui descritti (*ad es.* indolinobenzodiazepina o ossazolidinobenzodiazepina), loro derivati o loro coniugati (*e/o* loro solvati, idrati *e/o* sali) e un supporto (un supporto farmaceuticamente accettabile). La presente invenzione comprende inoltre una composizione (*ad es.* una composizione

farmaceutica) comprendente nuovi composti benzodiazepinici qui descritti, loro derivati o loro coniugati (e/o loro solvati, idrati e/o sali) e un supporto (un supporto farmaceuticamente accettabile), comprendente inoltre un secondo agente terapeutico. Le presenti composizioni sono utili per inibire la crescita cellulare anomala o trattare un disturbo proliferativo in un mammifero (*ad es.* umano). Le presenti composizioni sono anche utili per trattare depressione, ansia, stress, fobie, panico, disforia, disturbi psichiatrici, dolore e malattie infiammatorie in un mammifero (ad esempio un essere umano).

La presente invenzione permette un metodo per inibire una crescita anormale di cellule o per trattare un disordine proliferativo in un mammifero (ad esempio un essere umano), che prevede di somministrare, a detto mammifero, una quantità terapeuticamente efficace dei nuovi composti benzodiazepinici qui descritti (ad esempio indolinobenzodiazepina o ossazolidinobenzodiazepina), loro derivati o loro coniugati (e/o loro solvati e sali), o una loro composizione, da soli o in combinazione con un secondo agente terapeutico.

La presente invenzione permette anche metodi di trattamento che prevedono di somministrare, a un soggetto bisognoso di trattamento, una quantità efficace di qualsiasi dei coniugati descritti sopra.

Nel presente contesto si descrive anche un metodo per indurre la morte cellulare in popolazioni di cellule selezionate, che prevede di mettere a contatto le cellule o il tessuto bersaglio, contenente le cellule bersaglio, con una quantità efficace di un agente citotossico, comprendente qualsiasi degli agenti composto citotossico-agente legante cellulare (ad esempio un dimero di indolinobenzodiazepina o ossazolidinobenzodiazepina collegato a un agente legante cellulare) della presente invenzione, un suo sale o solvato. Le cellule bersaglio sono cellule a cui può legarsi l'agente legante cellulare.

Se desiderato, possono essere somministrati insieme al coniugato altri agenti attivi, come altri agenti antitumorali.

Supporti, diluenti ed eccipienti farmaceuticamente accettabili adatti sono ben noti e possono essere determinati dagli esperti della tecnica come richiede la situazione clinica.

Esempi di supporti, diluenti e/o eccipienti adatti comprendono: (1) soluzione fisiologica tamponata con fosfato di Dulbecco, pH circa 7.4 contenente o non contenente da circa 1 mg/mL a 25 mg/mL di albumina sierica umana, (2) 0,9% di soluzione salina (0,9% p/v di NaCl) e (3) 5% (p/v) di destrosio e può anche contenere un antiossidante come

triptamina e un agente stabilizzante come Tween 20.

Il metodo per indurre la morte cellulare di popolazioni cellulari selezionate può essere praticato *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

5 Esempi di usi *in vitro* comprendono trattamenti del midollo osseo autologo prima del suo trapianto nello stesso paziente allo scopo di uccidere le cellule malate o maligne: trattamenti di midollo osseo prima del suo trapianto per uccidere cellule T competenti e impedire graft versus host disease (GVHD, reazione immunitaria cronica contro l'ospite); trattamenti di colture cellulari per uccidere tutte le cellule tranne le varianti desiderate che non esprimono l'antigene bersaglio o per uccidere le varianti che esprimono l'antigene non desiderato.

Le condizioni di uso *in vitro* non clinico sono facilmente determinabili da un esperto della tecnica.

10 Esempi di uso clinico *ex vivo* sono la rimozione di cellule tumorali o cellule linfoidi dal midollo osseo prima del trapianto autologo nel trattamento del cancro o nel trattamento di malattie autoimmuni o per rimuovere cellule T e altre cellule linfoidi da midollo osseo o tessuto autologo o allogenico prima del trapianto per impedire graft versus host disease (GVHD, reazione immunitaria cronica contro l'ospite). Il trattamento può essere effettuato come segue. Il midollo osseo viene raccolto dal paziente o da un altro individuo e poi incubato in terreno contenente siero a cui viene aggiunto l'agente  
15 citotossico dell'invenzione, le concentrazioni variano da circa 10  $\mu\text{M}$  a 1 pM, per circa 30 minuti a circa 48 ore a circa 37°C. Le precise condizioni di concentrazione e di durata di incubazione, ovvero la dose, sono facilmente determinate da una persona di competenza ordinaria nel ramo. Dopo l'incubazione, le cellule di midollo osseo vengono lavate con terreno contenente siero, e quindi reintrodotte nel paziente per via endovenosa, secondo metodi noti. In circostanze in cui il  
20 paziente riceve altri trattamenti quali un ciclo di chemioterapia ablativa o una radiazione corporea totale tra il tempo di raccolta del midollo e la nuova infusione delle cellule trattate, le cellule di midollo trattate vengono conservate congelate in azoto liquido utilizzando apparecchiature mediche standard.

Per l'uso clinico *in vivo*, l'agente citotossico dell'invenzione può essere fornito come una soluzione o una polvere liofilizzata che è testata per la sterilità e per i livelli di endotossina. Esempi di protocolli adatti di somministrazione di coniugato sono come segue. I coniugati vengono somministrati settimanalmente per 4 settimane come un bolo  
25 endovenoso ogni settimana. Le dosi di bolo vengono somministrate in soluzione fisiologica normale da 50 mL a 100 mL



a cui è possibile aggiungere da 5 mL a 10 mL di albumina sierica umana. I dosaggi saranno da 10 µg a 2.000 mg per somministrazione, per via endovenosa (intervallo da 100 ng a 20 mg/kg al giorno). Dopo quattro settimane di trattamento, il paziente può continuare a ricevere il trattamento su base settimanale. Protocolli clinici specifici relativi alla via di somministrazione, eccipienti, diluenti, dosaggi, tempi, ecc. possono essere determinati da un esperto della tecnica come richiede la situazione clinica.

5

Esempi di condizioni mediche che possono essere trattate secondo i metodi in vivo o ex vivo per indurre la morte cellulare in popolazioni di cellule selezionate comprendono tumori maligni di qualsiasi tipo compresi, per esempio cancro dei polmoni (a piccole cellule e non a piccole cellule), della mammella, del colon, del cervello, della prostata, del rene, del pancreas, delle ovaie, della testa e del collo, della cute (melanoma), carcinoma a cellule di Merkel, glioblastoma, neuroblastoma e cancro degli organi linfatici; patologie autoimmuni quali lupus sistemico, artrite reumatoide e sclerosi multipla; rigetti di trapianto quali rigetto di trapianto renale, rigetto di trapianto epatico, rigetto di trapianto polmonare, rigetto di trapianto cardiaco e rigetto di trapianto del midollo osseo; graft versus host disease (GVHD, reazione immunitaria cronica contro l'ospite), infezioni virali quali infezione da CMV, infezione da HIV, AIDS, ecc.; e infezioni da parassiti quali giardiasi, amebiasi, schistosomiasi e altre come determinate da una persona di competenza ordinaria nel ramo.

10

15

Le terapie oncologiche e loro dosaggi, le vie di somministrazione e l'utilizzo raccomandato sono noti nel ramo e sono stati descritti nella letteratura, come nel Physician's Desk Reference (PDR). Il PDR descrive i dosaggi degli agenti che sono stati usati nel trattamento di vari tumori. Il regime posologico e i dosaggi di questi succitati farmaci chemioterapici, che sono terapeuticamente efficaci, dipenderà dal particolare cancro da trattare, dalla gravità della malattia e da altri fattori familiari al medico esperto nel ramo, e possono essere determinati dal medico. L'esperto del ramo può riesaminare il PDR, usando uno o più dei seguenti parametri, per determinare il regime posologico e i dosaggi degli agenti chemioterapici e coniugati che possono essere usati secondo gli insegnamenti di questa invenzione. Questi parametri comprendono:

20

Indice completo

25

Per produttore

Prodotti (per nome del farmaco commercializzato dall'azienda)

Indice di categoria

Generico/indice chimico (nomi di farmaco comuni equivalenti)

Immagini a colori dei farmaci

5 Informazioni sul prodotto, coerentemente con l'etichettatura FDA

Informazioni chimiche

Funzione/azione

Indicazioni e controindicazioni

Studi clinici, effetti indesiderati, avvertenze

10 ANALOGHI E DERIVATI

Un esperto della tecnica di agenti citotossici comprenderà facilmente che ciascuno degli agenti citotossici descritti nel presente contesto può essere modificato in un modo tale che il composto risultante conservi ancora la specificità e/o l'attività del composto di partenza. L'esperto della tecnica comprenderà inoltre che molti di questi composti possono essere utilizzati al posto degli agenti citotossici descritti nel presente contesto. Pertanto, gli agenti citotossici della presente invenzione comprendono analoghi e derivati dei composti descritti nel presente contesto.

15

ESEMPI

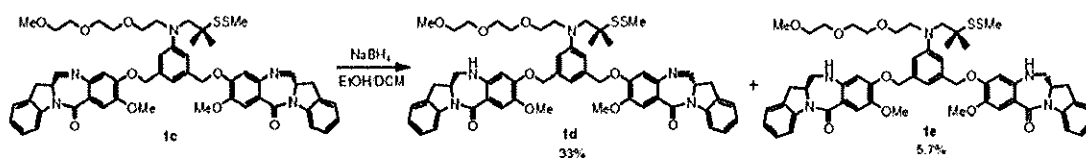
L'invenzione verrà ora illustrata con riferimento a esempi non limitativi. Salvo diversamente indicato, tutte le percentuali, i rapporti, le parti, ecc. sono in peso. Tutti i reagenti sono stati acquistati da Aldrich Chemical Co., New Jersey o altre fonti commerciali. Gli spettri di risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H}$  NMR) sono stati acquisiti su uno strumento Bruker a 400 MHz e gli spettri di massa sono stati acquisiti su uno strumento Bruker Daltonics Esquire 3000 utilizzando ionizzazione elettrospray.

20

Esempio 1



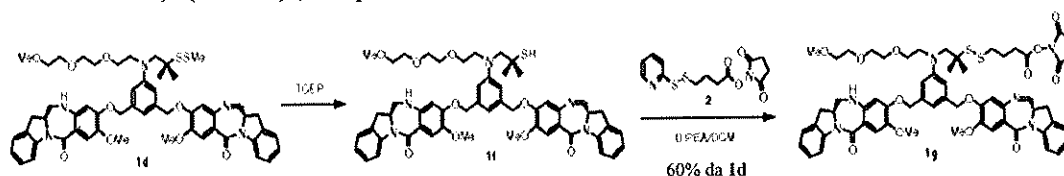
è stato aggiunto lentamente nell'arco di 15 minuti con una siringa. La soluzione ha continuato a essere agitata per 60 minuti a  $-10 \sim -7^\circ\text{C}$  e raffreddata mediante l'aggiunzione di ghiaccio/acqua. È stata diluita con etilacetato e lavata con acqua fredda. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato, concentrato e sottoposto a vuoto elevato per dare il mesilato come olio giallastro chiaro (340 mg). Il mesilato è stato trasferito in un pallone a fondo tondo da 10 mL con acetato di etile/diclorometano, concentrato e sottoposto a vuoto elevato. È stato aggiunto monomero IBD (412 mg, 1,4 mmol), seguito dall'aggiunta di dimetilformamide anidra (3 mL) e carbonato di potassio anidro (232 mg, 1,68 mmol). La miscela giallastra ottenuta è stata agitata a temperatura ambiente durante la notte. È stata diluita con diclorometano e lavata con soluzione salina. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato. Il residuo è stato disciolto in diclorometano e caricato su colonna di gel di silice ed eluito con diclorometano/metanolo (15:1, poi 10:1). Le frazioni che contenevano il composto 1c sono state combinate e concentrate a dare 705 mg di prodotto grezzo che è stato ulteriormente purificato mediante HPLC preparativa in fase inversa (colonna C18, eluita con acetonitrile/acqua) a dare il composto 1c come un solido giallastro soffice (181 mg, resa = 33%).  $^1\text{H NMR}$  (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,28 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,86 (d,  $J = 3,6$  Hz, 2H), 7,59 (s, 2H), 7,31-7,26 (m, 4H), 7,12 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 6,87-6,80 (m, 5H), 5,18 (dd,  $J_1 = 20,8$  Hz,  $J_2 = 12,4$  Hz, 4H), 4,50-4,47 (m, 2H), 3,99 (s, 6H), 3,75-3,48 (m, 18H), 3,37 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,32 (s, 6H); MS (m/z): riscontrato 1025,9 ( $\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na}$ ) $^+$ , 1043,9 ( $\text{M} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}$ ) $^+$ , 983,8 ( $\text{M} - \text{H}$ ), 1055,8 ( $\text{M} + 4\text{H}_2\text{O} - \text{H}$ ). Si veda la FIG. 1.



#### Composto 1d:

A una soluzione agitata di composto 1c (112 mg, 0,114 mmol) in diclorometano anidro (0,3 mL) ed etanolo assoluto (0,6 mL) è stato aggiunto boridruro di sodio (0,9 mg, 0,023 mmol) a  $0^\circ\text{C}$ . Il bagno di ghiaccio è stato rimosso dopo 5 minuti e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore e quindi raffreddata a  $0^\circ\text{C}$  e spenta con cloruro

di ammonio saturo, diluita con diclorometano, separata e lo strato organico è stato lavato con soluzione salina, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrata attraverso celite e concentrata. Il residuo è stato purificato mediante HPLC a fase inversa (colonna C18, acetonitrile/acqua). Le frazioni corrispondenti sono state estratte con diclorometano e concentrate per ottenere i prodotti 1d, 1e e il materiale di partenza non reagito 1c. Composto 1d: 37,1 mg (r = 33%), MS (m/z): riscontrato 1010,4 (M + Na)<sup>+</sup>, 1028,4 (M + H<sub>2</sub>O + Na)<sup>+</sup>, 1040,3 (M + 3H<sub>2</sub>O - H); composto 1e: 6,4 mg (r = 5,7%), MS (m/z): riscontrato 1012,4 (M + Na)<sup>+</sup>; composto 1c: 44,1 mg (r = 39%). Si veda la FIG. 1.

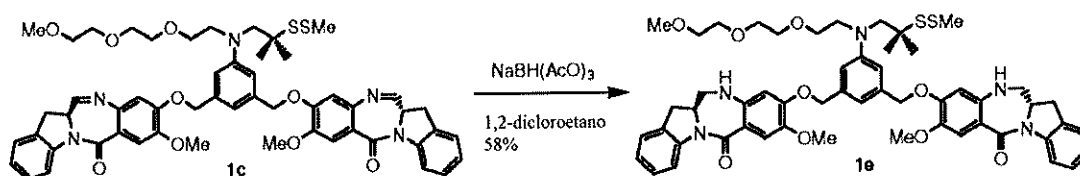


**Composto 1g:**

A una soluzione agitata di 1d (23,6 mg, 0,024 mmol) in acetonitrile (3 mL) e metanolo (3 mL) è stata aggiunta una soluzione TCEP appena preparata (17 mg di sale TCEP HCl sono stati neutralizzati con bicarbonato di sodio saturo a pH 6-6,5, quindi diluiti con 0,5 mL di tampone fosfato a pH 6,5) a temperatura ambiente. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore e quindi diluita con diclorometano e acqua deionizzata, separata e lo strato organico è stato lavato con soluzione salina, essiccato su solfato di sodio anidro e filtrato. Il filtrato è stato concentrato e sottoposto a vuoto elevato per dare 22 mg di 1f come schiuma giallastra chiara. Altri 18 mg di 1f sono stati preparati da 19 mg di 1d seguendo la stessa procedura. I 40 mg combinati (0,042 mmol) di 1f sono stati disciolti in diclorometano anidro (0,5 mL) e agitati. A questa soluzione agitata è stato aggiunto estere SPDB NHS 2 (34,6 mg, 80% di purezza, 0,085 mmol) e diisopropiltilammina (15 µL, 0,085 mmol). L'agitazione è stata continuata a temperatura ambiente per una notte, la miscela è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e diluita con diclorometano, separata e lavata con soluzione salina, essiccata su solfato di sodio, filtrata e concentrata. Il residuo è stato purificato mediante HPLC a fase inversa preparativa (colonna C18, acetonitrile/acqua). Le frazioni contenenti il prodotto sono state combinate, estratte con diclorometano e concentrate a dare il composto 1g come solido bianco (29,7 mg, r = 60%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CD<sub>3</sub>CN): δ 8,28-8,25 (m, 1H), 8,20-8,17 (m, 1H), 7,87-7,84 (m, 1H), 7,49 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 7,31-7,19 (m, 4H), 7,13-

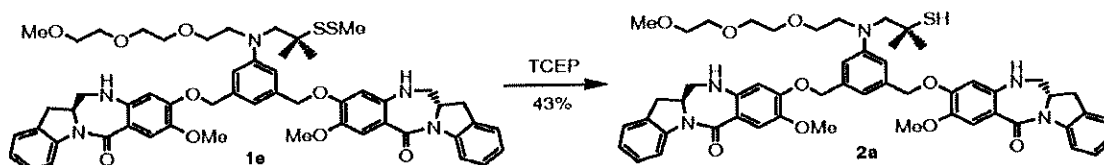
7,01 (m, 2H), 6,92-6,87 (m, 3H), 6,77 (bs, 1H), 6,31-6,29 (m, 1H), 5,16-5,09 (m, 2H), 5,00 (d, J = 4,4 Hz, 2H), 4,94 (bs, -NH), 4,48-4,43 (m, 1H), 4,40-4,34 (m, 1H), 3,90 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 3,77 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 3,64-3,39 (m, 18H), 3,26 (d, J = 4,4 Hz, 3H), 2,82-2,70 (m, 8H), 2,17 (d, J = 4,4 Hz, 1H), 2,08-2,01 (m, 3H), 1,30 (d, J = 4,4 Hz, 6H); MS (m/z): riscontrato 1025,9 (M + H<sub>2</sub>O + Na)<sup>+</sup>, 1043,9 (M + 2H<sub>2</sub>O + Na)<sup>+</sup>, 983,8 (M - H)<sup>-</sup>, 1055,8 (M + 4H<sub>2</sub>O - H)<sup>-</sup>; MS (m/z), riscontrato 1179,5 (M + Na)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 1.

#### Esempio 2



#### Composto 1e:

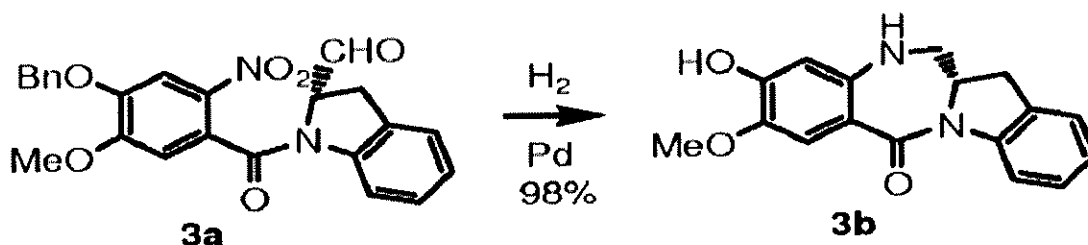
A una soluzione agitata di 1c (8 mg, 0,0081 mmol) in 1,2-diclorometano anidro (0,2 mL) è stato aggiunto triacetossiboroidruo di sodio (3,8 mg, 0,018 mmol). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 1,5 ore, quindi la miscela è stata diluita con diclorometano e spenta con bicarbonato di sodio saturo, separata e lo strato organico è stato lavato con soluzione salina, essiccato su solfato di sodio e filtrato. Il filtrato è stato concentrato e il resto è stato purificato mediante HPLC a fase inversa (colonna C18, acetonitrile/acqua) per dare il composto 1e come solido bianco (4,7 mg, r = 58%). MS (m/z), riscontrato 1012,4 (M + Na)<sup>+</sup>, 1024,2 (M + 2H<sub>2</sub>O - H)<sup>-</sup>. Si veda la FIG. 2.



#### Composto 2a:

A una soluzione agitata del composto 1e (12 mg, 0,012 mmol) in acetonitrile (1 mL) e metanolo (3 mL) è stata aggiunta una soluzione TCEP appena preparata (11 mg di sale TCEP HCl sono stati neutralizzati con bicarbonato di sodio

5 saturo a pH 6,5, quindi diluiti con 0,4 mL di tampone fosfato a pH 6,5) a temperatura ambiente. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 3,5 ore e quindi diluita con diclorometano e acqua deionizzata, separata e lo strato organico è stato lavato con soluzione salina, essiccato su solfato di sodio anidro e filtrato. Il filtrato è stato concentrato e il resto è stato purificato mediante HPLC a fase inversa (colonna C18, acetonitrile/acqua) per dare il composto 2a come solido bianco (4,9 mg, r = 43%). MS (m/z), riscontrato 966,4 (M + Na)<sup>+</sup>, 978,2 (M + 2H<sub>2</sub>O - H)<sup>-</sup>. Si veda la FIG. 2.

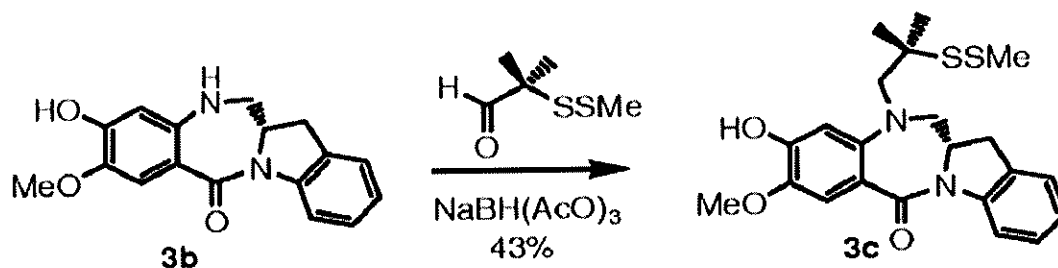


### Esempio 3

#### Composto 3b:

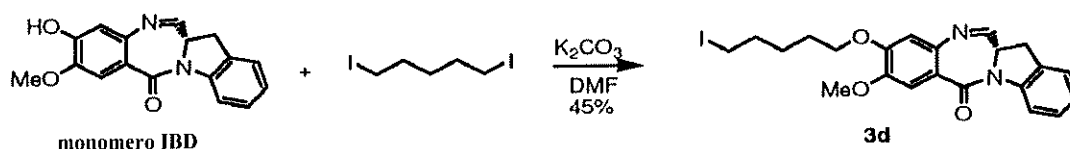
10 A una soluzione del composto 3a (830 mg, 1,9 mmol) in metanolo (15 mL) è stato aggiunto Pd/C (10%, 204 mg, 0,19 mmol). L'aria nel pallone è stata rimossa sotto vuoto e quindi sostituita con idrogeno in un palloncino. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La miscela è stata filtrata attraverso celite e la celite/Pd/C lavati con diclorometano e metanolo. Il filtrato è stato concentrato e il residuo diluito con diclorometano ed evaporato per alcuni cicli e quindi è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (diclorometano/metanolo) per dare il composto 3b

15 come solido giallastro chiaro (558 mg, r = 98%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,34 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,22 (dd, J<sub>1</sub> = 8,0 Hz, J<sub>2</sub> = 7,6 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,02 (dd, J<sub>1</sub> = 7,2 Hz, J<sub>2</sub> = 7,6 Hz, 1H), 6,16 (s, 1H), 4,37 (tt, J<sub>1</sub> = 10,4 Hz, J<sub>2</sub> = 7,2 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,49-3,36 (m, 3H), 2,73 (dd, J<sub>1</sub> = 16,8 Hz, J<sub>2</sub> = 3,6 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 167,0, 150,4, 142,6, 141,2, 140,8, 129,9, 127,7, 124,8, 123,96, 117,4, 113,7, 112,5, 104,7, 57,3, 56,3, 54,7, 33,0; MS (m/z), riscontrato 295,1 (M + Na)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 3.



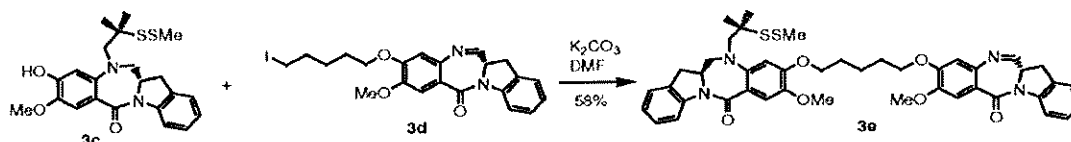
*Composto 3c:*

A una soluzione della 2-(metilditio)-isobutirraldeide (113 mg, 0,75 mmol) e del composto 3b (148 mg, 0,5 mmol) in 1,2-dicloroetano anidro (2 mL) è stato aggiunto triacetossiboroidruo di sodio (212 mg, 1,0 mmol). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 2 giorni. Durante il tempo, sono state aggiunte altre due porzioni (0,05 mL, 0,5 mmol/porzione) di 2-(metilditio)-isobutirraldeide insieme a una porzione di triacetossiboroidruo di sodio (106 mg, 0,5 mmol). La reazione è stata spenta con bicarbonato di sodio saturo, diluita con diclorometano e acqua. Lo strato organico è stato lavato con soluzione salina, essiccato su solfato di sodio e filtrato. Il filtrato è stato concentrato a pressione ridotta e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (CombiFlash, colonna da 24 g, esani/acetato di etile) per dare il composto 3c come solido bianco soffice (92,5 mg, r = 43%). Anche il materiale di partenza non reagito 3b è stato recuperato (49,3 mg, r = 33%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,30 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,28 (dd, J<sub>1</sub> = 6,8 Hz, J<sub>2</sub> = 7,6 Hz, 1H), 7,25-7,20 (m, 2H), 7,07 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,17 (s, 1H), 4,36-4,28 (m, 1H), 3,89 (s, 3H), 3,78 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 3,46,3,34 (m, 3H), 2,90 (d, J = 14,4 Hz, 1H), 2,73 (dd, J<sub>1</sub> = 16,4 Hz, J<sub>2</sub> = 2,8 Hz, 1H), 2,34 (s, 3H), 1,17 (s, 3H), 1,05 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 167,2, 149,0, 142,5, 142,2, 141,9, 129,9, 128,0, 125,3, 124,5, 124,1, 117,1, 112,0, 108,5, 64,8, 61,4, 58,1, 56,3, 53,4, 32,0, 26,3, 25,7, 25,4; MS (m/z), riscontrato 453,3 (M + Na)<sup>+</sup>, 429,2 (M - H)<sup>-</sup>. Si veda la FIG. 3.



**Composto 3d:**

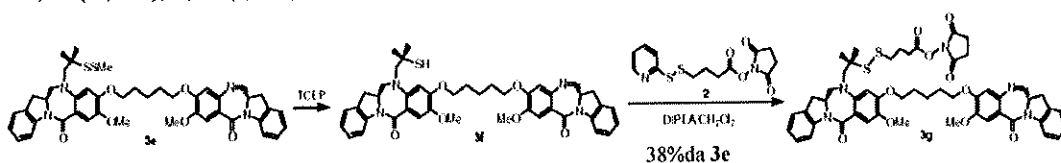
A una soluzione agitata di monomero IBD (125 mg, 0,425 mmol) e 1,5-diidopentano (0,63 mL, 4,25 mmol) in dimetilformammide anidra (3 mL) è stato aggiunto carbonato di potassio (59 mg, 0,425 mmol) e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La soluzione di reazione è stata diluita con diclorometano, lavata con soluzione salina ed essiccata su solfato di sodio anidro. È stata filtrata e concentrata. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (esani/acetato di etile) a dare il composto 3d come schiuma giallastra (94 mg, r = 45%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,27 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,86 (d, J = 4,8 Hz, 1H), 7,56 (s, 1H), 7,27 (dd, J<sub>1</sub> = 8,4 Hz, J<sub>2</sub> = 7,6 Hz, 2H), 7,10 (dd, J<sub>1</sub> = 7,6 Hz, J<sub>2</sub> = 7,2 Hz, 1H), 6,82 (s, 1H), 4,48 (dt, J<sub>1</sub> = 10,8 Hz, J<sub>2</sub> = 4,4 Hz, 1H), 4,15-4,07 (m, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,70 (dd, J<sub>1</sub> = 16,8 Hz, J<sub>2</sub> = 10,8 Hz, 1H), 3,49 (dd, J<sub>1</sub> = 16,8 Hz, J<sub>2</sub> = 4,0 Hz, 1H), 3,22 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,96-1,87 (m, 4H), 1,64-1,57 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164,0, 163,2, 151,4, 148,3, 142,2, 140,3, 129,6, 128,3, 124,9, 120,5, 117,0, 112,0, 110,6, 68,8, 56,4, 55,1, 33,3, 32,7, 28,0, 27,2, 6,6; MS (m/z), riscontrato 513,3 (M + Na)<sup>+</sup>, 543,2 (M + 3H<sub>2</sub>O - H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 3.



**15 Composto 3e:**

A una soluzione agitata dei materiali di partenza 3c (91 mg, 0,21 mmol) e 3d (94 mg, 0,19 mmol) in dimetilformammide anidra (1 mL) è stato aggiunto carbonato di potassio (29 mg, 0,21 mmol) e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. La soluzione di reazione è stata diluita con diclorometano, lavata con soluzione salina ed essiccata su solfato di sodio anidro. È stata filtrata, concentrata e il residuo è stato purificato mediante

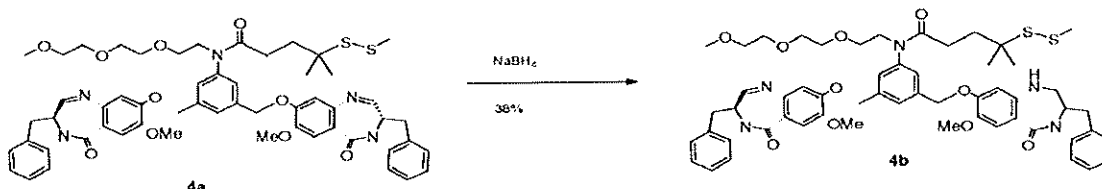
cromatografia su gel di silice (esani/acetato di etile) a dare il composto 33 come schiuma giallastra (89,1 mg, r = 58%).  
<sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,32-8,28 (m, 2H), 7,91 (bs, 1H), 7,57 (s, 1H), 7,36-7,21 (m, 5H), 7,15-7,05 (m, 2H), 6,85 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 4,53-4,48 (m, 1H), 4,37-4,31 (m, 1H), 4,21-4,03 (m, 4H), 3,98 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 3,86-3,70 (m, 2H), 3,55-3,35 (m, 4H), 2,93 (d, J = 4,0 Hz, 1H), 2,73 (dd, J<sub>1</sub> = 16,4 Hz, J<sub>2</sub> = 2,4 Hz, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,03-1,96 (m, 3H),  
 5 1,77-1,67 (m, 3H), 1,21 (s, 3H), 1,06 (s, 3H); MS (m/z), riscontrato 815,3 (M + Na)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 3.



#### Composto 3g:

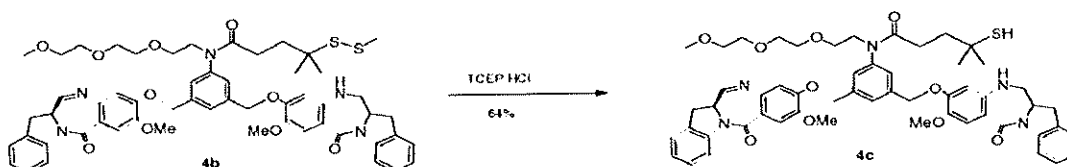
A una soluzione agitata del composto 3e (33,1 mg, 0,042 mmol) in acetonitrile (2 mL) e metanolo (4 mL) è stata  
 aggiunta una soluzione TCEP appena preparata (36 mg di sale TCEP HCl sono stati neutralizzati con bicarbonato di sodio  
 10 saturo a pH 6,5, quindi diluiti con 0,4 mL di tampone fosfato a pH 6,5) a temperatura ambiente. La miscela è stata agitata  
 a temperatura ambiente per 3 ore e quindi diluita con diclorometano e acqua deionizzata, separata e lo strato organico è  
 stato lavato con soluzione salina, essiccato su solfato di sodio anidro e filtrato. Il filtrato è stato concentrato e sottoposto  
 a vuoto elevato per dare 31 mg del composto 3f come solido giallastro. È stato disciolto in diclorometano anidro (0,5  
 mL). Successivamente sono stati aggiunti estere SPDB NHS 2 (26 mg, 80% di purezza, 0,063 mmol) e  
 15 diisopropiletilammmina (11 μL, 0,063 mmol). La miscela ha continuato a essere agitata a temperatura ambiente per una  
 notte, è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e diluita con diclorometano, separata e lavata con soluzione salina,  
 essiccata su solfato di sodio, filtrata e concentrata. Il residuo è stato purificato mediante HPLC a fase inversa preparativa  
 (colonna C18, acetonitrile/acqua). Le frazioni contenenti il prodotto sono state combinate, estratte con diclorometano e  
 20 concentrate a dare il composto 3g come solido giallastro (15,2 mg, r = 38%). MS (m/z), riscontrato 984,3 (M + Na)<sup>+</sup>,  
 1014,2 (M + 3H<sub>2</sub>O - H)<sup>-</sup>. Si veda la FIG. 3.

#### Esempio 4



*Composto 4b:*

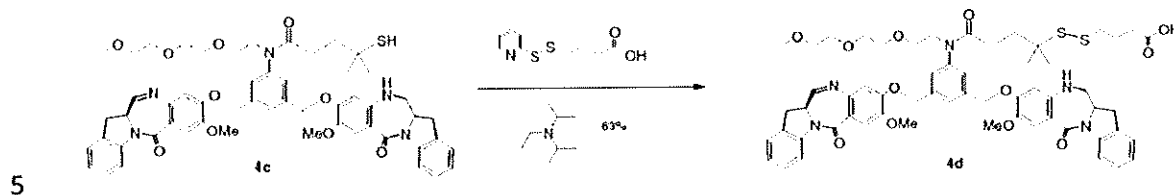
Una soluzione agitata del composto 4a (111 mg, 0,108 mmol) in etanolo assoluto (720  $\mu$ L) e diclorometano anidro (360  $\mu$ L) è stata raffreddata a 0 °C in un bagno di ghiaccio. È stato aggiunto boridruro di sodio (0,817 mg, 0,022 mmol) in 50  $\mu$ L di etanolo assoluto a 0 °C. La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per due ore. La miscela è stata raffreddata a 0 °C in un bagno di ghiaccio, spenta con cloruro di ammonio saturo ed estratta con diclorometano. Gli estratti organici sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su solfato di sodio anidro e filtrati attraverso celite. Il filtrato è stato concentrato a pressione ridotta e il materiale grezzo è stato purificato mediante RP-HPLC (C18 acqua deionizzata/acetonitrile) a dare il composto 4b (43 mg, 38%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,26 (d, 1H,  $J$  = 8,0Hz), 8,18 (d, 1H,  $J$  = 8,0Hz), 7,77 (d, 1H,  $J$  = 4,4 Hz), 7,51 (s, 1H), 7,41 (s, 2H), 7,17 (m, 6H), 7,03 (t, 1H,  $J$  = 7,2Hz), 6,96 (t, 1H,  $J$  = 7,2Hz), 6,76 (s, 1H), 6,04 (s, 1H), 5,13 (m, 4H), 4,38 (m, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,79 (m, 2H), 3,63 (m, 1H), 3,51 (m, 8H), 3,43 (m, 6H), 3,25 (s, 3H), 2,73 (dd, 1H,  $J$  = 3,6, 16,4Hz), 2,22 (s, 3H), 2,04 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,18 (s, 6H); MS (m/z) riscontrato 1051,9 (M+Na), 1069,9 (M+Na+H<sub>2</sub>O). Si veda la FIG. 4.



15 *Composto 4c:*

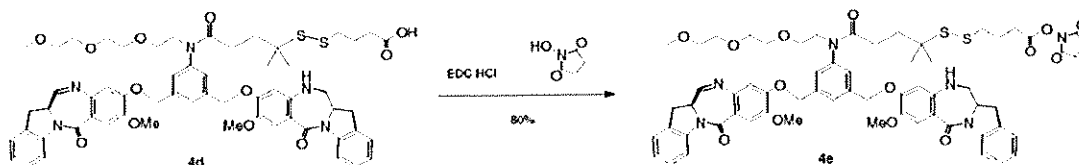
A una soluzione agitata del composto 4b (40 mg, 0,039 mmol) in metanolo (4,45 mL) e acetonitrile (2,225 mL) è stato aggiunto TCEP.HCl (39,0 mg, 0,136 mmol) in tampone di fosfato di sodio (0,89 mL, pH 6,5). La miscela è stata

agitata a temperatura ambiente per 18 ore. La miscela è stata diluita con diclorometano e lavata con acqua e soluzione salina. Gli estratti organici sono stati essiccati su solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati. La purificazione mediante RP-HPLC (C18, acqua deionizzata/acetonitrile) e l'estrazione con diclorometano hanno dato il composto 4c (26,5 mg, 64%); MS (m/z) riscontrato 1006,0 (M+Na). Si veda la FIG. 4.



*Composto 4d:*

10 A una soluzione agitata del composto 4c (24 mg, 0,024 mmol) in diclorometano anidro (800  $\mu$ L) è stato aggiunto PBA (11,18 mg, 0,049 mmol) e diisopropiletilammina (20,18  $\mu$ L, 0,116 mmol). Dopo agitazione per 18 ore a temperatura ambiente, la reazione è stata diluita con diclorometano e spenta con cloruro di ammonio saturo. Gli estratti sono stati separati e l'organico è stato lavato con soluzione salina, essiccato su solfato di sodio anidro e concentrato a pressione ridotta. La purificazione mediante PTLC (5% di metanolo/diclorometano) ha dato il composto 4d (17 mg, 63%); MS (m/z) riscontrato, 1123,9 (M+Na) 1139,9 (M+K); 1099,8 (MH) 117,9 (M-H+H<sub>2</sub>O). Si veda la FIG. 4.



*Composto 4e:*

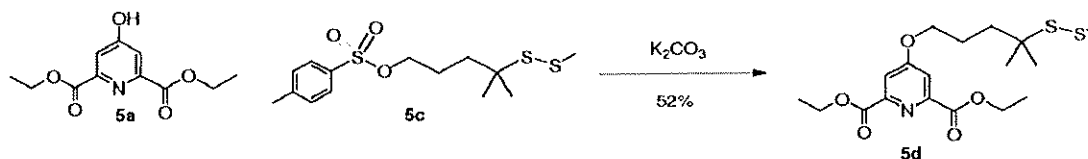
15 A una miscela del composto 4d (15 mg, 0,014 mmol) e N-idrossisuccinimide (4,70 mg, 0,041 mmol) in diclorometano anidro (1,0 mL) è stato aggiunto EDC.HCl (7,83 mg, 0,041 mmol). Dopo agitazione per 18 ore a temperatura ambiente, la reazione è stata diluita con diclorometano e spenta con cloruro di ammonio saturo. La miscela è stata lavata con soluzione salina, essiccata su solfato di sodio anidro, filtrata e concentrata a pressione ridotta. Il materiale





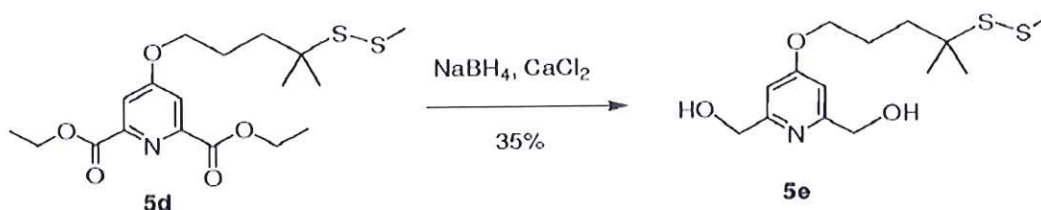
*Composto 5c:*

Una soluzione di 4-metil-4-(metildisolfonil)pentan-1-olo (5b) (2,0 g, 11,09 mmol) in diclorometano anidro (55,5 mL) è stata raffreddata a 0 °C in un bagno di ghiaccio. Sono stati aggiunti trietilammina (5,41 mL, 38,8 mmol) e toluene cloruro di solfonile (3,17 g, 16,64 mmol) a 0 °C. La reazione è stata agitata per tre ore a temperatura ambiente. La miscela è stata estratta con etilacetato e lavata con soluzione salina. Gli estratti organici sono stati essiccati con solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice (5% di etilacetato/esani) ha dato come risultato 4-metil-4-(metildisolfanil)pentil-4-metilbenzensolfonato (5c) (1,5 g, 40%). 5b: <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3,42 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 1,77 (bs, 1H), 1,43 (m, 4H), 1,09 (s, 6H). 5c: <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,66 (d, 2H, J=7,6Hz), 7,22 (d, 2H, J=8,0Hz), 3,90 (t, 2H, J = 6,4Hz), 2,32 (s, 3H), 2,23 (s, 3H), 1,60 (m, 2H), 1,44 (m, 2H), 1,11 (s, 6H). Si veda la FIG. 5.



*Composto 5d:*

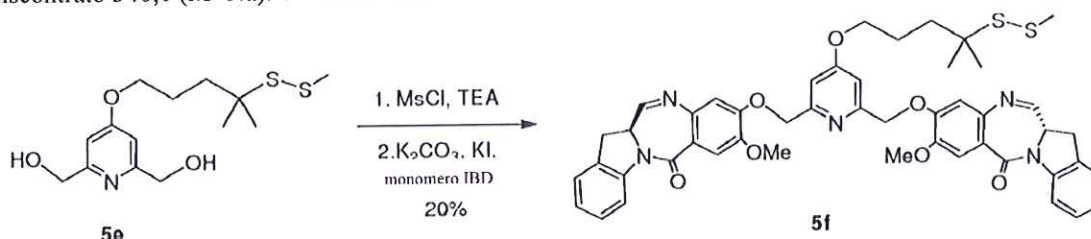
A una soluzione agitata di 4-metil-4-(metildisolfanil)pentil-4-metilbenzensolfonato (5c) (0,48 g, 1,435 mmol) e dietil-4-idrossipiridina-2,6-dicarbossilato (5a) (0,343 g, 1,435 mmol) in dimetilformammide anidra (6,5 mL) è stato aggiunto carbonato di potassio (0,297 g, 2,152 mmol). La reazione è stata agitata a 90 °C per 18 ore. Quindi, è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente e spenta con cloruro di ammonio saturo. La miscela è stata estratta tre volte con etilacetato. Gli estratti sono stati essiccati con solfato di sodio anidro e concentrati a pressione ridotta. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice (30% di esani/etilacetato) ha dato dietil 4-(4-metil-4-(metildisolfanil)pentilossi)piridina-2,6-dicarbossilato (5d) (300 mg, 52%); <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,70 (s, 2H), 4,40 (q, 4H, J= 7,2, 14,4Hz), 4,07 (t, 2H, J=6, Hz), 2,35 (s, 3H), 1,86 (m, 2H), 1,70 (m, 2H), 1,38 (t, 6H, J=7,2Hz), 1,27 (s, 6H); MS (m/z), riscontrato 424,1 (M+Na), 440,1 (M+K). Si veda la FIG. 5.



*Composto 5e:*

A una soluzione agitata di dietil 4-(4-metil-4- (metildisolfanil)pentilossi)piridina-2,6-dicarbossilato (5d) (270 mg, 0672 mmol) in etanolo assoluto (7,0 mL) è stato aggiunto cloruro di calcio (224 mg, 2,017 mmol) e boroidruo di sodio (76 mg, 2,017 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 90 minuti, dopo di che è stata spenta con acqua e concentrato *nel vuoto* per rimuovere l'etanolo. La miscela è stata quindi estratta due volte con diclorometano. Gli estratti organici sono stati combinati, lavati con acqua, essiccati con solfato di magnesio anidro e filtrati attraverso celite. Il filtrato è stato concentrato a pressione ridotta e il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con il 10% di metanolo/diclorometano per dare (4-(4-metil-4-

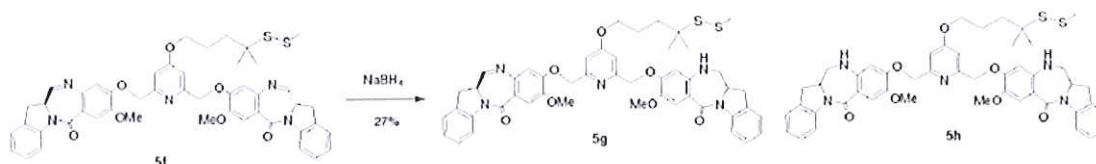
10 (metildisolfanil)pentilossi)piridina-2,6-diil)dimetanolo (5e) (75 mg, 35%); <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDC<sub>13</sub>): δ 6,63 (s, 2H), 4,60 (s, 4H), 3,95 (t, 2H, *J*= 6,2Hz), 3,54 (bs, 2H), 2,35 (s, 3H), 1,82 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,26 (s, 6H); MS (*m/z*), riscontrato 340,1 (*M*+Na). Si veda la FIG. 5.



*Composto 5f:*

15 Una soluzione agitata di (4-(4-metil-4-(metildisolfanil)pentilossi)piridina-2,6-diil)dimetanolo (5e) (51 mg, 0,161 mmol) in diclorometano anidro (1,6 mL) è stata raffreddata a -5 °C in un bagno di ghiaccio/acetone. Sono stati aggiunti trietilammina (0,112 mL, 0,803 mmol) e metansolfonil cloruro (0,031 mL, 0,402 mmol). La miscela è stata

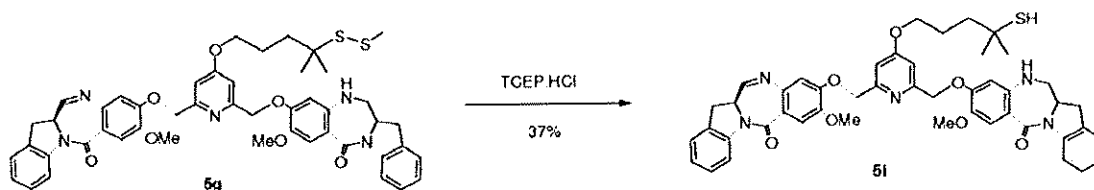
agitata per 60 minuti a -5 °C. La reazione è stata spenta con acqua ghiacciata ed estratta con etilacetato freddo. Gli estratti organici sono stati lavati con acqua ghiacciata, essiccati con solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta per dare il dimesilato. A una miscela agitata dell'intermedio dimesilato (179 mg, 0,378 mmol) e monomero IBD (256 mg, 0,869 mmol) in dimetilformammide anidra (3,8 mL) è stato aggiunto carbonato di potassio (261 mg, 1,890 mmol) e ioduro di potassio (31,4 mg, 0,189 mmol). La reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 18 ore. La miscela è stata spenta con acqua ed estratta tre volte con diclorometano. Gli estratti organici sono stati essiccati con solfato di sodio, filtrati e concentrati. Il materiale grezzo è stato ridisciolti in acetonitrile e purificato mediante RP-HPLC (C18, acqua deionizzata/acetonitrile). Le frazioni contenenti il prodotto sono state combinate ed estratte con diclorometano, essiccate con solfato di magnesio anidro, filtrate e concentrate sotto pressione ridotta a dare il composto 5f (65 mg, 20%); <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,20 (d, 2H, J= 8,0Hz), 7,78 (m, 2H), 7,53 (s, 2H), 7,20 (m, 4H), 7,04 (t, 2H, J= 7,4Hz), 6,91 (m, 2H), 6,80 (s, 2H), 5,22 (s, 4H), 4,40 (m, 2H), 3,94 (s, 6H), 3,93 (m, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,42 (dd, 2H, J= Hz), 2,32 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,24 (s, 6H); MS (m/z), riscontrato 892,3 (M+Na) 910,3 (M+Na+H<sub>2</sub>O) 928,3 (M+Na+2H<sub>2</sub>O). Si veda la FIG. 5.



#### 15 Composto 5g e 5h:

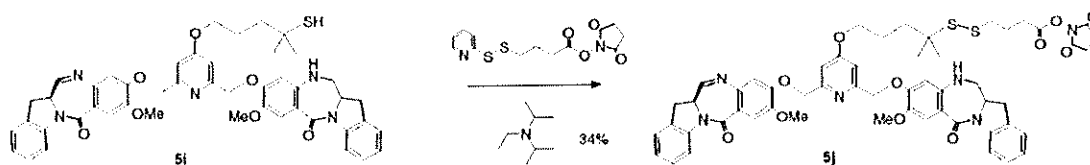
Una soluzione agitata del composto 5f (74 mg, 0,085 mmol) in etanolo assoluto (600 μL) e diclorometano anidro (300 μL) è stata raffreddata a 0 °C in un bagno di ghiaccio. È stato aggiunto boridruro di sodio (0,644 mg, 0,017 mmol) in 50 μL di etanolo assoluto a 0 °C. La miscela è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per due ore ed è stata quindi raffreddata a 0 °C. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo ed estratta con diclorometano. Gli estratti organici sono stati lavati con soluzione salina, essiccati su solfato di sodio anidro, filtrati attraverso celite e concentrati a pressione ridotta. Il materiale grezzo è stato ridisciolti in dimetilformammide e purificato mediante RP-HPLC (C18, acqua deionizzata/acetonitrile). Le frazioni contenenti i composti 5g e 5h sono state combinate separatamente ed estratte

con diclorometano, essiccate con solfato di magnesio anidro, filtrate e concentrate a dare il composto 5g (20 mg, 27%) e il composto 5h. 5g:  $^1\text{H NMR}$  (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,25 (m, 1H), 8,18 (m, 1H), 7,77 (m, 1H), 7,51 (ss, 1H), 7,40 (ss, 1H), 7,18 (m, 4H), 7,08 (m, 1H), 7,03 (m, 1H), 6,92 (m, 2H), 6,86 (ss, 1H) 5,98/6,06 (ss, 1H), 5,24 (m, 4H), 4,40 (m, 1H), 4,30 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,92 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,62 (m, 1H), 3,37 (m, 1H), 2,65 (m o dd, 1H), 2,32 (ss, 3H), 1,77 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,24 (s, 6H). 5h:  $^1\text{H NMR}$  (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8,24 (d, 2H,  $J=8,0\text{Hz}$ ), 7,39 (s, 2H), 7,14 (m, 4H), 6,97 (m, 2H), 6,93 (m, 2H), 6,15 (ss, 2H), 5,25 (s, 4H), 4,37 (m o t, 2H,  $J=9,8\text{Hz}$ ), 4,2 (bs, 2H), 3,94 (m, 2H), 3,83 (s, 6H), 3,40 (m, 6H), 2,72 (dd, 2H,  $J = \text{Hz}$ ), 2,32 (s, 3H), 1,79(m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,24 (s, 6H). Si veda la FIG. 5.



**Composto 5i:**

10 A una soluzione agitata del composto 5g (20 mg, 0,023 mmol) in metanolo (5,25 mL) e acetonitrile (1,750 mL) è stato aggiunto TCEP.HCl (19,72 mg, 0,069 mmol) in tampone di fosfato di sodio (0,7 mL, pH 6,5). La miscela è stata agitata per 3 ore a temperatura ambiente e quindi diluita con diclorometano e acqua. Gli strati sono stati separati e l'organico è stato lavato con soluzione salina. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante RP-HPLC (C18, acqua deionizzata/acetonitrile). Le frazioni contenenti il prodotto sono state combinate, estratte con diclorometano ed evaporate a dare il composto 5i (7 mg, 37%). MS (m/z), riscontrato 848,3 (M+Na) 866,3 (M+Na+H<sub>2</sub>O) 880,3 (M+Na+MeOH). Si veda la FIG. 5.



**Composto 5j:**

A una soluzione agitata del composto 5i (7 mg, 8,47 mmol) e 2,5-diossopirrolidin-1-il-4-(piridin-2-ildisolfanil)butanoato (8,64 mg, 0,021 mmol) in diclorometano anidro (113  $\mu$ L) è stata aggiunta diisopropiletilammina (3,69  $\mu$ L, 0,021 mmol). Dopo agitazione per 18 ore a temperatura ambiente, la reazione è stata spenta con cloruro di ammonio saturo ed estratta con diclorometano. Gli estratti organici sono stati lavati con soluzione salina, essiccati con solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati a pressione ridotta. Il materiale grezzo è stato purificato mediante RP-HPLC preparativa (C18, acqua deionizzata/acetonitrile). Le frazioni contenenti il prodotto sono state estratte con diclorometano, filtrate ed evaporate a dare il composto 5j (3 mg, 34%). MS (m/z), riscontrato 1063,3 (M+Na) 1081,3 (M+Na+H<sub>2</sub>O). Si veda la FIG. 5.

#### Esempio 6

#### 10 Preparazione del coniugato anticorpo-SPDB-farmaco:

Il composto 1g è stato pretrattato con 3 equivalenti molari di sodio bisolfito (utilizzando una soluzione appena preparata di NaHSO<sub>3</sub> in acqua) nel 96-98% di DMA in acqua per 4-5 ore a 25 °C. Per la coniugazione, l'anticorpo umanizzato a 2 mg/mL è stato fatto reagire con 5-7 equivalenti molari di composto 1g (pretrattato con NaHSO<sub>3</sub>) per 6 ore a 25 °C all'85-90% di PBS, pH 7,4, tampone acquoso o 50 mM di HEPES, pH 8,5, tampone acquoso, contenente il 10-15% di N,N-dimetilacetammide (DMA) e quindi purificato su colonna di gel-filtrazione G25 in PBS, pH 7,4, per rimuovere il composto di farmaco non reagito o idrolizzato. I coniugati anticorpo umanizzato-SPDB-farmaco sono stati dializzati in istidina 10 mM di istidina, 250 nM di glicina, l'1% di saccarosio, tampone a pH 6,5. Il rapporto farmaco anticorpo (DAR) dei coniugati è stato misurato essere 2,2-2,9 mediante misurazioni di assorbanza UV a 280 e 320 nm e utilizzando i coefficienti di estinzione del farmaco e dell'anticorpo a 280 nm (215.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) e 320 nm (9137 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

20 La percentuale di monomero nei coniugati è stata determinata come >90% mediante SEC (cromatografia di esclusione dimensionale) utilizzando una colonna TSK-gel G300SWXL (7,8 mm x 300 mm, dimensione delle particelle 5  $\mu$ m). Sulla base dell'assorbanza UV del picco di monomero in SEC è stato inoltre dimostrato che i picchi di coniugato monomero avevano molecole di farmaco legate. Per un saggio con farmaco libero (non coniugato), il coniugato è stato estratto con acetone per rimuovere la proteina, essiccato e ricostituito in fase mobile, e iniettato su una colonna HPLC in fase inversa

25 VYDAC 208TP C8 (4,6 x 250 mm, dimensione particellare 7 $\mu$ m) e confrontata con degli standard. La percentuale di

composto di farmaco libero nel coniugato è stata determinata per essere  $< 0,5\%$  del composto di farmaco coniugato. Si veda la FIG. 22.

Preparazione di coniugato umanizzato Ab-SPDB-2a:

Un Ab umanizzato a 8 mg/mL è stato funzionalizzato con 4-6 equivalenti molarli di linker eterobifunzionale SPDB per 1,5 ore a 25°C in PBS 95%, pH 7,4, contenente DMA 5% (v/v), e quindi purificato su una colonna di dissalazione G25 in tampone citrato (tampone citrato 35 mM, pH 5,5, contenente EDTA 2 mM, NaCl 150 mM) per rimuovere il linker che non ha reagito. Il LAR (rapporto linker/anticorpo) è stato misurato usando l'assorbanza UV a 280 e 343 nm senza e con aggiunta di ditiotreitolo 50 mM (per misurare l'anticorpo totale e l'SPy rilasciato con ditiotreitolo), e il LAR è risultato essere 2,7-4,1. L'anticorpo modificato con SPDB a 2 mg/mL è stato fatto reagire con 2 equivalenti molarli di composto 2a (sale HCl) per ogni SPDB collegato per 20 ore a temperatura ambiente in tampone citrato 85%, DMA 15% (v/v), e quindi purificato su una colonna di dissalazione G25 in PBS, pH 7,4, in modo da rimuovere il composto di farmaco non coniugato. Il DAR del coniugato Ab umanizzato-SPDB-2a finale è stato misurato mediante spettrofotometria UV a 280 e 350 nm, e il DAR è risultato essere secondo i calcoli  $\sim 1,7-2,1$ . La percentuale di monomero e di composto di farmaco collegato sul monomero nel coniugato è stata determinata tramite HPLC usando una colonna di cromatografia di esclusione dimensionale (SEC). Si veda la FIG. 23.

#### Esempio 7

Potenza in vitro di farmaci liberi e coniugati:

Procedura generale utilizzata: Campioni dei composti di farmaco libero non coniugato o di coniugati di farmaco sono stati aggiunti a piastre di coltura tissutale da 96 pozzetti con fondo piatto e titolati usando diluizioni seriali per coprire il campo molare desiderato. Cellule antigene-positive ( $Ag^+$ ) o antigene-negative ( $Ag^-$ ) sono state aggiunte ai pozzetti in specifiche densità cellulari in modo tale che vi fossero campioni in triplicato per ogni concentrazione di farmaco per ciascuna corrispondente linea cellulare. Le piastre sono state quindi incubate a 37°C in un'atmosfera di  $CO_2$  5% per 4-5 giorni, a seconda della linea cellulare. COLO 205 (1.000 cellule/pozzetto), Namalwa (3.000 cellule/pozzetto), HEL 92.1.7 (3.000 cellule/pozzetto) — 4 giorni; RH30 (1.000 cellule/pozzetto), HL60/QC (5.000 cellule/pozzetto), Ramos (10.000 cellule/pozzetto), KB (2.000 cellule/pozzetto), BJAB (2.000 cellule/pozzetto), NB4 (3.000 cellule/pozzetto) — 5 giorni,

RPMI 8226 (8.000 cellule/pozzetto) — 6 giorni.

Al termine del periodo di incubazione, le potenze citotossiche sono stati poi valutate adoperando un saggio di vitalità cellulare basato su WST-8 e le cellule sopravvissute sono state misurate mediante sviluppo con WST-8 (2-7 ore). L'assorbanza in ogni pozzetto è stata misurata, e la frazione di cellule sopravvissute a ciascuna concentrazione è stata rappresentata graficamente in modo da rivelare la citotossicità e/o specificità antigenica (dei coniugati).

Utilizzando la procedura generale descritta sopra, la citotossicità dei composti di farmaco libero non coniugato è stata misurata rispetto a sette linee cellulari: KB, un contaminante di cellule HeLa, HL60/QC, una linea cellulare di leucemia mieloide acuta, Namalwa, una linea cellulare di linfoma di Burkitt, NB4, una linea cellulare di leucemia promielocitica acuta, HEL92.1.7, una linea cellulare di eritroleucemia, RPMI8226, una linea cellulare di mieloma multiplo e BJAB, una linea cellulare di leucemia a cellule B. I risultati, mostrati nella FIG. 24 e nella Tabella 10, dimostrano l'elevata potenza dei presenti composti su un'ampia gamma di tipi cellulari. La potenza e la specificità dei coniugati anticorpo-farmaco sono state misurate contro cellule che esprimono l'antigene, con e senza aggiunte di una quantità in eccesso di anticorpo non coniugato bloccante allo scopo di mostrare la specificità dell'effetto letale. Il coniugato MY9-6-farmaco era estremamente potente contro tre differenti cellule esprimenti l'antigene: HL60/ATCC, HL60/QC e NB-4, malgrado la molto bassa espressione dell'antigene nelle cellule NB4. La potenza specifica poteva essere bloccata mediante aggiunta di un eccesso di anticorpo non coniugato, dimostrando che l'effetto di uccisione cellulare è antigene-specifico. Analogamente, il coniugato huFOLR1-farmaco era efficace nell'uccidere cellule KB esprimenti l'antigene in una maniera specifica. I risultati sono mostrati nelle Figure 25 e 26.

Tabella 10. Potenza dei farmaci liberi contro varie linee cellulari. I valori  $IC_{50}$  elencati in tabella sono in unità di nM.

	Namalwa	KB	HL60/QC	NB4	HEL92.1.7	RPMI8226	BJAB
1c	0,056	0,16	0,023				
1d	0,069	0,18	0,032				
1e	2,4	>3,0	0,67				
27d		0,23	0,05	0,039	0,14	0,07	0,04

27e		0,39	0,09	0,13	0,2	0,24	0,12
27f		4,4	1,7	1,1	1,8	>3,0	1
29a	0,002	0,004	0,001	0,0023	0,0031	0,011	0,001
29b	0,003	0,007	0,006	0,007	0,007	0,005	0,003
29c	0,013	0,057	0,03	0,023	0,027	0,16	0,015

Risultati simili sono stati anche ottenuti usando differenti linee cellulari e differenti coniugati dell'invenzione, quali: huMY9-6-SPDB-1f contro cellule HL60/QC (Ag<sup>+</sup>), cellule HL60/ATCC (Ag<sup>+</sup>) e cellule NB-4 (Ag<sup>+</sup>) (FIG. 25); huFOLR1-SPDB-1f contro cellule KB (Ag<sup>+</sup>) (FIG. 26); huMY9-6-SPDB-1f contro cellule HL60/QC antigene-positivo, cellule HL60/ATCC, cellule NB-4 e cellule HEL 92.1.7 (FIG. 29); huMy9-6-SPDB-1f, huMy9-6-solfoSPDB-1f, e huMy9-6-BMPS-1f contro HL60/QC (Ag<sup>+</sup>) cellule (FIG.34) chB38.1-SPDB-1f e chB38.1-solfoSPDB-1f contro cellule COL0205 (Ag<sup>+</sup>) (FIG.34) huMy9-6-SPDB-1f, huMy9-6-solfoSPDB-1f, e huMy9-6-BMPS-1f contro cellule OCI-AML3 (Ag<sup>+</sup>) (FIG. 44). Si veda anche la FIG. 49 per la potenza dei vari coniugati contro varie linee cellulari, espressa come valori di IC<sub>50</sub> (nM). Si noti che nelle FIGG. 25, 29, 34, 35 e 44, i coniugati sono stati preparati in presenza di bisolfito di sodio.

Per confrontare le misurazioni della potenza in vitro dei presenti coniugati, preparati con e senza reagente reattivo imminico come bisolfito di sodio, huMy9-6-BMPS-1f, huMy9-6-solfo-SPDB-1f e huMy9-6-farmaco 2 sono stati preparati con e senza bisolfito di sodio usando il metodo di solfonazione in situ (in cui i rispettivi composti dell'invenzione sono stati prima miscelati con bisolfito di sodio e un reticolatore bifunzionale che reca un gruppo reattivo, dopodiché la miscela di reazione, senza ulteriori purificazioni, è stata fatta reagire con l'anticorpo monoclonale huMy9-6 in qualità di agente legante cellulare). Le IC<sub>50</sub> dei coniugati sulle cellule HL60-QC sono mostrate di seguito. I dati indicano che l'inclusione del gruppo reattivo imminico (come bisolfito di sodio) nel passaggio di preparazione del coniugato non incide negativamente sulla potenza in vitro dei presenti coniugati.

Coniugato	NaHSO <sub>3</sub> trattamento	IC <sub>50</sub> (pM)	IC <sub>50</sub> (pM) huMy9-6 bloccante
-----------	-----------------------------------	--------------------------	---

huMy9-BMPS-1f	-	2	130
	+	1,5	55
huMy9-6-soifo-SPDB-1f	-	5,6	1200
	+	7,1	610
huMy9-6-farmaco 2	-	16	> 3000
	+	6,8	> 3000

È evidente che il pre-trattamento dei composti farmaceutici con bisolfito di sodio (5 equivalenti molar, 22 ore, 4°C, DMA:acqua pH 5,5 90:10) prima della coniugazione con huMy9-6 non ha avuto alcun effetto significativo sulla potenza in vitro antigene-dipendente o antigene-indipendente dei coniugati (blocco dell'antigene con huMy9-6 non coniugato 1mM).

5 Esempio 8

Il legame del coniugato anticorpo-farmaco è simile a quello di un anticorpo non coniugato:

10 Il legame del coniugato huMY9-6-farmaco è stato confrontato con quello dell'anticorpo huMY9-6 contro cellule esprimenti l'antigene HL60/QC adoperando una citometria a flusso. In sintesi, le cellule antigene-positivo sono state incubate con anticorpi coniugati o non modificati a 4°C, quindi con un anticorpo secondario coniugato a FITC a 4°C, fissate con formaldeide (1% in PBS) e analizzate in citometria di flusso. Nessuna differenza significativa è stata osservata tra il legame del coniugato rispetto a quello dell'anticorpo non modificato. Un esempio viene mostrato nella FIG. 27, dove un coniugato huMY9-6-farmaco si legava a cellule antigene-positivo con un'alta affinità simile a quella dell'anticorpo non modificato.

Esempio 9

15 Efficacia in vivo del coniugato huMy9-6-BMPS-1f in topi nudi portatori di tumore HL60/QC:

In questo studio, l'attività anti-tumorale di huMY9-6-SPDB-1f è stata studiata in topi nudi femmine portatori di tumori HL60/QC, un modello di leucemia mieloide acuta umana. Cellule tumorali HL60/QC, 2x 10<sup>6</sup> cellule/topo, sono state inoculate per via sottocutanea, in un volume di 0,1 mL/topo nell'area sopra la spalla destra di topi nudi atimici femmine, di 5 settimane d'età. Otto giorni dopo l'inoculazione delle cellule tumorali, i topi sono stati randomizzati in

gruppi (n = 6 per gruppo) per volume tumorale. Il trattamento è stato iniziato il giorno della randomizzazione, e i gruppi includevano un gruppo di controllo trattato con PBS (200 µL/iniezione), o con un singolo trattamento a varie dosi (5 - 100 µg/kg) di huMY9-6-SPDB-1f (50 µg/kg di dose 1f corrispondevano a 2,5 mg/kg di dose di anticorpo). Tutti i trattamenti sono risultati ben tollerati con le perdite medie di peso corporeo paragonabili alla perdita osservata nei topi di controllo PBS. Il volume tumorale medio in funzione del tempo è mostrato (FIGG. 28 e 36) con i dati che dimostrano un'attività anti-tumorale dose-dipendente del coniugato huMY9-6-SPDB-1f. La dose efficace minima è stata stimata pari a 20 µg/kg, ossia circa 35 volte inferiore alla dose massima tollerata.

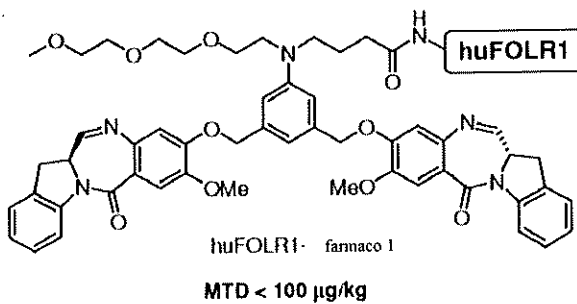
#### Esempio 10

La tollerabilità dei coniugati huFOLR-1 è stata indagata nei topi femmina CD-1. Gli animali sono stati osservati per sette giorni prima dell'inizio dello studio e riscontrati privi di malattie. Ai topi è stata somministrata una singola iniezione e.v. del coniugato e gli animali sono stati quotidianamente monitorati per quanto riguarda la perdita di peso corporeo, morbilità o mortalità. La Tabella 9 mostra che per huFOLR1-farmaco 1 il coniugato è stato tollerato solo alla dose più bassa testata di 50 µg/kg. Per contro, entrambi i coniugati mono-immuni huFOLR1-farmaco 2 e huFOLR1-SPDB-1f sono risultati essere meglio tollerati con una dose massima tollerata di rispettivamente <198 µg/kg e >560 µg/kg.

Tabella 9. Dati di comparazione di tollerabilità per i coniugati (A) huFOLR1- farmaco 1, (B) huFOLR1- farmaco 2 e (C) huFOLR1- SPDB-1f.

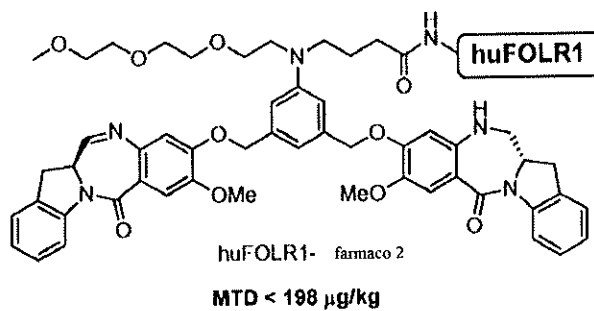
A)

Dose (µg/kg)	% di sopravvivenza
50	100
100	0
200	0
300	0
400	0



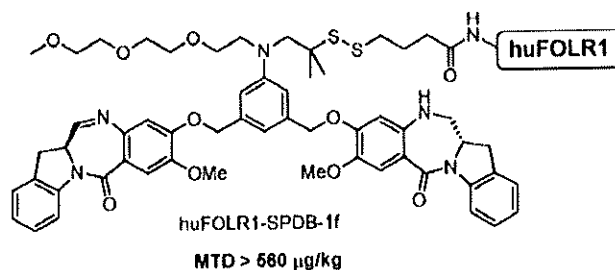
B)

Dose (µg/kg)	% di sopravvivenza
66	100
132	100
198	50
264	25

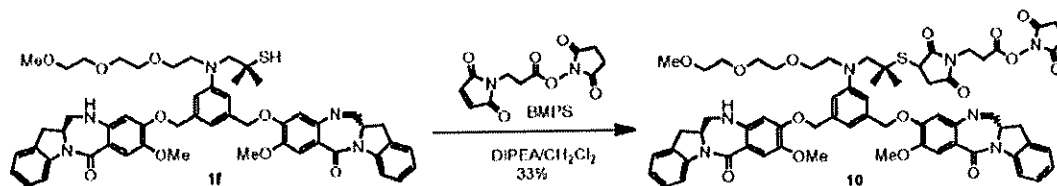


C)

Dose (µg/kg)	% di sopravvivenza
120	100
160	100
200	100
320	100
560	100



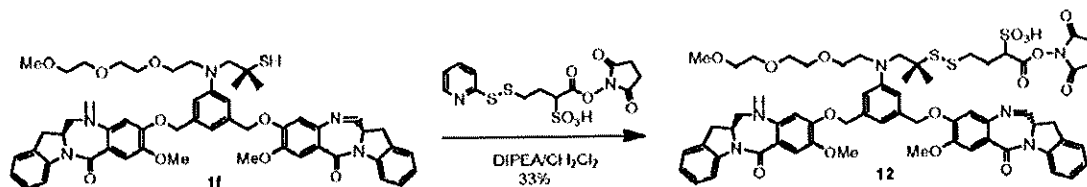
Esempio 11



Composto 10:

- 5 A una soluzione agitata del composto 1f (18 mg, 0,019 mmol) e N-((β-maleimidopropilossi)succinimide (BMPS) estere (9,2 mg, 0,034 mmoli) in diclorometano anidro (0,3 mL) è stata aggiunta diisopropiletilammina anidro (5 [tl, 0,029 mmol). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 27 ore, spenta con cloruro di ammonio saturo e diluita con diclorometano. Lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante HPLC a fase inversa preparativa (colonna C18, CH3CN/H2O). Le frazioni contenenti il prodotto sono state combinate, estratte con diclorometano e concentrate a dare il
- 10 composto 10 come solido bianco (7,6 mg, r = 33%). MS (m/z): riscontrato 1208,3 (M + H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 13.

Esempio 12



Composto 12:

A una soluzione agitata di 1f (16,5 mg, 0,018 mmol) e solfo-SPDB (14,2 mg, 0,036 mmol) in diclorometano anidro (0,3 mL) è stata aggiunta diisopropiletilammmina anidro (9  $\mu$ L, 0,054 mmol). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte poi concentrata a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante HPLC a fase inversa preparativa (colonna C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O). Le frazioni contenenti il prodotto sono state combinate, estratte con diclorometano ed evaporate per dare 6,6 mg di composto 12 sotto forma di una schiuma di colore giallastro. Lo strato acquoso è stato liofilizzato, ottenendo altri 0,5 mg del composto 12 sotto forma di un solido bianco. MS (m/z): riscontrato 1235,0 (M-1-1)-. Si veda la FIG. 15.

Esempio 13

Preparazione di coniugato umanizzato anticorpo-solfoSPDB-1f

Una reazione contenente 2,5 mg/mL di anticorpo huMy9-6 e 10 equivalenti molar di 10 (pretrattati con una quantità 5 volte maggiore di bisolfito di sodio in DMA:acqua 90:10) in tampone HEPES (4-(2-idrossietil)-1-piperazina acido etansolfonico) 50 mM, pH 8.5 e cosolvente DMA (N,N-dimetilacetamide) 15% v/v è stata lasciata coniugare per 6 ore a 25 °C. Dopo la reazione, il coniugato è stato purificato e il tampone sostituito con glicina 250 mM, istidina 10 mM, saccarosio 1%, Tween 0,01%, tampone formulato con bisolfito di sodio 50  $\mu$ M, utilizzando colonne di dissalazione NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). La dialisi è stata effettuata nello stesso tampone per 4 ore a temperatura ambiente utilizzando cassette di dialisi Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MwCO). Il coniugato purificato ha mostrato di possedere un DAR di 2,4 (via UV-Vis usando i coefficienti di estinzione molare  $\epsilon_{330nm} = 15,484 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  e  $\epsilon_{280nm} = 30,115 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  per 1f. e  $\epsilon_{280nm} = 146,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$  per l'anticorpo My9-6), 96,7% di monomero

(mediante cromatografia di esclusione dimensionale), <1 % di composto di farmaco libero non coniugato (mediante estrazione in acetone/HPLC in fase inversa) e una concentrazione finale della proteina di 1,4 mg/mL.

La potenza in vitro degli anticorpi coniugati sulfoSPDB-1f è stata misurata secondo la procedura generale descritta nell'Esempio 7 e i dati sono mostrati nelle Figure 34 e 35. Gli anticorpi coniugati sulfoSPDB-1f hanno mostrato una potenza simile o superiore a quella degli anticorpi coniugati SPDB-1f.

5 L'uso di reagenti immina covalenti, come bisolfito di sodio, migliora le specifiche del coniugato Ab-composto (ad esempio, % di monomero e carica di farmaco). In un esperimento, la formazione di un addotto è stata condotta con 5 equivalenti molar di reagenti immina su NHS-BMPS-1f in DMSO 90%/PBS 10%, pH 7,4, per 4 ore a 25 °C. La miscela di reazione è stata quindi aggiunta all'anticorpo huMy9-6 (4 equivalenti molar IGN, 2 mg/ml, 10% v/v di DMSO, 10 tamponi HEPES 50 mM, pH 8,5, 5 h, 25 °C). Coniugati prodotti usando idrosolfito di sodio, bisolfito di sodio o metabisolfito di sodio avevano rapporti IGN/Ab e % di monomero simili, mentre i coniugati realizzati senza trattamento con additivo hanno portato a un'incorporazione di farmaco molto bassa. Si veda la tabella seguente.

Reagente	IGN/Ab (UV)	% di monomero (SEC)	% 1f sul monomero
Idrosolfito di sodio	2,6	88	82
Bisolfito di sodio	2,6	88	83
Metabisolfito di sodio	2,7	88	82

Nessun additivo	0,1	98	94
-----------------	-----	----	----

Esempio 14

Preparazione di coniugato umanizzato anticorpo-solfoSPDB-1f

Una reazione contenente 2,0 mg/mL di anticorpo huMy9-6 e 5 equivalenti molarli di 12 (pretrattati con una quantità 5 volte maggiore di bisolfito di sodio in DMA:acqua 90:10) in tampone HEPES (4-(2-idrossietil)-1-piperazina acido etansolfonico) 50 mM, pH 8.5 e cosolvente DMA (N,N-dimetilacetamide)15% v/v è stata lasciata reagire per 6 ore a 25 °C. Dopo la reazione, il coniugato è stato purificato e il tampone sostituito con glicina 250 mM, istidina 10 mM, saccarosio 1%, Tween 0,01%, tampone formulato con bisolfito di sodio 50 µM, utilizzando colonne di dissalazione NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). La dialisi è stata effettuata nello stesso tampone per 4 ore a temperatura ambiente utilizzando cassette di dialisi Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MwCO). Il coniugato purificato ha mostrato di possedere un DAR di 2,8 (via UV-Vis usando i coefficienti di estinzione molare  $\epsilon_{330nm} = 15,484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  e  $\epsilon_{280nm} = 30,115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  per 1f, e  $\epsilon_{280nm} = 146,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  per anticorpi My9-6), 91,7% di monomero (mediante cromatografia di esclusione dimensionale), <1% di composto di farmaco libero non coniugato (mediante estrazione in acetone/HPLC in fase inversa) e una concentrazione finale della proteina di 1,2 mg/mL.

La potenza *in vitro* degli anticorpi BMPS-1f è stata misurata secondo la procedura generale descritta nell'Esempio 7 e i dati mostrati nelle FIGG. 34 e 35. Gli anticorpi coniugati BMPS-1f hanno mostrato una potenza simile agli anticorpi coniugati SPDB-1f.

Esempio 15

Efficacia *in vivo* del coniugato hu FOLR1-SPDB-1f in topi nudi portatori di tumore KB:

In questo studio, l'attività anti-tumorale di huMY9-6-SPDB-1f è stata studiata in topi nudi femmine portatori di tumori HL60/QC, un modello di leucemia mieloide acuta umana. KB,  $1 \times 10^7$  cellule/topo, sono state inoculate per via sottocutanea, in un volume di 0,1 mL/topo nell'area sopra la spalla destra di topi nudi atimici femmine, di 6 settimane

d'età. Sei giorni dopo l'inoculazione delle cellule tumorali, i topi sono stati randomizzati in gruppi (n = 6 per gruppo) per volume tumorale. Il trattamento è stato iniziato il giorno dopo la randomizzazione, e i gruppi includevano un gruppo di controllo trattato con PBS (200 µL/iniezione), o con un singolo trattamento a varie dosi (20 - 200 µg/kg) di FOLR1-SPDB-1f (50 µg/kg di dose di farmaco legato corrispondeva a 2,8 mg/kg di dose di anticorpo). Tutti i trattamenti sono risultati ben tollerati senza perdita di peso corporeo osservata in uno qualsiasi dei gruppi di prova. Il volume tumorale medio in funzione del tempo è mostrato (FIG. 37) con i dati che dimostrano una dose-dipendente dell'attività anti-tumorale del coniugato hu FOLR1-SPDB-1f. La dose efficace minima è stata stimata essere <50 µg/kg, ossia circa 14 volte minore rispetto alla dose massima tollerata.

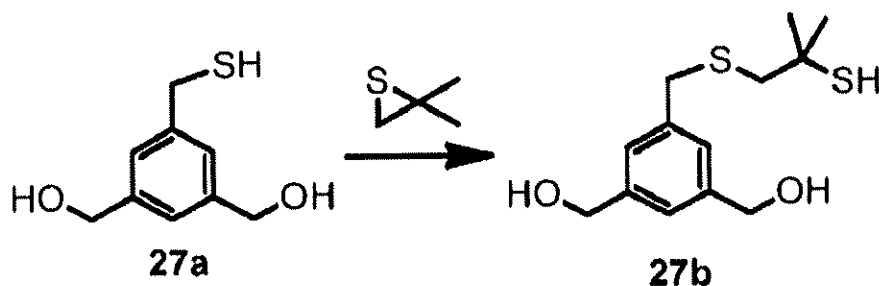
Risultati simili *in vivo* sono stati ottenuti usando altri coniugati dell'invenzione con vari altri modelli tumorali, tra cui huMy9-6-solfo-SPDB-1f in MOLM-13 nei topi portatori di tumore MOLM-13 (FIG. 50); huMy9-6-solfo-SPDB-1f in NB4 nei topi portatori di tumore NB4 (FIGG. 51); huMy9-6-BMPS-1f in HL60/QC nei topi portatori di tumore (FIG. 52) huMy9-6-BMPS-1f in MOLM-13 nei topi portatori di tumore (FIG. 53); huMy9-6-farmaco 2 in HL60/QC nei topi portatori di tumore (FIG. 56); e huMy9-6-farmaco 2 in MOLM-13 nei topi portatori di tumore (FIG. 57). Si noti che nelle FIGG. 53, 54, 56 e 57, i coniugati sono stati preparati in presenza di bisolfito di sodio.

Per confrontare l'efficacia *in vivo* dei coniugati in oggetto preparati con o senza gruppo immuno-reattivo, huMy9-6-farmaco 2 sono stati formulati con o senza 50 µM di bisolfito di sodio e i coniugati sono stati usati per trattare topi portatori di xenotrapianti di tumore HL60-QC. I dati sottostanti mostrano che i coniugati formulati con o senza 50 µM di bisolfito di sodio hanno dimostrato un T/C% confrontabile a una dose di farmaco di ~20 µg/kg, indicando che l'inclusione di bisolfito di sodio nel passaggio di preparazione di coniugati non incide negativamente sulla potenza *in vivo* del coniugato in oggetto.

NaHSO <sub>3</sub>	Dose minima efficace (µg/kg di farmaco)	T/C %
-	18	20

+	19	16
---	----	----

Esempio 16



Composto 27b:

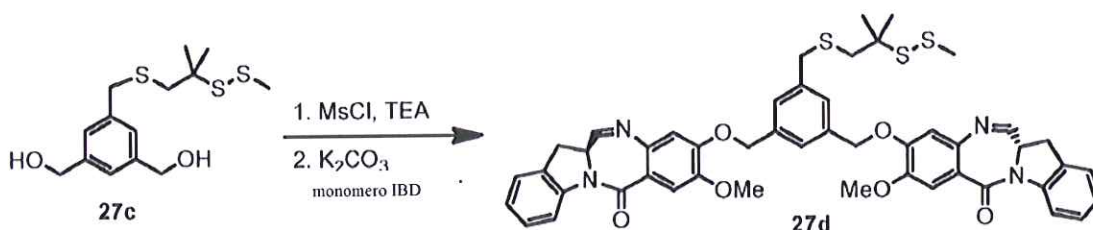
5           (5-((2-mercapto-2-metilpropiltio)metil)-1,3-fenilene)dimetanolo: (5-(mercaptometil)-1,3-fenilene)dimetanolo (0,163 g, 0,885 mmol) è stato dissolto in metanolo (3 mL) in una piccola fiala ed è stata aggiunta una barra di agitazione. A questa soluzione sono stati aggiunti trietilammina (0,016 mL, 0,118mmol) seguito da 2,2-dimetiltirano (0,058 mL, 0,590 mmol), e la miscela risultante è stata tappata e agitata per una notte (16 ore) a temperatura ambiente. La reazione è stata quindi concentrata, dissolta nuovamente in diclorometano, caricata su una piastra ptlc di silice (1000 micron) e la

10 piastra è stata sviluppata usando il 10% di metanolo in diclorometano. La banda corrispondente al prodotto è stata raschiata, filtrata con etil acetato e concentrata, ottenendo (5-((2-mercapto-2-metilpropiltio)metil)-1,3-fenilene)dimetanolo (0,095 g, 0,349mmol, 59,1% di resa). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,26 (s, 3H), 4,69 (s, 4H), 3,82 (s, 2H), 2,74 (s, 2H), 2,17 (s, 1H), 2,12 (br s, 2H), 1,43 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 141,6, 138,9, 126,7, 124,3, 65,0, 49,0, 45,4, 38,4, 31,5, 17,4, 16,6, 13,6; MS (m/z), previsto: 272,4, riscontrato 295,0 (M+Na). Si veda la FIG. 30.



Composto 27c:

(5-((2-metil-2-(metildisolfani)propiltio)metil)-1,3-fenilene)dimetanolo: (5-((2-mercapto-2-  
 5 metilpropiltio)metil)-1,3-fenilene)dimetanolo (0,120 g, 0,440 mmol) è stato dissolto in etanolo (5 mL) e 1,0 M, di  
 tampone fosfato di potassio (pH 7) (5,00 mL) e raffreddato in un bagno di ghiaccio (si è formato un ppt, ma è stato  
 ignorato). È stato aggiunto S-metil metansolfonatotioato (0,083 mL, 0,881 mmol) e la miscela è stata agitata per una  
 notte e lasciata riscaldare gradualmente (in 30 minuti) a temperatura ambiente. La reazione è stata diluita con  
 diclorometano e lo strato organico è stato rimosso, lavato con acqua, essiccato su solfato di sodio anidro e concentrato  
 nel vuoto. Il residuo è stato dissolto in diclorometano e caricato su una piastra ptlcda 500 micron e sviluppato con il 66%  
 10 di etil acetato in esano. La banda corrispondente al prodotto è stata raschiata, filtrata usando etil acetato, e concentrata,  
 ottenendo (5-((2-metil-2-(metildisolfani)propiltio)metil)-1,3-fenilene)dimetanolo (0,091 g, 0,286mmol, 64,9% di resa).  
<sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,27 (s, 3H), 4,71 (s, 4H), 3,78 (s, 2H), 2,77 (s, 2H), 2,41 (s, 3H), 1,94 (br s, 2H), 1,38 (s,  
 6H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 141,6, 139,0, 126,7, 124,2, 65,0, 51,8, 44,0, 38,2, 26,7, 25,3; MS (m/z), previsto:  
 341,5, riscontrato 341,1 (M+Na). Si veda la FIG. 30.

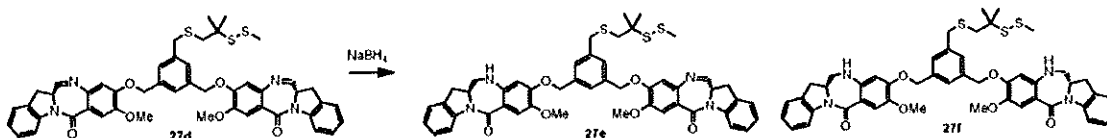


*Composto 27d:*

(5-((2-metil-2-(metilsolfanil)propiltio)metil)-1,3-fenilene)dimetanolo (80 mg, 0,251 mmol) in diclorometano anidro (1,75 mL) è stato raffreddato a -5 °C in un bagno di salamoia/ghiaccio. È stata aggiunta trietilammina (105 µL, 0,753 mmol) e poi addizionata con metansolfonil cloruro (50,7 µL, 0,653 mmol) ad una temperatura di -5 °C. La reazione è stata agitata a -5 °C per un'ora, dopodiché è stata diluita con etil acetato freddo ed è stato aggiunto ghiaccio. La miscela è stata trasferita in un imbuto separatore ed estratta con etil acetato freddo. Gli estratti organici sono stati lavati con acqua ghiacciata, essiccati con solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati a pressione ridotta. Il risultante (5-((2-metil-2-(metildisolfanil)propiltio)metil)-1,3-fenilene)bis (metilen)dimetansolfonato è stato usato senza ulteriori purificazioni.

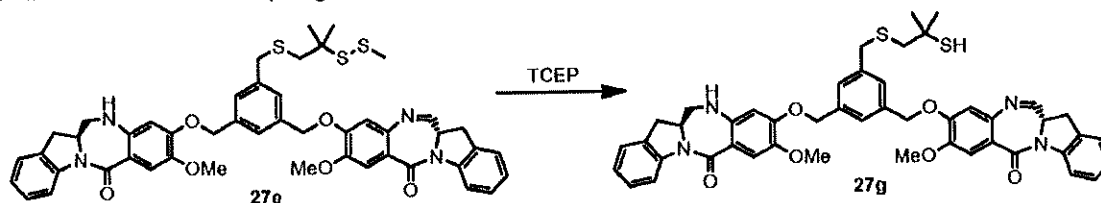
IBD monomero (177 mg, 0,602 mmol) in N, N- dimetilformammide anidra (1,75 mL) è stato aggiunto a (5- ((2-metil-2-(metildisolfanil) propiltio) metil) -1,3- fenilene)bis(metilen) dimetansolfonato (119 mg, 0,251mmol) a temperatura ambiente. Carbonato di potassio (173 mg, 1,253 mmol) è stato aggiunto e la reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 20 ore. La miscela di reazione è stata spenta con acqua ed estratta con diclorometano. Gli estratti organici sono stati lavati con salamoia, essiccati con solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati sotto vuoto spinto. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash su gel di silice (netto DCM 2% MeOH/DCM). Le frazioni contenenti il prodotto sono state combinate, concentrate e purificate con RP-HPLC semi-prep. (C18, A=DI acqua B=ACN, 20 mL/min.). Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state combinate ed estratte con diclorometano, essiccate con solfato di magnesio anidro, filtrate e concentrate a dare il composto desiderato (46 mg, 21%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,19 (d, *J*= 8,0 Hz, 2H), 7,77 (m, d, *J*= 4,4 Hz, 2H), 7,50 (s, 2H), 7,34 (s, 1H), 7,31 (s, 2H), 7,19 (m, 4H), 7,03 (t, *J*= 7,2, 7,6 Hz, 2H), 6,77 (s, 2H), 5,14 (m, 4H), 4,40 (m, 2H), 3,91 (s, 6H), 3,70 (m, 2H), 3,63 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 2,65 (s, 2H), 2,29 (s, 3H), 1,26 (s, 6H). MS (m/z) calcolato 893,2 (M+Na)<sup>+</sup>; trovato 893., (M + Na)<sup>+</sup>, 911,2 (M +

$\text{H}_2\text{O} + \text{Na})^+$ , 929,2 ( $\text{M} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na})^+$ , 945,1 ( $\text{M} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{K})^+$ . Si veda la FIG. 30.



*Composto 27e e 27f:*

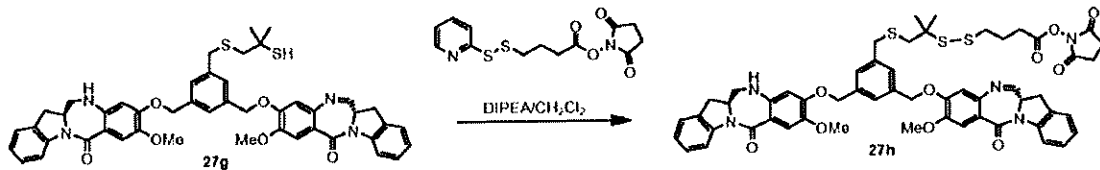
A una soluzione raffreddata (0 °C) di 27d (50 mg, 0,057 mmol) in diclorometano anidro (225  $\mu\text{L}$ ) ed etanolo (450  $\mu\text{L}$ ) è stato aggiunto boridruro di sodio (0,651 mg, 0,017 mmol). La reazione è stata agitata per cinque minuti a 0 °C, quindi a temperatura ambiente per 2,5 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a 0 °C, spenta con cloruro di ammonio saturo ed estratta con diclorometano. Gli estratti organici sono stati lavati con salamoia, essiccati su solfato di sodio anidro, filtrati attraverso celite e concentrati. Il materiale grezzo è stato purificato mediante RP-HPLC semi-prep. (C18, A=DI acqua B=ACN, 20 mL/min.). Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state combinate ed estratte con diclorometano, essiccate con solfato di magnesio anidro, filtrate e concentrate a dare l'ammina mono-ridotta 27e (11 mg, 22%) MS (m/z), calcolato 895,3 ( $\text{M}+\text{Na})^+$  trovato 895,2 ( $\text{M} + \text{Na})^+$ , 913,2 ( $\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{Na})^+$ , 929,2 ( $\text{M} + \text{H}_2\text{O} + \text{K})^+$  e l'ammina di-ridotta 27f (5 mg, 10%) MS (m/z), calc. 897,3 ( $\text{M}+\text{Na})^+$ , rilevato 897,3 ( $\text{M} + \text{Na})^+$ . Si veda la FIG. 30.



*Composto 27g:*

A una soluzione agitata di 27e (10 mg, 0,011 mmol) in metanolo (733  $\mu\text{L}$ ) e acetonitrile (880  $\mu\text{L}$ ) è stato aggiunto tris(2-carbossietil) fosfina cloridrato (9,85 mg, 0,034 mmol) in tampone 6,5 (147  $\mu\text{L}$ ). La miscela è stata agitata per 3 ore a temperatura ambiente. La reazione è stata diluita con diclorometano. È stata aggiunta acqua, e gli strati sono stati separati. Lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato a

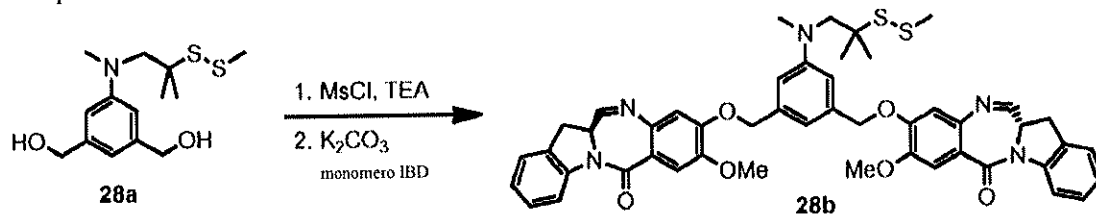
pressione ridotta a dare il composto 27g (9 mg, 95%). MS (m/z) calcolato 849,3 (M+Na)<sup>+</sup>; rilevato 849,2 (M + Na)<sup>+</sup>, 867,2 (M + K)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 30.



*Composto 27h:*

- 5 A una soluzione agitata di 27g (9 mg, 10.88  $\mu\text{mol}$ ) e 2,5-diossopirrolidin-1-ile 4-(piridin-2-idilsolfanil)butanoato (9,3 mg, 0,023 mmol) in diclorometano anidro (0,4 mL) è stata aggiunta diisopropiletilammmina (9 nL, 0,054 mmol) e la reazione è stata miscelata per una notte a temperatura ambiente. La miscela è stata spenta con soluzione di cloruro di ammonio saturo ed estratta con diclorometano. Gli estratti sono stati lavati con salamoia, essiccati con solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante HPLC preparativa in fase inversa
- 10 (colonna C18,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ). Le frazioni contenenti il prodotto sono state combinate, estratte con diclorometano ed evaporate a dare il composto 27h (5 mg, 44%). MS (m/z) calcolato 1064,3 (M + Na)<sup>+</sup>; rilevato 1064,1 (M + Na)<sup>+</sup>, 1082,1 (M + H<sub>2</sub>O + Na)<sup>+</sup>, 1098,1 (M + H<sub>2</sub>O + K)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 30.

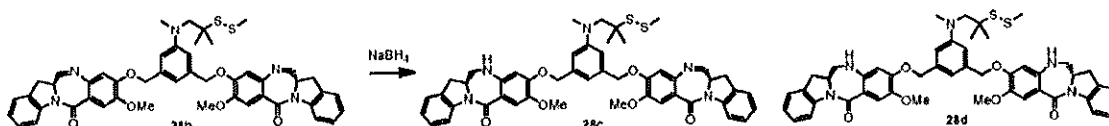
15 Esempio 17



*Composto 28b:*

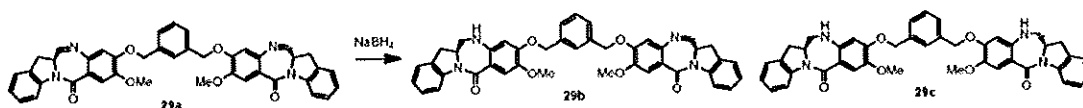
(5-(metil(2-metil-2-(metildisolfanil)propil)ammino)-1,3-fenilene)dimetanolo (52 mg, 0,172 mmol) è stato  
 dissolto in diclorometano anidro (1,7 mL) e raffreddato a -5 in un bagno di acetone/ghiaccio. Innanzitutto, è stata  
 addizionata trietilammia (0,120 mL, 0,862 mmol) seguita da metansolfonil cloruro (0,040 mL, 0,517 mmol). La miscela  
 è stata agitata nel bagno per 1 ora. La reazione è stata quindi diluita con etil acetato freddo e lavata tre volte con acqua  
 5 fredda, dopo di che è stata essiccata su solfato di magnesio anidro. Il dimetilato è stato filtrato, concentrato sotto vuoto e  
 collocato sotto vuoto spinto fino a completa essiccazione. Il prodotto è stato utilizzato direttamente nel passaggio  
 successivo.

Il monomero IBD (115 mg, 0,39 mmol) in N,N-dimetilformaldeide anidro (1,5 mL) è stato aggiunto a (5-  
 (metil(2-metil-2-(metilsolfanil)propil)ammino)-1,3-fenilene)bis(metilene) dimetansolfonato (72 mg, 0,156 mmol) a  
 10 temperatura ambiente. Carbonato di potassio (108 mg, 0,780 mmol) è stato aggiunto e la reazione è stata lasciata agitare  
 a temperatura ambiente per 20 ore. È stata aggiunta acqua (10 mL) direttamente alla miscela sotto agitazione, con  
 conseguente formazione di un precipitato bianco. La miscela è stata filtrata e i solidi sono stati lavati con porzioni  
 aggiuntive d'acqua. Il solido è stato quindi dissolto in diclorometano, estratto con acqua, lo strato organico è stato quindi  
 essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato sotto vuoto, a dare il composto 28b (104 mg, 78%) che è stato  
 15 usato nel passaggio successivo senza ulteriore trattamento. MS (m/z), riscontrato 912,1 (M + 2H<sub>2</sub>O + Na). Si veda la FIG.  
 31.



cloruro di ammonio saturo e diclorometano, separata e lo strato organico è stato lavato con soluzione salina, essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato nel vuoto. Il residuo è stato purificato mediante RP-HPLC semi-prep. (C18, A=DI acqua B=ACN, 20 mL/min.). Le frazioni contenenti i prodotti desiderati sono state estratte con diclorometano e concentrate a dare la mono-immina 28c (19 mg, 32%) MS (m/z), atteso: 855,1, riscontrato: 896,2 (M + H<sub>2</sub>O + Na) e l'ammina di-ridotta 28d (22 mg, 38%) MS (m/z), atteso: 857,1, riscontrato: 880,2 (M + Na)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 31.

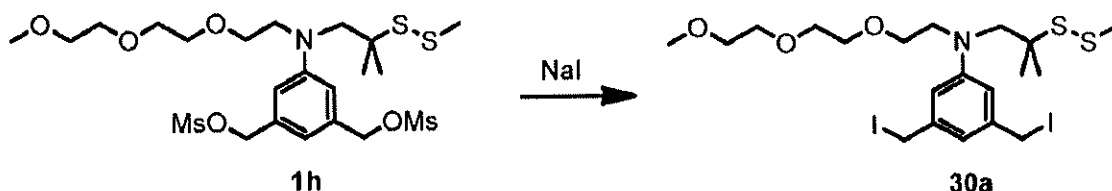
Esempio 18



Composto 29b e 29c:

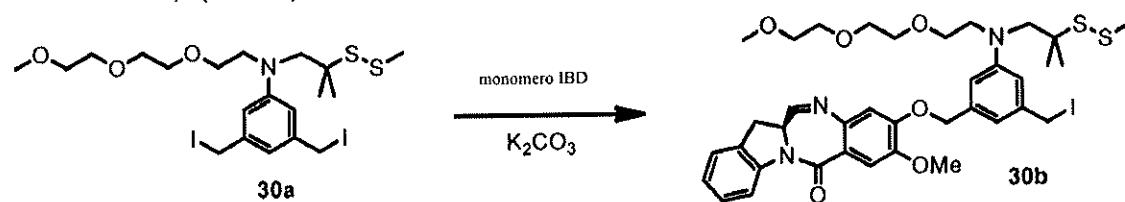
Il composto 29a (60 mg, 0,043 mmol) è stato dissolto in una miscela di diclorometano anidro (0,25 mL) ed etanolo (0,5 mL) e raffreddato a 0 °C in un bagno di ghiaccio. Successivamente è stata aggiunta una soluzione di boroidruro di sodio (0,493 mg, 0,013 mmol) dissolto in etanolo (50 µL), la miscela è stata agitata per 5 minuti ed è stato rimosso il bagno di ghiaccio. La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 3 ore, spenta a bassa temperatura con l'aggiunta di cloruro di ammonio saturo e diclorometano, separata e lo strato organico è stato lavato con soluzione salina, essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato nel vuoto. Il residuo è stato purificato mediante RP-HPLC semi-prep. (C18, A=DI acqua B=ACN, 20 mL/min.). Le frazioni contenenti i prodotti desiderati sono state estratte con diclorometano e concentrate a dare la mono-immina 29b (20 mg, 33%), MS (m/z), atteso: 715,7, riscontrato: 715,2 (M + Na)<sup>+</sup>, 733,2 (M + H<sub>2</sub>O + Na)<sup>+</sup>, 749,2 (M + H<sub>2</sub>O + K)<sup>+</sup> e l'ammina di-ridotta 29c (12 mg, 20%) MS (m/z), atteso: 694,7, riscontrato: 717,2 (M + Na)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 32.

Esempio 19



*Composto 30a:*

(5-((2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)(2-metil--2(metildisolfanil)propil)ammino)-1,3-fenilene)bis(metilen)dimetansolfonato (0,566 g, 0,960 mmol) è stato dissolto in acetone (30 mL) e una soluzione di ioduro di sodio (0,544 g, 3,63 mmol) dissolto in acetone (2 mL) è stata addizionata con vigorosa agitazione. La reazione è stata monitorata via tlc (50% di etil acetato in esano) e, dopo 2 ore, la reazione è stata filtrata, concentrata sotto vuoto e al residuo è stato aggiunto diclorometano. Il sale solido lasciato indietro è stata filtrata, il filtrato è stato concentrato, e il residuo risultante è stato purificato su gel di silice usando una miscela 3: 5:2 miscela di etil acetato: esano:diclorometano, che fornisce un 3,5-bis(iodometil) -N-( 2- (2- (2 -metossietossi)etossi) etil) -N-( 2 -metil-2-(metildisolfanil) propil) anilina (0.505 g, 0.773mmol, 74,5% di resa) sotto forma di un olio giallo. <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,75 (s, 2H), 6,73 (s, 1H), 4,38 (s, 4H), 3,63 (m, 14H), 3,40 (s, 3H), 2,50 (s, 3H), 1,38 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 148,7, 140,3, 117,3, 113,4, 71,9, 70,7, 70,6, 67,2, 59,8, 59,1, 53,5, 53,4, 51,8, 26,5, 25,6, 6,11; MS (m/z, calc. 676,0 (M + Na)<sup>+</sup>; riscontrato 675,8 (M + Na)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 33.



**15** *Composto 30b:*

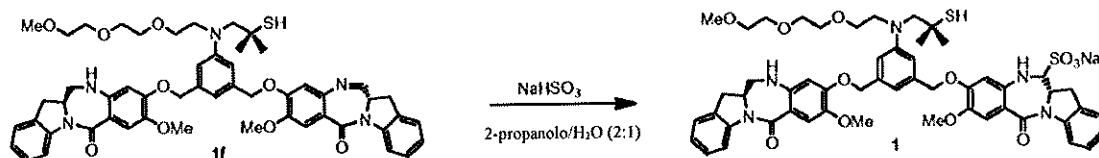
IBD Monomero (0,060 g, 0,204mmol) è stato dissolto in acetone (4 ml) in una piccola fiala, è stata aggiunta una

barra di agitazione, seguito da 3,5-bis(iodometil) -N-( 2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisolfanil)propil)anilina (0,209 g, 0,255 mmol) e carbonato di potassio (0,070 g, 0,510 mmol). La fiala è stata tappata e agitata a temperatura ambiente per una notte. I solidi sono stati filtrati e il filtrato è stato concentrato. Il residuo è stato dissolto in diclorometano, estratto con acqua, e lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato sotto vuoto, ottenendo 108 mg di materiale grezzo. Il materiale grezzo è stato purificato su gel di silice usando etil acetato 30% allo scopo di rimuovere il di-iodo dal materiale di partenza, seguito da metanolo 10% in diclorometano, dando il prodotto desiderato 30b (21 mg, 0,026 mmol, 13%). MS (m/z), previsto: 819,1, riscontrato: 858,0 (M + K)<sup>+</sup>, 890,0 (M + CH<sub>3</sub>OH + K)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 33.

*Composto 1d:*

10 Il monomero ridotto 3b (4,16 mg, 0,014mmol) è stato dissolto in acetone (2 ml) in una piccola fiala, è stata aggiunta una barra di agitazione, seguita da 30b (10 mg, 0,012 mmol) e carbonato di potassio (4,21 mg, 0,030 mmol). La fiala è stata tappata e agitata a temperatura ambiente per una notte. La reazione è stata concentrata per rimuovere l'acetone, quindi nuovamente dissolta in diclorometano, estratta con acqua, essiccata su solfato di sodio anidro, filtrata e concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato purificato mediante HPLC in fase inversa C18 per ottenere 1d (2,1 mg, 2,125 μmol, 17,42% di resa). MS (m/z): riscontrato 1010,4 (M + Na)<sup>+</sup>, 1028,4 (M + H<sub>2</sub>O + Na)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 33.

Esempio 20 Sintesi del Composto 1



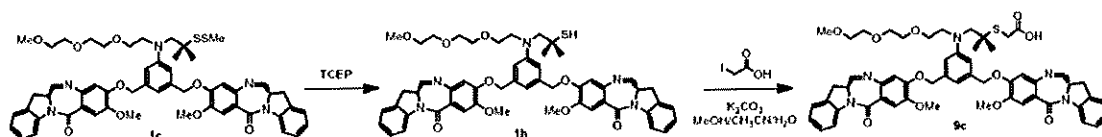
*Composto 1:*

20 A una soluzione agitata di 1f (226 mg, 0,24 mmol) in IPA (20 mL) e acqua deionizzata (10 mL) è stato aggiunto bisolfito di sodio (50 mg, 0,48 mmol). La miscela è stata agitata vigorosamente a temperatura ambiente per 2 ore. È stato congelato con ghiaccio secco/acetone e liofilizzato. Il solido bianco soffice ottenuto è stato dissolto in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O e

purificato mediante HPLC a fase inversa (colonna C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O). Le frazioni contenenti il prodotto desiderato sono state combinate, congelate con ghiaccio secco/acetone e liofilizzate a dare il composto 1 desiderato come solido bianco soffice (179,6 mg, r = 71,6%). MS (m/z): riscontrato 1022,0 (M - H)<sup>-</sup>. Si veda la FIG. 38.

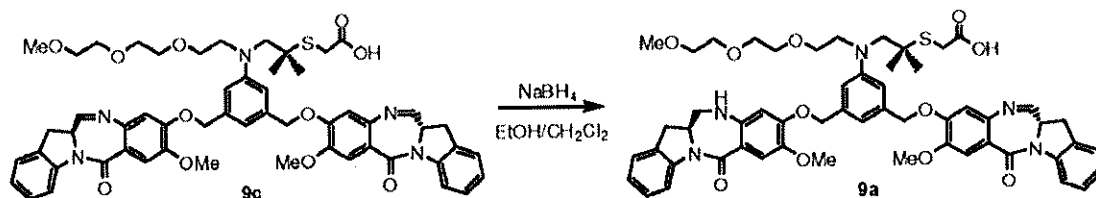
5

### Esempio 21 – Sintesi del composto 9c



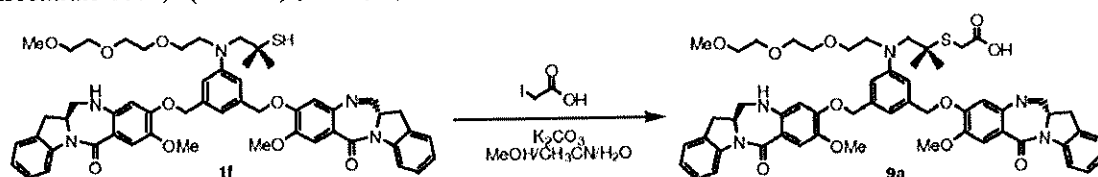
#### Composto 9c:

A una soluzione agitata del composto 1c (60 mg, 0,061 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (3 mL) è stata aggiunta una soluzione TCEP appena preparata (49 mg, 0,17 mmol di sale TCEP HCl sono stati neutralizzati con bicarbonato di sodio saturo a pH ~6,5, quindi diluiti con 0,5 mL di tampone fosfato a pH 6,5) a temperatura ambiente. È stata addizionata MeOH (2,5 mL) e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore. La miscela di reazione è stata diluita con diclorometano e acqua deionizzata, separata e lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrato. Il filtrato è stato concentrato e sottoposto a vuoto spinto a dare 60 mg di 1h come schiuma giallastra chiara. MS (m/z): riscontrato 940,1 (M + H)<sup>+</sup>. Esso è stato dissolto in metanolo (1,0 mL) e CH<sub>3</sub>CN (1,4 mL), seguito dall'aggiunta di acido iodoacetico (24 mg, 0,13 mmol), acqua deionizzata (0,1 mL) e carbonato di potassio (27 mg, 0,19 mmol). La miscela è stata agitata a t.a. per una notte (monitorata mediante LCMS). È stata spenta con cloruro di ammonio saturo per rendere la soluzione acida, quindi diluita con diclorometano, separata e lavata con salamoia, essiccata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrata e strippata, ottenendo il composto 9c (57,8 mg, r = 91%) che è stato direttamente usato per il passaggio successivo senza purificazioni. MS (m/z): riscontrato 998,1 (M + H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 12A.



Composto 9a:

A una soluzione agitata di composto 9c (57,8 mg, 0,058 mmol) in diclorometano anidro (0,2 mL) ed etanolo assoluto (0,6 mL) è stato aggiunto  $\text{NaBH}_4$  (2,5 mg, 0,066 mmol) a 0 °C. Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore e quindi spenta con cloruro di ammonio saturo, diluita con diclorometano, separata e lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e filtrato attraverso celite e concentrato. Il residuo è stato purificato mediante HPLC a fase inversa (colonna C18,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ). Le frazioni di prodotto sono state estratte con diclorometano e concentrate a dare il composto 9a (13,0 mg, r = 22%). MS (m/z), riscontrato 1000,0 ( $\text{M} + \text{Na}$ )<sup>+</sup>, 1015,9 ( $\text{M} + \text{H}_2\text{O} - \text{H}$ ). Si veda la FIG. 12A.

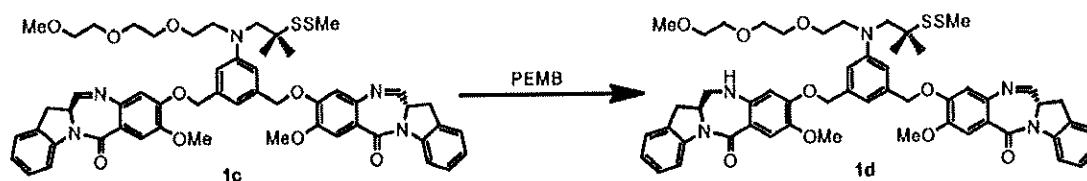


Composto 9a:

Ad una soluzione del tiolo libero 1f (45 mg, 0,048 mmol) e acido iodoacetico (18 mg, 0,096 mmol) in metanolo (1,0 mL) e  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1,4 mL) sono stati aggiunti acqua deionizzata (0,1 mL) e carbonato di potassio (20 mg, 0,14 mmol). La miscela è stata agitata a t.a. per una notte (monitorata mediante LCMS). È stata spenta con cloruro di ammonio saturo per rendere la soluzione acida, quindi diluita con diclorometano, separata e lavata con salamoia, essiccata su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrata e strippata. Il residuo è stato purificato mediante HPLC preparativa a fase inversa (C18,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ). Le frazioni di prodotto puro (basate su MS) sono state estratte con diclorometano e concentrate per ottenere l'acido desiderato

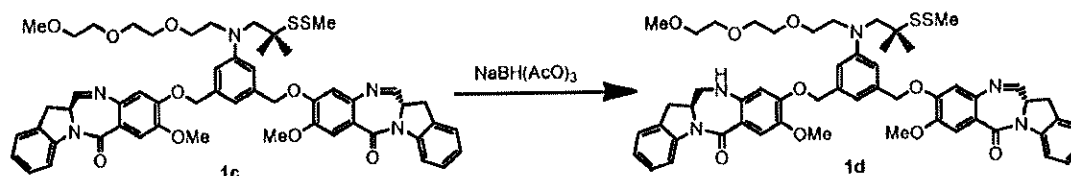
9a (18 mg, r= 38%). MS (m/z): riscontrato 1000,1 (M + H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 12B.

Esempio 22 Sintesi del composto 1d



*Composto 1d:*

- 5 Ad una soluzione agitata del composto 1c (178 mg, 0,18 mmol), in diclorometano anidro (1,2 mL) ed etanolo assoluto o metanolo anidro (0,1 mL) è stata aggiunto 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB, 0,017 mL, 0,11 mmol) a gocce. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora e spenta con acido formico 88%. È stata basificata con NaHCO<sub>3</sub> e diluita con diclorometano, separata, e lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrato attraverso celite e strappato. Il residuo è stato disciolto in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/88% HCOOH (5:1:0,05) e
- 10 purificato mediante HPLC (C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) a fase inversa. Le frazioni contenenti il prodotto puro sono state estratte con diclorometano e concentrate a dare il composto 1d (56 mg, r = 31%). MS (m/z): riscontrato 988,1 (M + H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 39.

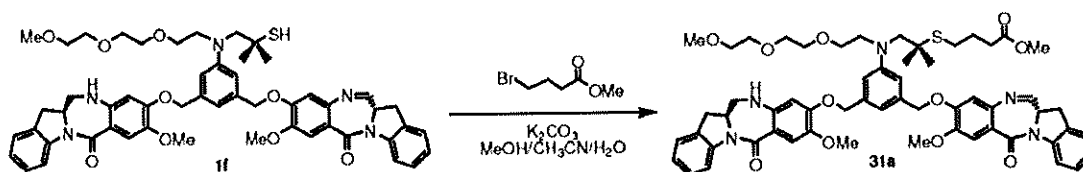


*Composto 1d:*

- 15 A una soluzione agitata di composto 1c (71 mg, 0,072 mmol) in 1,2-diclorometano anidro (0,8 mL) è stato aggiunto triacetossiboroidruo di sodio (14 mg, 0,65 mmol). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore e quindi spenta con NaHCO<sub>3</sub> saturo, diluita con diclorometano, separata e lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrato attraverso celite e concentrato. Il residuo è stato disciolto in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/88%

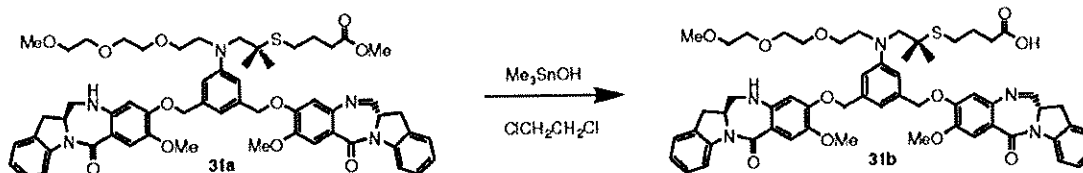
HCOOH (5:1:0,05) e purificato mediante HPLC (C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O) a fase inversa. Le frazioni contenenti il prodotto puro sono state estratte con diclorometano e concentrate a dare il composto 1d (17 mg, r = 24%). MS (m/z): riscontrato 988,1 (M + H)<sup>+</sup>. Anche il materiale di partenza non reagito 1c è stato recuperato (24 mg, r = 34%). Si veda la FIG. 40.

Esempio 23 Sintesi del composto 31c



Composto 31a:

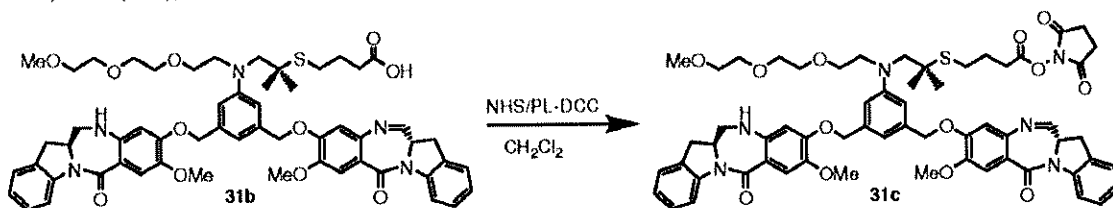
10 A una soluzione del composto 1f (57,8 mg, 0,061 mmol) e metil 4-bromobutirato (22 mg, 0,12 mmol) in metanolo (1,0 mL) e CH<sub>3</sub>CN (1,0 mL) sono stati aggiunti acqua deionizzata (0,1 mL) e carbonato di potassio (17 mg, 0,12 mmol). La miscela ha continuato a essere agitata a temperatura ambiente per una notte, è stata spenta con cloruro di ammonio saturo e diluita con diclorometano, separata e lavata con soluzione salina, essiccata su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrata e concentrata. Il residuo è stato purificato mediante HPLC preparativa in fase inversa (C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O), ottenendo il prodotto desiderato 31a (14 mg, r = 22%) sotto forma di una schiuma di colore giallastro. MS (m/z): riscontrato 1042,1 (M + H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 41.



Composto 31b:

A una soluzione del metil estere 31a (14 mg, 0,013 mmol) in 1,2-dicloroetano anidro (1,5 mL) è stato aggiunto trimetilstagno idrossido (36 mg, 0,2 mmol). La miscela è stata agitata per una notte in un bagno d'olio a 80 °C fino a quando il materiale di partenza è stato consumato completamente. È stata raffreddata a temperatura ambiente, diluita con

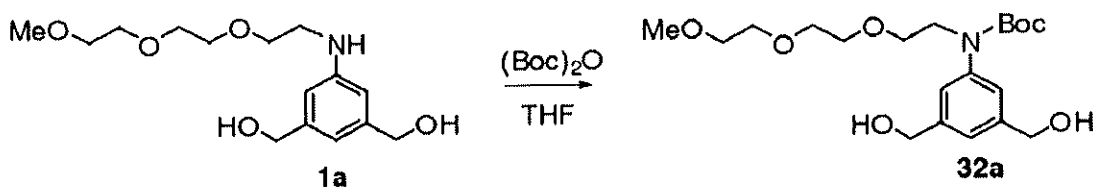
diclorometano, lavata con salamoia/gocce 5% HCl e salamoia, essiccata e filtrata. Il filtrato è stato concentrato e purificato mediante cromatografia su gel di silice (diclorometano/MeOH) a fornire 31b acido come solido giallastro (10,2 mg,  $y=74\%$ ). MS (m/z), riscontrato 1028,2 (M + H)<sup>+</sup>, 1044,1 (M + H<sub>2</sub>O - H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 41.



5 **Composto 31c:**

A una soluzione di 31b acido (10,2 mg, 0,0099 mmol) in diclorometano anidro (0,5 mL) sono stati aggiunti N-idrossiduccinimide (3,4 mg, 0,03 mmol) e PL-DCC (26 mg, 0,04 mmol, 1,55 mmol/g). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per una notte e filtrata per rimuovere la resina. La resina è stata lavata con diclorometano, quindi con etil acetato. Il filtrato è stato concentrato e il residuo purificato mediante HPLC a fase inversa (colonna C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O). Le frazioni contenenti il prodotto sono state combinate e liofilizzate a dare il composto l'estere NHS 31c come solido bianco (3,6 mg,  $r=32\%$ ). MS (m/z): riscontrato 1125,1 (M + H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 41.

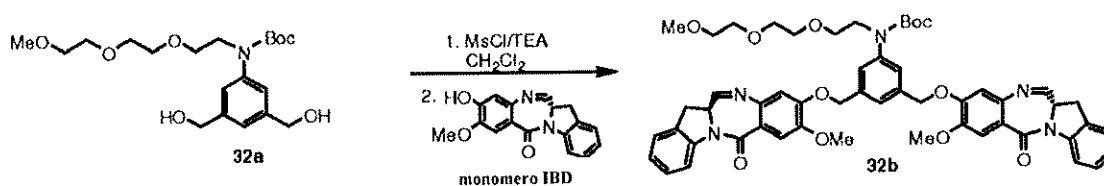
Esempio 24 Sintesi del composto 32c



15 **Composto 32a:**

A una soluzione agitata di anilina 1a (339 mg, 1,1 mmol) in tetraidrofurano anidro (4,0 mL) è stata aggiunta Boc anidride (272 mg, 1,2 mmol). La miscela è stata agitata continuamente a temperatura ambiente per tre giorni. La miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice

(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) per dare il composto 32a (405 mg, resa = 90%) come olio incolore. <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,00 (s, 2H), 6,97 (s, 1H), 4,38 (s, 4H), 4,12 (s, 2h), 3,64 (t, J = 5,6 Hz, 2H), 3,48-3,44 (m, 8H), 3,40-3,38 (m, 2H), 3,21 (s, 3H), 1,31 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 154,65, 142,3, 142,1, 124,1, 122,7, 80,2, 71,6, 70,3, 70,1, 69,9, 68,5, 63,9, 58,65, 49,4, 28,1. Si veda la FIG. 42.



5

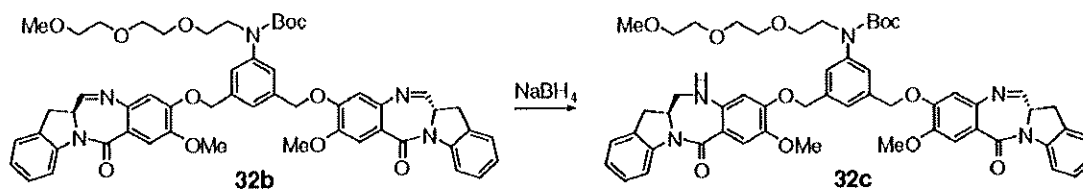
*Composto 32b:*

A una soluzione agitata del composto 32a (51 mg, 0,128 mmol) in diclorometano anidro è stata aggiunta trietilammina (0,053 mL, 0,383 mmol) a -5~-10°C. Metansolfonil cloruro (0,026 mL, 0,332 mmol) è stato poi lentamente aggiunto nel corso di 15 minuti con una siringa. La miscela è stata agitata a -5-10 °C per 1 ora (TLC, DCM/MeOH 10:1).

10 La reazione è stata spenta con ghiaccio/acqua, diluita con AcOEt freddo, separata e lo strato organico è stato lavato con acqua fredda, asciugato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MgSO<sub>4</sub> anidro, filtrato e concentrato. Il residuo è stato trasferito in una piccola fiasca da reazione con diclorometano, concentrato e sottoposto a vuoto spinto. Si è stato dissolto in DMF anidro (0,8 mL), seguito dall'aggiunta di IBD monomero (90 mg, 0,31 mmol) e potassio (53 mg, 0,38 mmol). La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. È stata diluita con diclorometano, lavata con salamoia, essiccata su solfato di sodio

15 anidro, filtrata e concentrata. Il residuo è stato purificato mediante HPLC in fase inversa (C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O), ottenendo il composto 32b (56 mg, 46%) sotto forma di un solido giallastro. <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,29 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,87 (d, J = 4,8 Hz, 2H), 7,60 (s, 2H), 7,38-7,36 (m, 3H), 7,33, 7,27 (m, 4H), 7,13 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 6,88 (s, 2H), 5,21 (dd, J<sub>1</sub> = 20,0 Hz, J<sub>2</sub> = 12,4 Hz, 4H), 4,49 (dt, J<sub>1</sub> = 11,2 Hz, J<sub>2</sub> = 4,0 Hz, 2H), 3,99 (s, 6H), 3,83 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,76-3,48 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 1,43 (s, 9H); MS (m/z): riscontrato 992,2 (M + H<sub>2</sub>O + Na)<sup>+</sup>, 1010,2 (M + 2H<sub>2</sub>O + Na)<sup>+</sup>.

20 Si veda la FIG. 42.



*Composto 32c:*

A una soluzione agitata del composto 32b (56 mg, 0,059 mmol) in diclorometano anidro (0,3 mL) ed etanolo assoluto (0,9 mL) è stato aggiunto NaBH<sub>4</sub> (2,7 mg, 0,07 mmol) a 0°C. Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore e quindi spenta con cloruro di ammonio saturo, diluita con diclorometano, separata, e lo strato organico è stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrato attraverso celite e strappato. Il residuo è stato purificato mediante HPLC a fase inversa (colonna C18, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O). Il materiale di partenza recuperato 32b pesava 12 mg, è stato nuovamente sottoposto alle condizioni di riduzione e purificato mediante HPLC a fase inversa. Tutte le frazioni contenenti il prodotto sono state estratte con diclorometano e concentrate a dare il composto 32c (20,7 mg, 37%) come un solido giallastro chiaro. MS (m/z): riscontrato 954,2 (M + H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 42.

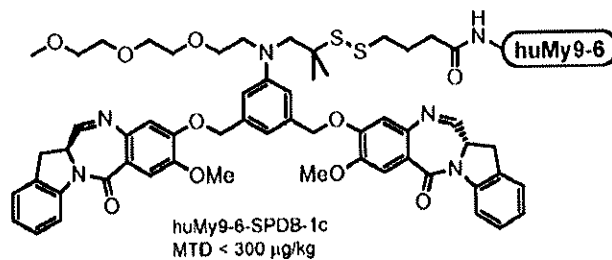
*Esempio 25*

La tollerabilità di huMy9-6 coniugati è stata esaminata in topi CD-1 femmine. Gli animali sono stati osservati per sette giorni prima dell'inizio dello studio e riscontrati privi di malattie. I topi hanno ricevuto in somministrazione una singola iniezione e.v. del coniugato e gli animali sono stati monitorati quotidianamente per quanto riguarda la perdita di peso corporeo, morbilità o mortalità. La tabella 10 mostra che il coniugato contenente huMy9-6-SPDB-1c di-immuna disolfuro è stato tollerato ad una dose minore di 300 µg/kg. Al contrario, i coniugati di mono-immuna disolfuro huMy9-6-SPDB-1f e huMy9-6-solfo-SPDB-1f sono risultati essere meglio tollerati con una dose massima tollerata di rispettivamente >729 µg/kg e <750 µg/kg.

Tabella 10. Dati di comparazione di tollerabilità per coniugati (A) huMy9-6-SPDB-1c, (B) huMy9-6-SPDB-1f, (C) huMy9-6-solfo-SPDB-1f e (D) huMy9-6-BMPS-1f.

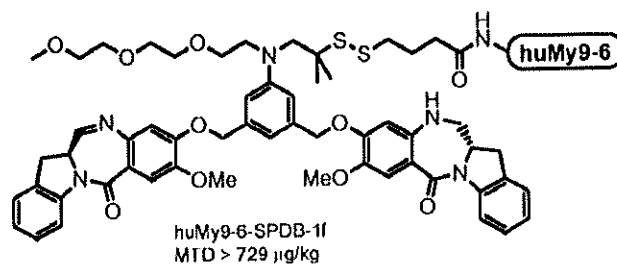
A)

Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	% di sopravvivenza
100	100
300	50
500	0
700	0



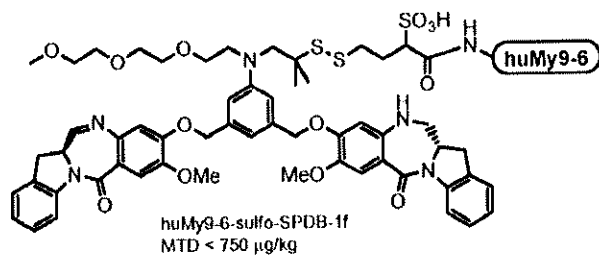
B)

Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	% di sopravvivenza
405	100
567	100
729	100



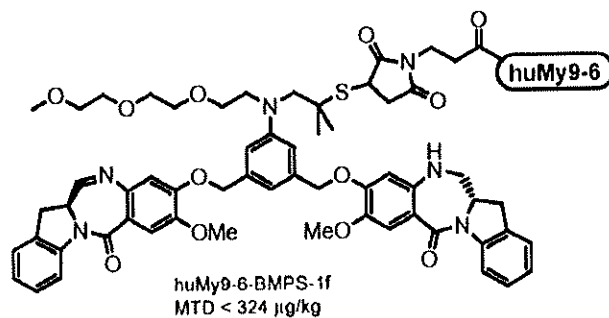
C)

Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	% di sopravvivenza
450	100
600	100
750	88
900	50

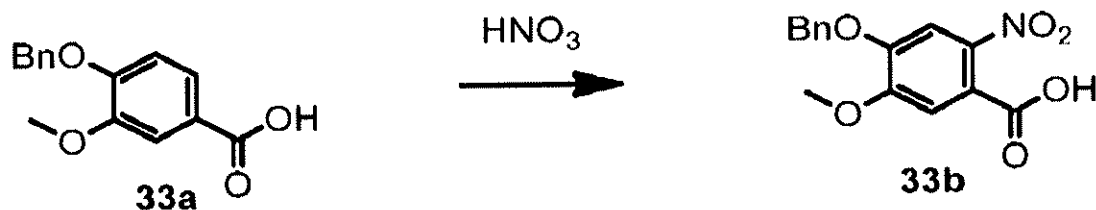


D)

Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	% di sopravvivenza
100	100
200	100
284	100
324	83
405	50



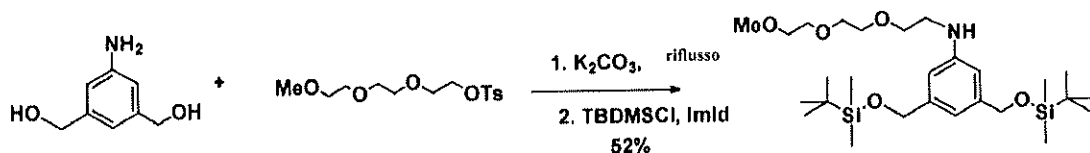
Esempio 26



*Composto 33b:*

Il composto 33a (20 g, 77 mmol) è stato aggiunto sotto forma di una sospensione densa in diclorometano anidro (100 mL) e raffreddato a 0°C. È stato aggiunto acido acetico (191 mL), producendo una soluzione limpida che è stata agitata a 0°C fino a raffreddarsi. Acido nitrico (26 mL, 581 mmol) è stata lentamente aggiunta a gocce, attraverso un imbuto di addizione. Il bagno ghiacciato è stato rimosso e la soluzione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente. Dopo 3 ore, la reazione è stata diluita con acqua deionizzata ed estratta con diclorometano. Lo strato organico è stato lavato con salamoia ed essiccato su solfato di magnesio anidro e il filtrato è stato concentrato nel vuoto. Il residuo grezzo è stato ricristallizzato usando etilacetato ed esani. Il solido è stato filtrato e lavato con esani, ottenendo il composto 33b sotto forma di un solido soffice di colore giallo (13,8 g, r = 59%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,48-7,43 (m, 6H), 7,25 (s, 1H), 5,25 (s, 2H), 4,02 (s, 3H), MS (m/z): 326,1 (M + Na)<sup>+</sup>. Si veda la Figura 45.

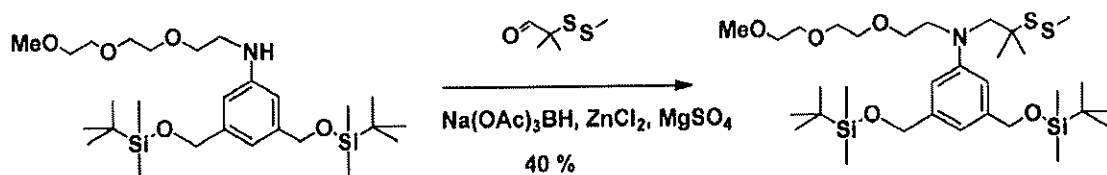
*Esempio 27*



*3,5-bis((terz-butilmethylsilyl)ossimetil)-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)anilina:*

Una miscela di (5-ammino-1,3-fenilene)dimetanolo (11,78 g, 77 mmol), 2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil 4-metilbenzenesolfonato (15,3 g, 48,1 mmol) e carbonato di potassio (13,28 g, 96 mmol) in DMF (96 mL) è stata messa a riflusso per 20 ore. La reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e diluita in diclorometano. La miscela è stata

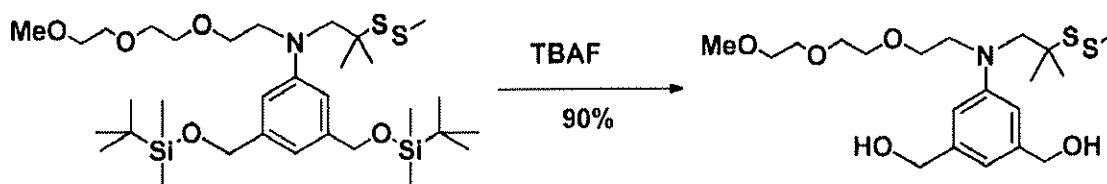
filtrata attraverso celite e concentrata sotto vuoto. L'olio arancione risultante è stato dissolto in diclorometano (240 ml) e sono stati aggiunti t-butildimetilsilil cloruro (18.09 g, 120 mmol) e imidazolo (9,80 g, 144 mmol). La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 20 ore, quindi diluita con diclorometano e filtrata attraverso celite. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice (EtOAc/esano) ha reso 3,5-bis(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil) anilina (13g, 52%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6.52 (s, 1H), 6.40 (s, 2H), 4.56 (s, 4H), 3.60 (t, 2H, J = 5.2 Hz), 3.56 (m, 6H), 3.46 (m, 2H), 3.29 (s, 3H), 3.20 (t, 2H, J = 5.2 Hz), 0.84 (s, 18H), 0.00 (s, 12H). MS (m/z): riscontrato 550,1 (M + H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 46.



10 *3,5-bis(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisolfanil)propil)anilina:*

A una soluzione di 3,5-bis(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)anilina (6,7 g, 12.69 mmol) in 1,2-dicloroetano anidro (50 ml) è stato aggiunto 2-(metilditio)isobutirraldeide (2,74 ml, 19.04 mmol), triacetossiboroidruo di sodio (2.8g, leq), zinco(II) cloruro (0,865 g, 6,35 mmol) e solfato di magnesio (2.292 g, 19.04 mmol). La miscela è stata agitata per 5 ore a temperatura ambiente. È stato addizionato triacetossiboroidruo di sodio (2,8 g, leq). La reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per 20 ore. La miscela è stata filtrata attraverso celite, lavata con diclorometano e concentrata a pressione ridotta, quindi estratta con etil acetato e acqua. Gli estratti organici sono stati lavati con salamoia, essiccati su solfato di magnesio, filtrati, concentrati e purificati mediante combiflash (EtOAc/esano), ottenendo un 3,5-bis(((terz-butildimetilsilil)ossi)metil)-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisolfanil)propil)anilina (3,5g, 40%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,73 (s, 2H), 6,59 (s, 1H), 4,56 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,30 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 1,28 (s, 6H), 0,84 (s, 18H), 0,00 (s, 12H). MS (m/z): riscontrato 684,2 (M + H)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 46.

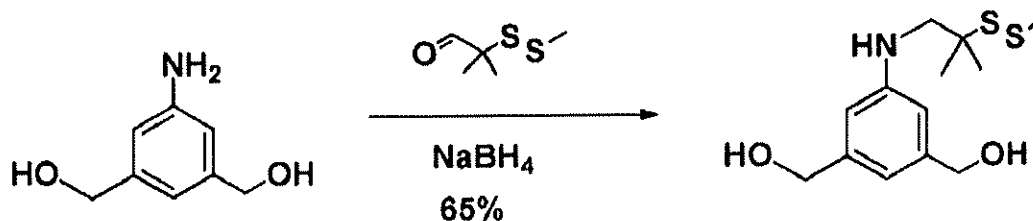
15  
20



*(5-((2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)(2-metil-2-(metildisolfanil)propil)ammino)-1,3-fenilene)dimetanolo (1b):*

Fluoruro di tetrabutylammonio (1 M in THF) (10,57 ml, 10,57 mmol) è stato aggiunto a gocce ad una soluzione sotto agitazione di 3,5-bis(((terz-butildimetilsilil)ossi) metil)-N-(2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)-N-(2-metil-2-(metildisolfanil)propil)anilina (3,5 g, 5,29 mmol) in THF anidro (65 ml) a 0 °C in un bagno di ghiaccio. Dopo l'aggiunta, la miscela è stata agitata a temperatura ambiente per due ore. La miscela è stata spenta con cloruro di ammonio saturo ed estratta con etilacetato. Gli estratti sono stati lavati con acqua e salamoia, essiccati su solfato di magnesio, filtrati e concentrati a pressione ridotta. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice (MeOH/DCM) ha reso *(5-((2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)(2-metil-2-(metildisolfanil)propil)ammino)-1,3-fenilene)dimetanolo* (2 g, 87%). <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDC13): δ 6,76 (s, 2H), 6,63 (s, 1H), 4,55 (s, 4H), 3,65-3,51 (m, 14H), 3,35 (s, 3H), 2,44 (s, 3H), 1,33 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (400 Hz, CDC13): δ 149,0, 142,35, 114,0, 111,1, 71,98, 70,7, 70,6, 70,5, 67,6, 65,5, 59,75, 59,1, 53,9, 51,9, 26,6, 25,7, 20,75; MS (m/z): riscontrato 456,2 (M + Na)<sup>+</sup>. Si veda la FIG. 46.

Esempio 28

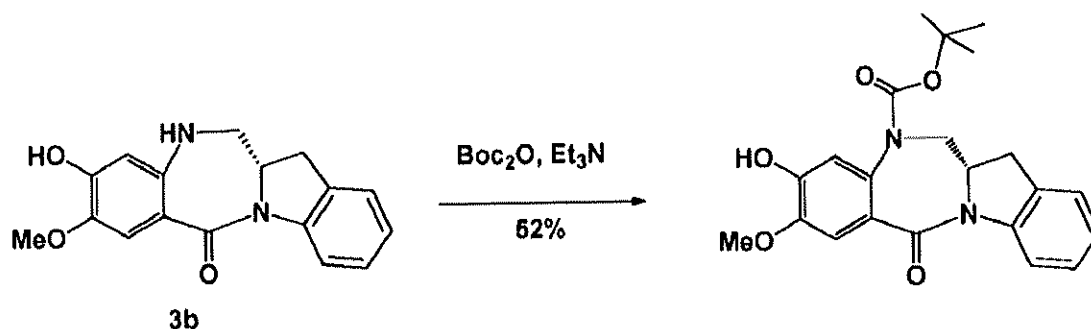


*(5-(2-metil-2-(metildisolfanil)propilammino)-1,3-fenilene)dimetanolo:*

*(5-ammino-1,3-fenilene)dimetanolo* (2,5 g, 16.32 mmol) e 2-(metilditio)isobutirraldeide (2.347 ml, 16.32 mmol) sono stati agitati a temperatura ambiente in etanolo assoluto (82 ml) fino a quando non si sono completamente dissolti (3

ore). La miscela è stata raffreddata a 0 °C in un bagno di ghiaccio ed è stata addizionata con boroidruo di sodio (0,741 g, 19,59 mmol). La reazione è stata agitata per 1 ora a 0 °C, e successivamente è stata lentamente spenta con una soluzione fredda di HCl 5%. La miscela è stata diluita con diclorometano, e il pH è stato regolato su pH=8 con una soluzione satura di bicarbonato di sodio e quindi estratta con diclorometano e poi lavata con salamoia. Gli estratti organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati sotto pressione ridotta. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice (MeOH/DCM) ha reso (5-(2-metil-2-(metildisolfanil)propilammino)-1,3-fenilene)dimetanolo (3 g, 65%) sotto forma di un solido bianco. <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 6,62 (s, 1H), 6,54 (s, 2H), 4,53 (s, 4H), 3,13 (s, 2H), 2,30 (s, 3H), 1,32 (s, 6H). Si veda la FIG. 47.

Esempio 29



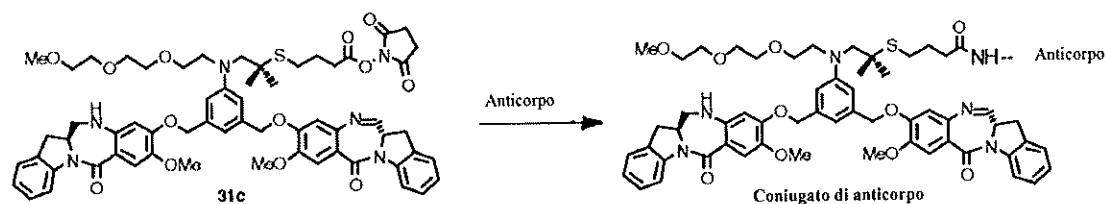
*terz-butil-9 idrossi-8-metossi-6-osso-12a,13-diidro-6H-benzo[5,6] [1,4] diazepino[1,2-a]indolo-11(12H)-carbossilato:*

A una soluzione di 9-idrossi-8-metossi-11,12,12a,13-tetraidro-6H-benzo[5,6][1,4]diazepino [1,2-a]indol-6-one 3b (0,3 g, 1,012 mmol) in metanolo (5,06 ml) sono stati aggiunti di-terz-butil bicarbonato (0,265 g, 1,215 mmol), trietilammina (0,212 ml, 1,519 mmol) e DMAP (6,18 mg, 0,051 mmol). Dopo 5 giorni di agitazione a temperatura ambiente, la miscela di reazione è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato ridissolto in diclorometano e filtrato su celite. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice (20% EtOAc/DCM) ha reso terz-butil 9-idrossi-8-metossi-6-osso-12a,13-diidro-6H-benzo [5,6] [1,4] diazepino [1,2-a] indolo-11(12H)-carbossilato (0,21 g, 52%) sotto forma di un solido bianco. <sup>1</sup>H NMR (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,25 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 7,18 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,11 (d, J =

7,2Hz, 1H), 6,98 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 6,39 (s, 1H), 4,37 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,42 (m, 3H), 2,74 (dd, J = 3,6, 16,4 Hz, 1H), 1,47 (s, 9H). Si veda la FIG. 48.

Esempio 30

Preparazione e sperimentazione di huMy9-6-31c



5

Una reazione contenente 2,0 mg/mL di anticorpo huMy9-6 e 5 equivalenti molar del composto 31c (pretrattati con una quantità 5 volte maggiore di bisolfito di sodio in DMA:acqua 90:10) in tampone HEPES (4-(2-idrossietil)-1-piperazina acido etansolfonico) 50 mM, pH 8,5 e cosolvente DMA (N,N-dimetilacetamide) 10% v/v è stata lasciata reagire per 6 ore a 25 °C. Dopo la reazione, il coniugato è stato purificato e il tampone sostituito con glicina 250 mM, istidina 10 mM, saccarosio 1%, Tween-20 0,01%, tampone formulato con bisolfito di sodio 50 µM, di tampone di formulazione di bisolfito di sodio, pH 6,2, utilizzando colonne di dissalazione NAP (Illustra Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare). La dialisi è stata effettuata nello stesso tampone per 4 ore a temperatura ambiente utilizzando cassette di dialisi Slide-a-Lyzer (ThermoScientific 20.000 MwCO).

15 Il coniugato purificato ha mostrato di possedere una media di 3,1 molecole di IGN legate all'anticorpo (via UV-Vis usando i coefficienti di estinzione molare  $\epsilon_{330 \text{ nm}} = 15,484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  e  $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30,115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  per 1, e  $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 207,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  per l'anticorpo My9-6), 98% di monomero (mediante cromatografia di esclusione dimensionale), < 0,2 % di farmaco non coniugato (mediante analisi HPLC in fase inversa in doppia colonna) e una concentrazione proteica finale di 0,4 mg/ml.

20 Le misurazioni di potenza *in vitro* dei coniugati di huMy9-6 con 31c in due differenti carichi di farmaco sono state riportate sotto. Entrambi i coniugati erano molto potenti nei confronti di cellule HL60-QC antigene-positive, con valori di  $\text{IC}_{50}$  tra 1,3-1,8 pM. Il blocco dell'antigene con huMy9-6 non coniugato 1 µM ha significativamente ridotto la

potenza, dimostrando la specificità antigenica dell'effetto citotossico.

Coniugato huMy9-6-31c	IC <sub>50</sub> (pM)	IC <sub>50</sub> (pM) huMy9-6 bloccante	Finestra di specificità
3,1 IGN/Ab	1,8	940	522
3,9 IGN/Ab	1,3	790	608

Esempio 31

*Efficacia in vivo di vari coniugati in topi nudi portatori di un tumore*

In questo studio, l'attività anti-tumorale di diversi coniugati dell'invenzione viene esaminata in topi immunocompromessi (nudi o SCID), preferibilmente topi nudi femmine, portatori di vari tumori. In alcuni casi, in aggiunta o in alternativa, possono essere impiegati ratti nudi. I coniugati che devono essere valutati comprendono uno o più qualsiasi dei coniugati descritti in questa sede. Le varie linee di cellule tumorali che possono essere usate per inoculare i topi nudi includevano HL60/QC, MOLM-13, NB4, HEL92.1.7, OCI-AML3, KB, e/o qualsiasi altra linea cellulare tumorale riconosciuta nel ramo come modello adeguato per un'indicazione patologica (ad esempio un cancro). Alcuni criteri che possono essere applicati per la selezione di linee cellulari tumorali adatte per la valutazione *in vivo* comprendono: a) l'espressione dell'antigene bersaglio sulla cellula tumorale, e, b) la sensibilità delle cellule tumorali al farmaco non coniugato *in vitro*. Ad esempio, uno screening di sensibilità su linea cellulare *in vitro*, come lo screening su linea cellulare 60 descritto dal National Cancer Institute statunitense (vedere Voskoglou-Nomikos et al., 2003, Clinical Cancer Res. 9: 42227-4239), può essere usato quale guida per determinare i tipi di cancro che possono essere adatti al trattamento con i composti dell'invenzione. La potenza dei vari coniugati contro le varie linee di cellule tumorali, come espressa da valori di IC<sub>50</sub> (nM), viene misurata di conseguenza.

Le varie linee di cellule tumorali vengono inoculate in topi nudi o SCID usando sostanzialmente lo stesso protocollo delineato nell'Esempio 15. Ad esempio, circa  $1 \times 10^6$  —  $5 \times 10^7$  cellule tumorali (tipicamente  $1 \times 10^7$ ) cellule/topo vengono inoculate per via sottocutanea in un volume di circa 0,1-0,2 mL/topo, nell'area sopra la spalla destra di topi nudi atimici femmina di 6 settimane di età. Quando il tumore ha raggiunto una dimensione media di  $\sim 100 \text{ mm}^3$  (generalmente 6 - 8 giorni dopo l'inoculazione delle cellule tumorali), i topi vengono randomizzati in gruppi (ad esempio,  $n = 5 - 8$  per gruppo) in base al volume del tumore. Il trattamento viene iniziato il giorno dopo la randomizzazione, e i gruppi comprendono un gruppo di controllo trattato con l'opportuno veicolo (200  $\mu\text{L}$ /iniezione), o un trattamento singolo a varie dosi (5 - 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) di coniugati di farmaci sopra indicati (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  di dose di farmaco collegato corrispondevano a circa 2  $\text{mg}/\text{kg}$  di dose di anticorpo). È possibile usare molteplici schemi di dosaggio (ad esempio il trattamento nei giorni 1, 3, 5 o nei giorni 1, 4, 7).

Si misura la mediana e la media del volume tumorale rispetto al tempo, con i dati che dimostrano un'attività anti-tumorale dose-dipendente dei presenti coniugati. La dose minima efficace viene quindi calcolata e confrontata con la dose massima tollerata.

Esempio 32

15 *Preparazione di huMy9-6-solfo-SPDB-1d usando il linker 4-nitroPy-solfo-SPDB*

Una reazione contenente 6  $\text{mg}/\text{mL}$  di anticorpo huMy9-6 e 5 equivalenti molarli del linker altamente reattivo N-succinimidi-1-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato (concentrato 20  $\text{mM}$  in etanolo) è stata incubata per 3 ore a  $25^\circ\text{C}$  in tampone EPPS 50  $\text{mM}$  a pH 8. Il linker non reagito è stato rimosso usando una colonna di dissalazione NAP (Illustra Sephadex G-25 grado di DNA, GE Healthcare). Il rapporto tra linker e anticorpo (LAR) è stato determinato essere circa 2,3 in base alla concentrazione di anticorpo e la concentrazione di nitropiridina-2-tione rilasciata da DTT tramite UV-Vis ( $\epsilon_{394 \text{ nm}} = 14205 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  per 2-tio-4-nitropiridone).

Il huMy9-6 modificato con il linker è stato diluito a 2  $\text{mg}/\text{mL}$  in tampone HEPES 50  $\text{mM}$  a pH 8,5, DMA 10% v/v, e fatto reagire con 2 equivalenti molarli di composto 1d per ogni linker (concentrato 5  $\text{mM}$  in DMA; 4,6 equivalenti per anticorpo), per 30 minuti a  $25^\circ\text{C}$ . Il completamento della reazione di scambio di disolfuri è stata determinata monitorando l'aumento di assorbanza a 394  $\text{nm}$  in UV.

Nella post-reazione, il coniugato è stato purificato e sottoposto a cambio del tampone con 250 mM glicina, 10mM istidina, saccarosio 1%, Tween-20 0,01%, 50  $\mu$ M bisolfito di sodio a pH 6,2 usando una colonna di dissalazione (G -25 Sephadex, grado fine, GE Healthcare).

5 Il coniugato purificato mostrava avere una media di 2,1 molecole di 1d collegato per anticorpo (via UV-Vis usando i coefficienti di estinzione molare  $\epsilon_{330 \text{ nm}} = 15,484 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  e  $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 30,115 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  per 1d, ed  $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 207.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  per huMy9-6), 98% di monomero (mediante cromatografia di esclusione dimensionale), <1% di 1d non coniugato (mediante estrazione in acetone/HPLC in fase inversa), una resa proteica del 70%, e una resa complessiva di 1d del 32%. Si veda la FIG. 60.

ELENCO DELLE SEQUENZE

<110> IMMUNOGEN, INC.  
<120> DERIVATI CITOTOSSICI DI BENZODIAZEPINE  
<130> DMN/PE955755EP  
5 <140>  
<141>  
<150> 61/483,499  
<151> 06/05/2011  
<150> 61/443,062  
10 <151> 15/02/2011  
<150> 61/443,092  
<151> 15/02/2011  
<160> 14  
<170> PatentIn versione 3.5  
15 <210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Sequenza artificiale  
<220>  
20 <221> fonte  
<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Peptide sintetico"  
<400> 1  
  
Gly Tyr Phe Met Asn  
1 5  
  
<210> 2



<211> 17  
<212> PRT  
<213> Sequenza artificiale  
<220>  
5 <221> fonte  
<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Peptide sintetico"  
<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (14)..(14)  
10 <223> /sostituzione="Gln" o "His" o "Arg"  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (14)..(14)  
<223> /nota="Residuo dato nella sequenza non ha preferenza rispetto alle annotazioni per detta posizione"  
15 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (16) .. (16)  
<223> /sostituzione="His" o "Asn" o "Arg"  
<220>  
20 <221> VARIANTE  
<222> (17)..(17)  
<223> /sostituzione="Glu" o "Thr" o "Ser" o "Ala" o "Val"  
<220>  
<221> misc\_feature  
25 <222> (16)..(17)

<223> /nota="I residui dati nella sequenza non hanno preferenza rispetto a quelli nelle annotazioni per dette posizioni"

<400> 2

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

Gly

<210> 3

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

10 <223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Peptide sintetico"

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr  
1 5

<210> 4

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Peptide sintetico"

20 <400> 4

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

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

5 <220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Peptide sintetico"

<400> 5

**Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala**  
**1 5**

10 <210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

15 <221> fonte

<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Peptide sintetico"

<400> 6

**Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr**  
**1 5**

<210> 7

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	340	345	350
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	405	410	415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	435	440	445

<210> 9

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Sequenza artificiale



<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Polipeptide sintetico"

<400> 9

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser

5

65	70	75	80
Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg	85	90	95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	100	105	110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln	115	120	125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr	130	135	140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser	145	150	155
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr	165	170	175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys	180	185	190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro	195	200	205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210	215	

<210> 10

<211> 218

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

5 <221> fonte

<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Polipeptide sintetico"

<400> 10

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

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

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

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

50	55	60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser 65		70 75 80
Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg 85		90 95
Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg 100		105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln 115		120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr 130		135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser 145		150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr 165		170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys 180		185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro 195		200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210		215

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

5 <220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Polipeptide sintetico"

<400> 11





<221> fonte

<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Polipeptide sintetico"

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<221> fonte

<223> /nota="Descrizione di sequenza artificiale: Peptide sintetico"

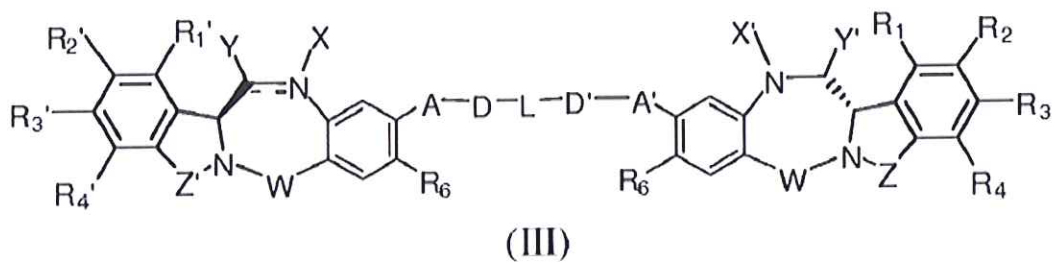
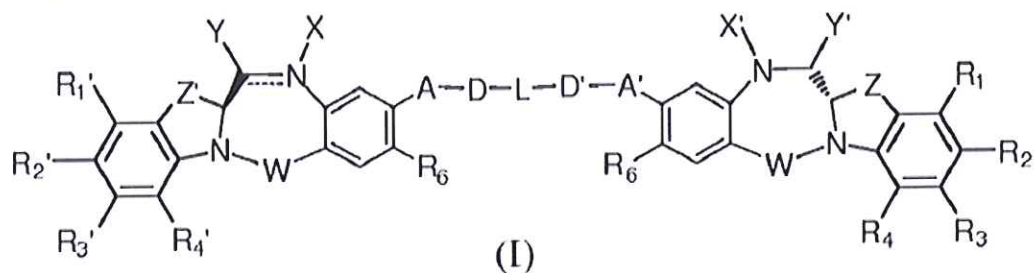
<400> 14

**Ala Leu Ala Leu**  
**1**

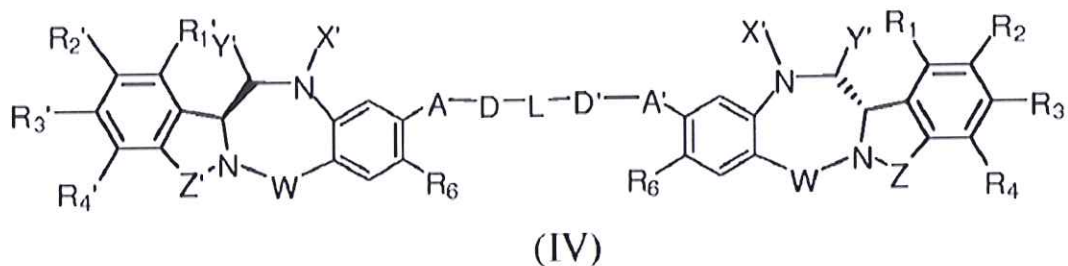
5

RIVENDICAZIONI

1. Composto citotossico comprendente un gruppo legante con un gruppo reattivo legato a esso in grado di legare covalentemente il composto citotossico a un agente legante cellulare (CBA), in cui detto composto citotossico è rappresentato da una delle seguenti formule:



5



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

- la doppia linea  $\overline{\text{---}}$  tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X sia assente e Y sia -H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio e quando è un singolo legame, X sia -H, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso o una frazione protettiva dell'ammina;
- Y è -H o un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', -OCOOR', -OCONR'R", -NR'R", -NR'COR", -NR'NR'R", un
- 5 eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (ad es. piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina, ecc.), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R", un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido; oppure
- Y è un solfito (HSO<sub>3</sub>, HSO<sub>2</sub> o un sale di HSO<sub>3</sub>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> o HSO<sub>2</sub><sup>-</sup> formato con un catione), metabisolfito (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o un sale
- 10 di S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), mono-, di-, tri- e tetra-tiofosfato (PO<sub>3</sub>SH<sub>3</sub>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, POS<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, PS<sub>4</sub>H<sub>2</sub> o un sale di PO<sub>3</sub>S<sup>3-</sup>, PO<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>3-</sup>, POS<sub>3</sub><sup>3-</sup> o PS<sub>4</sub><sup>3-</sup> formato con un catione), estere tiofosfato (R<sup>i</sup>O)<sub>2</sub>PS(OR<sup>i</sup>), R<sup>i</sup>S-, R<sup>i</sup>SO, R<sup>i</sup>SO<sub>2</sub>, R<sup>i</sup>SO<sub>3</sub>, tiosolfato (HS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), ditionite (HS<sub>2</sub>O<sub>4</sub> o un sale di S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup> formato con un catione), fosforoditioato (P(=S)(OR<sup>k</sup>)(S)(OH) o un suo sale formato con un catione), acido idrossamico (R<sup>k</sup>C(=O)NOH o un sale formato con un catione), formaldeide solfossilato
- 15 (HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup> o un sale di HOCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) o una loro miscela, in cui R<sup>i</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 10 atomi di carbonio ed è sostituito con almeno un sostituente scelto tra -N(R<sup>l</sup>)<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, e -PO<sub>3</sub>H; R<sup>i</sup> può essere inoltre opzionalmente sostituito con un sostituente per un alchile descritto in questo contesto; R<sup>l</sup> è un alchile lineare o modificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio; R<sup>k</sup> è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile, eterociclice o eteroarile;
- 20 M è -H oppure un catione;
- R, per ciascuna occorrenza, è indipendentemente scelto dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, -R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico con da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo
- 25 o un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente

- scelti tra O, S, N e P;
- R' e R'' sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, -R<sup>c</sup> e un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi
- 5 indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- R<sup>c</sup> è -H o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio o il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso;
- n è un numero intero compreso tra 1 e 24;
- W è scelto tra C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO e SO<sub>2</sub>;
- 10 X' è scelto tra -H, un gruppo protettivo dell'ammina, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, -R<sup>c</sup>, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente selezionati da azoto, ossigeno e zolfo, e un anello eterociclico opzionalmente sostituito di 3 - 18 componenti contenente
- 15 da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente selezionati da O, S, N e P;
- Y' è scelto tra -H, un gruppo osso, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile avente da 6 a 18 elementi opzionalmente sostituito, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo, un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi
- 20 opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi;
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' e R<sub>4</sub>' sono ciascuno indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica - (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, -R<sup>c</sup>, alogeno, guanidina [-NH(C=NH)NH<sub>2</sub>], -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO -NR'COR'', -SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, un solfato -
- 25 OSO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, una solfonammide rappresentata da -SO<sub>2</sub>NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'', e il gruppo

legante con il gruppo reattivo legato a esso;

$R_6$  è -H, -R, -OR, -SR, -NR'R", -NO<sub>2</sub>, un alogeno o il gruppo legante con il gruppo reattivo legato ad esso;

Z e Z' sono selezionati indipendentemente da  $-(CH_2)_n^-$ ,  $-(CH_2)_n^-$ ,  $-CR_7R_8-(CH_2)_{n_a}'-$ ,  $-(CH_2)_n-NR_9-(CH_2)_{n_a}'-$ ,  $-(CH_2)_n^-$ ,  $O-(CH_2)_{n_a}'-$  e  $-(CH_2)_n-S-(CH_2)_{n_a}'-$ ;

5  $n'$  e  $n_a'$  sono uguali o diversi e sono scelti tra 0, 1, 2 e 3;

$R_7$  e  $R_8$  sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , un amminoacido, un'unità peptidica recante da 2 a 6 amminoacidi, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

10  $R_9$  è indipendentemente scelto tra -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ ;

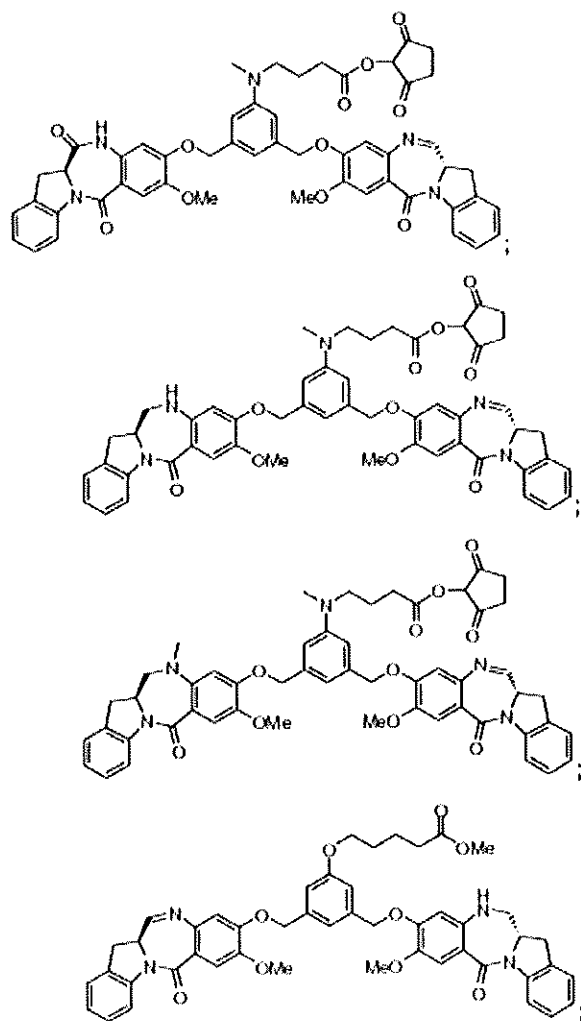
A e A' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra -O-, osso  $-(C(=O)-)$ , -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -NR<sub>5</sub> e -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

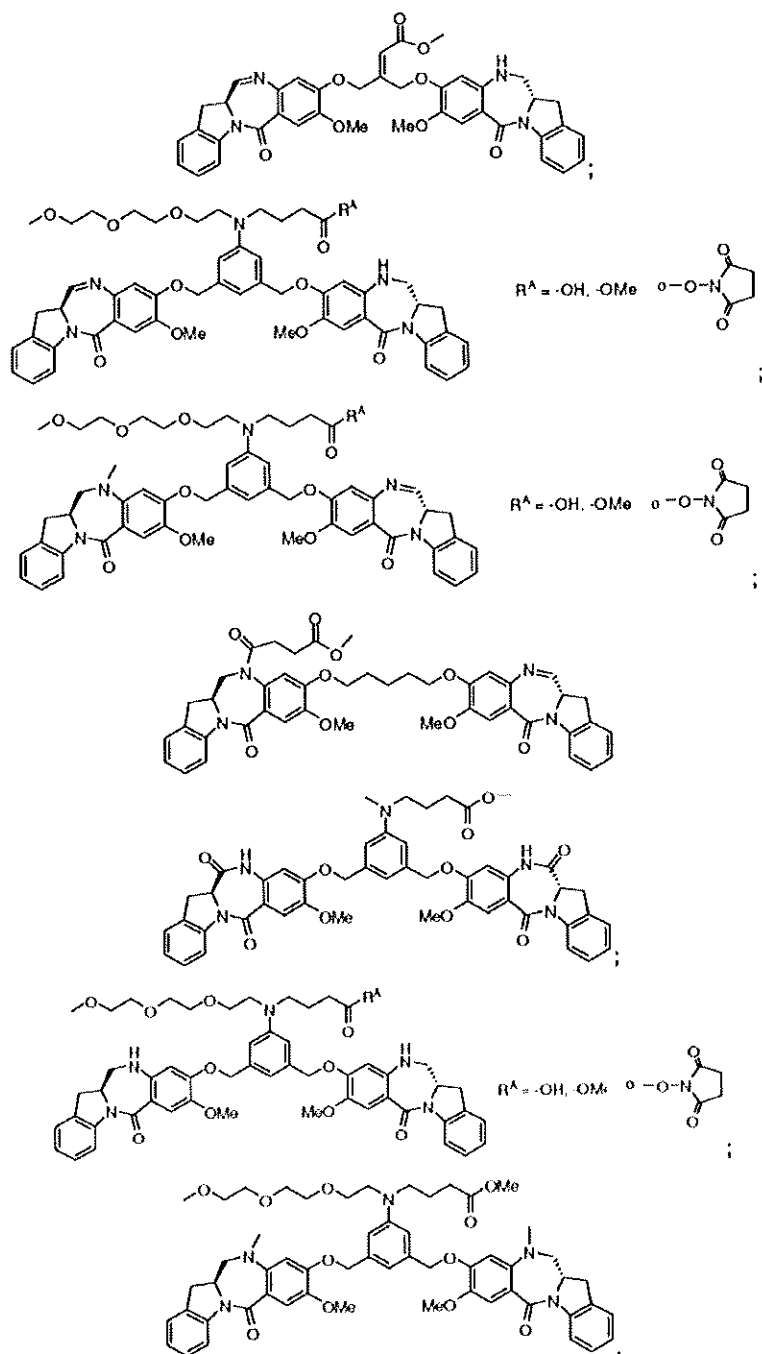
$R_5$  per ciascuna occorrenza è indipendentemente -H o un alchile lineare o ramificato opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

15 D e D' sono uguali o differenti, e sono indipendentemente assenti o selezionati dal gruppo costituito da alchile, alchenile o alchinile, lineare, ramificato o ciclico, opzionalmente sostituito, avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un amminoacido, un peptide che reca da 2 a 6 amminoacidi, e un'unità polietilenglicolica  $(OCH_2CH_2)_n^-$ ;

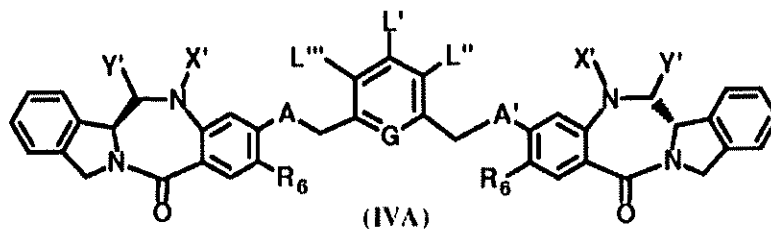
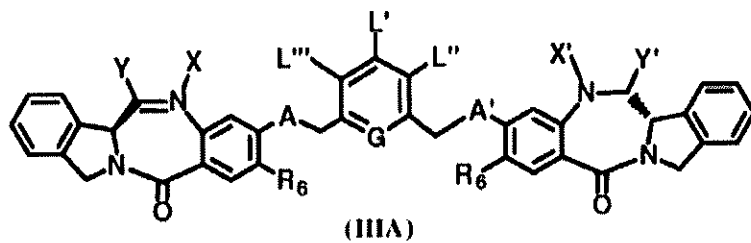
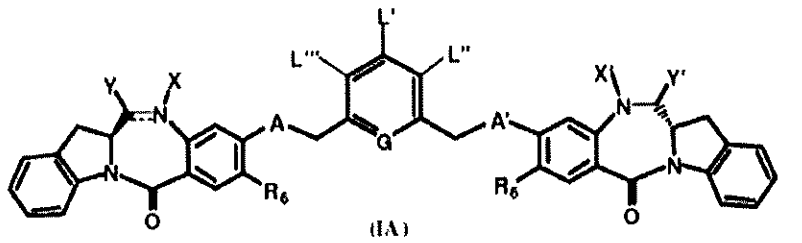
20 L è assente, il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-$ , un alchile o alchenile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un gruppo fenile, un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi o un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P, in cui l'alchile o alchenile è opzionalmente sostituito con il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso; il fenile o l'anello eterociclico o eteroarilico possono essere opzionalmente sostituiti, in cui il sostituito può essere il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso;

purché il composto non sia alcuno dei seguenti composti:





2. Il composto della rivendicazione 1, in cui il composto è rappresentato da qualsiasi delle seguenti formule:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

- 5 L', L'' e L''' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-R^6$ , alogeno, guanidina  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NR'COR'', -SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>M, un solfato -OSO<sub>3</sub>M-, una solfonammide rappresentata da SO<sub>2</sub>NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e il gruppo legante con il

gruppo reattivo legato a esso, purché solo uno di L', L'' e L''' sia il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso; e G è scelto tra -CH- o -N-.

3. Il composto della rivendicazione 2, in cui L'' e L''' sono —H; ed L' è rappresentato dalla seguente formula:

5 -W'-R<sup>x</sup>-V-R<sup>y</sup>-J,

in cui:

W' e V sono uguali o differenti, e sono ciascuno indipendentemente assente o selezionato da -CR<sup>e</sup>R<sup>e'</sup>-, -O-, -O-C(=O)-, -C(=O)-O-, -S-, -SO-, -OSO<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>O-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-, -O-(C=O)O-, -O-(C=O)N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-, -C(=O)-N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)O-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)-, -SS-,

10 o -C(=O)-, o un amminoacido, o un peptide avente da 2 a 8 amminoacidi;

R<sup>x</sup> e R<sup>y</sup> sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente assenti o un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile recante da 6 a 10 atomi di carbonio o un anello eterociclico avente da 3 a 8 elementi recante da 1 a 3 eteroatomi scelti tra O, N o S;

15 R<sup>e</sup> ed R<sup>e'</sup> sono uguali o differenti, e sono selezionati da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante un gruppo amminico secondario (ad esempio -NHR<sup>101</sup>) o amminico terziario (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>) o un eterociclo con 5 o 6 elementi contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui R<sup>101</sup> e R<sup>102</sup> sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio; preferibilmente, R<sup>101</sup> e R<sup>102</sup> sono ciascuno indipendentemente un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6

20 atomi di carbonio;

n è un numero intero compreso tra 1 e 24;

J comprende il gruppo reattivo legato a esso ed è scelto tra una maleimmide, un aloacetammido, -SH, -SSR<sup>d</sup>, -CH<sub>2</sub>SH, -CH(Me)SH, -C(Me)<sub>2</sub>SH, -NHR<sup>cl</sup>, -CH<sup>1</sup>NHR<sup>cl</sup>, -NR<sup>cl</sup>NH<sub>2</sub>, -COOH e -COE, in cui -COE rappresenta un estere reattivo scelto tra, tuttavia senza limitazione, N-idrossisuccinimmide estere, N-idrossisolfosuccinimmide estere, nitrofenile (*ad*

25 *es.* 2 o 4-nitrofenil) estere, dinitrofenile (*ad es.* 2,4-dinitrofenil) estere, solfo-tetrafluorfenile (*ad es.* 4-solfo-2,3,5,6-



tetrafluorofenil)estere e pentafluorofenilestere e in cui  $R^{cl}$  è -H o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio, e

$R^d$  è scelto tra fenile, nitrofenile (*ad es.* 2 o 4-nitrofenile), dinitrofenile (*ad es.* 2 o 4-nitrofenile), carbossinitrofenile (*ad es.* 3-carbossi-4-nitrofenile), piridile o nitropiridile (*ad es.* 4-nitropiridile).

5

4. Il composto della rivendicazione 3, in cui:

(i)  $W'$  è -O-, -N( $R^e$ )- o -N( $R^e$ )-C(=O)-;

$R^e$  è -H, un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio oppure  $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$ ;

$R^X$  è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

10  $V$  è assente,  $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ ,  $-C(=O)-NH-$ ,  $-S-$ ,  $-NH-C(=O)-$ ;

$R^Y$  è assente o è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; e

$J$  è -SH, -SSR<sup>d</sup> o -COE, in cui COE è preferibilmente, N-idrossisuccinimide estere; o

(ii)  $W'$  è -O-, -N( $R^e$ )- o -N( $R^e$ )-C(=O)-;

$R^8$  è H, Me o  $-(CH_2-CH_2-O)_n-Me$ ;

15  $n$  è un numero intero compreso tra 2 e 6;

$R^X$  è un alchile lineare o ramificato recante da 1 a 6 atomi di carbonio;

$V$  e  $R^Y$  sono assenti; e

$J$  è -COE, preferibilmente N-idrossisuccinimide estere.

20 5. Il composto della rivendicazione 3, in cui  $L'$  è rappresentato da una delle seguenti formule:

$-W'-[CR_1^aR_2^a]_a-V-[Cy]_{0-1}-[CR_3^bR_4^b]_b-COE$ ;

$-NR^e-[CR_1^aR_2^a]_a-S-[CR_3^bR_4^b]_b-COE$ ; oppure

$-NR^e-[CR_1^aR_2^a]_a-S-Cy-[CR_3^bR_4^b]_b-COE$ ,

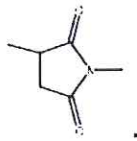
in cui:

25  $R_1^a$ ,  $R_2^a$  e  $R_3^b$  sono ciascuno indipendentemente -H o -Me;

$R_4$  è -H, -Me, -SO<sub>3</sub>H o -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, in cui M<sup>+</sup> è un catione farmaceuticamente accettabile;

a è un numero intero tra 0-2, b è un numero intero tra 0-3; e

Cy è un anello eterociclico a 5 elementi opzionalmente sostituito recante un N eteroatomo, preferibilmente Cy è



5

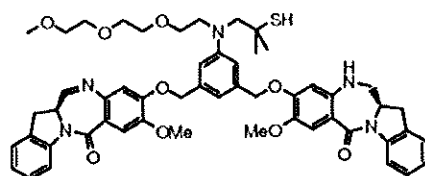
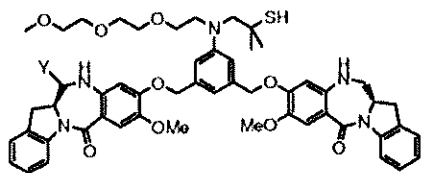
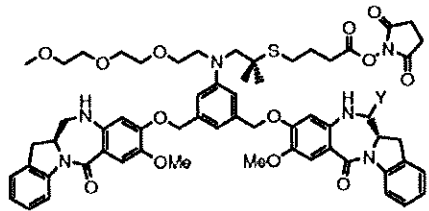
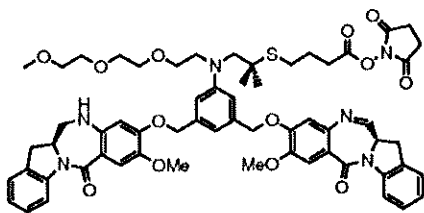
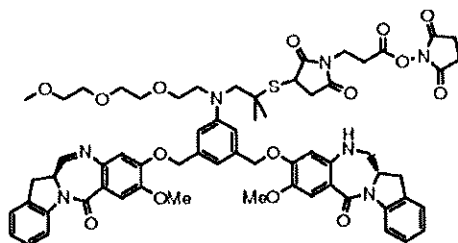
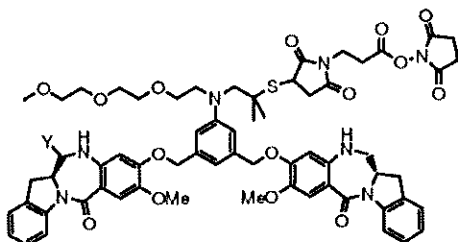
6. Il composto di qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui, dove la doppia linea == tra N e C rappresenta un singolo legame, Y è un un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', - OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (ad es. piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina, ecc.), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido.

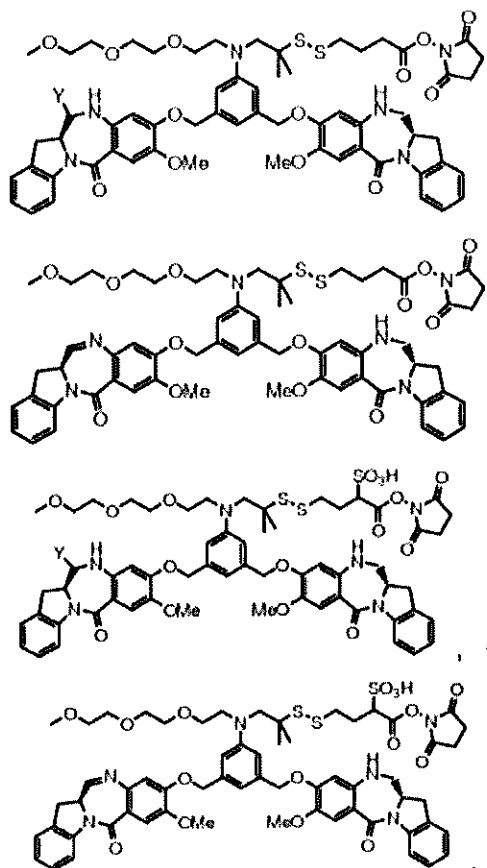
10

15

7. Il composto della rivendicazione 6, in cui detto composto citotossico è di formula (I).

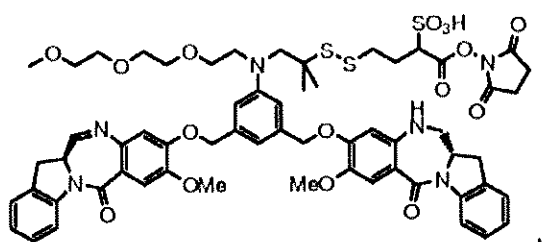
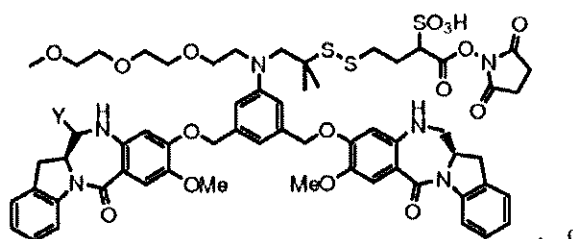
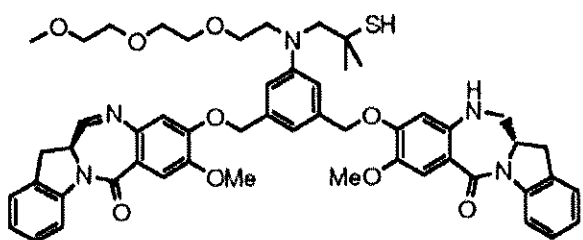
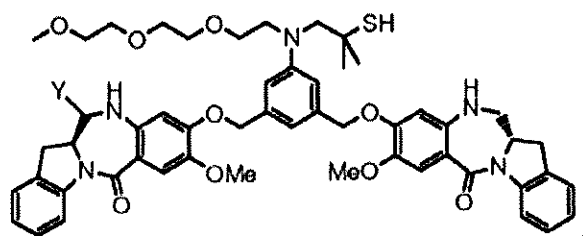
8. Il composto della rivendicazione 1, in cui il composto è:





o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui Y è -SO<sub>3</sub>M (ad es. Y è -SO<sub>3</sub>M), e M è -H o un suo catione farmaceuticamente accettabile.

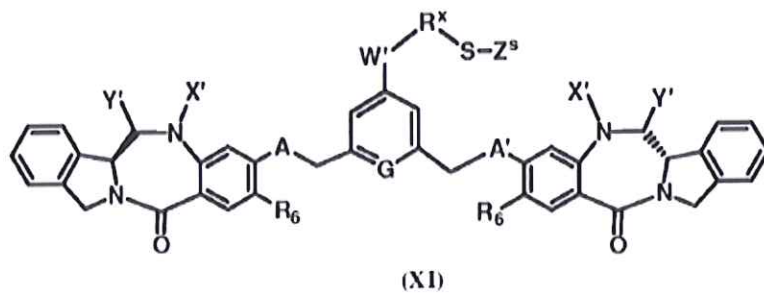
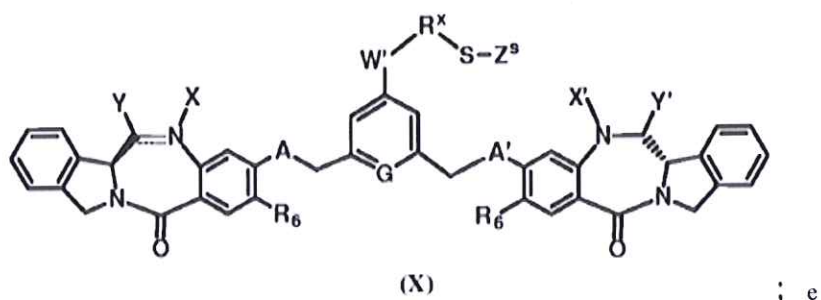
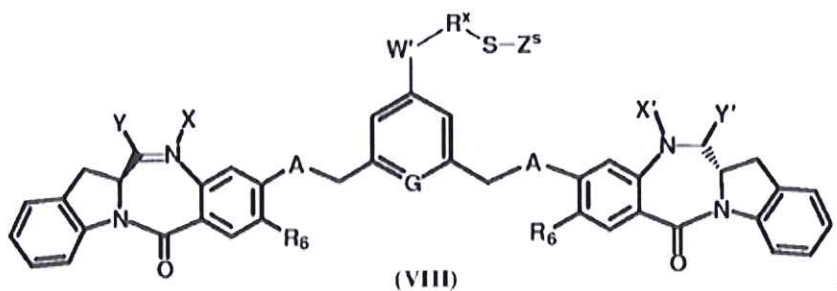
5 9. Il composto della rivendicazione 1, in cui il composto è:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui Y è -H o -SO<sub>3</sub>M e M è -H o un suo catione farmaceuticamente

accettabile.

10. Il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui il composto è rappresentato da una qualsiasi delle seguenti formule:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

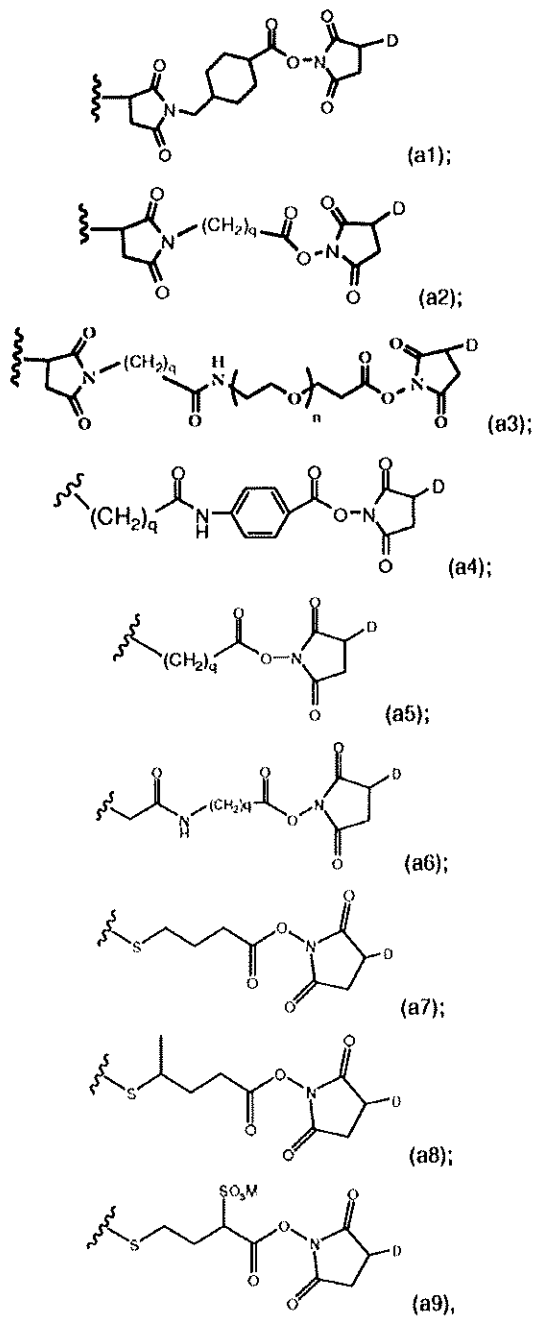
la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un legame singolo o doppio legame, a condizione che, quando esso è un doppio legame, X è assente e Y è -H, e quando è un legame singolo, X è selezionato da -H, il gruppo di collegamento con il gruppo reattivo legato ad esso, o un gruppo protettivo di ammina (preferibilmente X è -H);

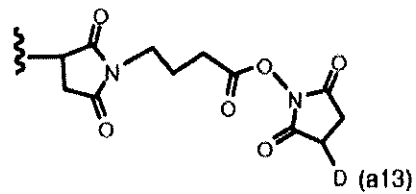
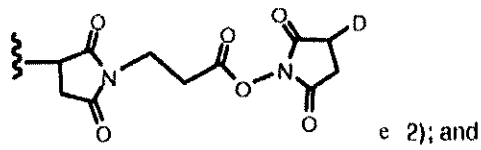
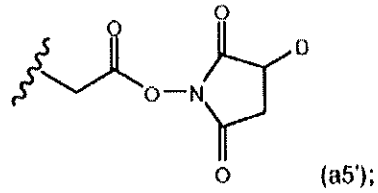
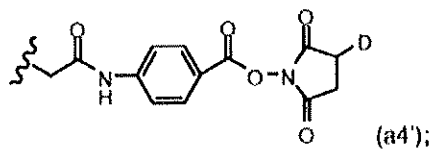
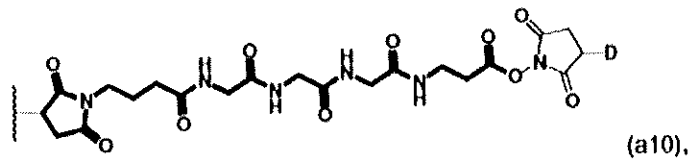
- 5 Y è scelto tra -H, -OR, -OCOR', -SR, -NR'R," -SO<sub>3</sub>M, -SO<sub>2</sub>M o -OSO<sub>3</sub>M, in cui M è -H o un catione come Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>;  
 R è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio o un gruppo PEG -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, in cui n è un numero intero compreso tra 1 e 24 e R<sup>c</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio;
- 10 R' e R'' sono uguali o diversi e sono scelti tra -H, -OH, -OR, -NRR<sup>9'</sup>, -COR, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi scelti tra O, S, N e P, un gruppo PEG-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>, in cui n è un numero intero compreso tra 1 e 24, preferibilmente, n è 2, 4 o 8; e R<sup>9</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio o un gruppo PEG- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>c</sup>;
- 15 X' è scelto dal gruppo costituito da -H, -OH, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, fenile e un gruppo protettivo dell'ammina;  
 Y' è scelto dal gruppo costituito da -H, un gruppo osso, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio.  
 A e A' sono scelti tra -O- e -S-;
- 20 W' è assente o scelto tra -O-, -N(R<sup>e</sup>)-, -N(R<sub>e</sub>)-C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>e</sup>)-, -S- o -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>e</sup>-;  
 R<sup>x</sup> è assente o scelto tra un alchile lineare, ramificato, o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;  
 R<sup>e</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o - (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante un gruppo amminico secondario (ad es. -NHR<sup>101</sup>) o amminico terziario (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>) o un eterociclo con 5 o 6 elementi
- 25 contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui R<sup>101</sup> e R<sup>102</sup> sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile

o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

G è scelto tra -CH- o -N-;

Z<sup>s</sup> è -H o è scelto tra qualsiasi delle seguenti formule:





in cui:

q è un numero intero compreso tra 1 e 5;

5 n è un numero intero compreso tra 2 e 6;

D è -H o -SO<sub>3</sub>M;

M è -H o un catione, come  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ .

11. Il composto della rivendicazione 10, in cui  $W'$  è  $-\text{N}(\text{R}^e)-$ ; e  $\text{R}^e$  è  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ , in cui (i)  $\text{R}^k$  è un -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio; o (ii)  $\text{R}^k$  è -H o -Me, n è 4, e q è 2.

5

12. Il composto della rivendicazione 10 o 11, in cui:

la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un legame singolo o doppio legame, a condizione che, quando esso è un doppio legame, X è assente e Y è -H, e quando è un legame singolo, X è -H; Y è -OH o  $-\text{SO}_3\text{M}$ ;

M è -H o un catione farmaceuticamente accettabile (*ad es.*  $\text{Na}^+$ );

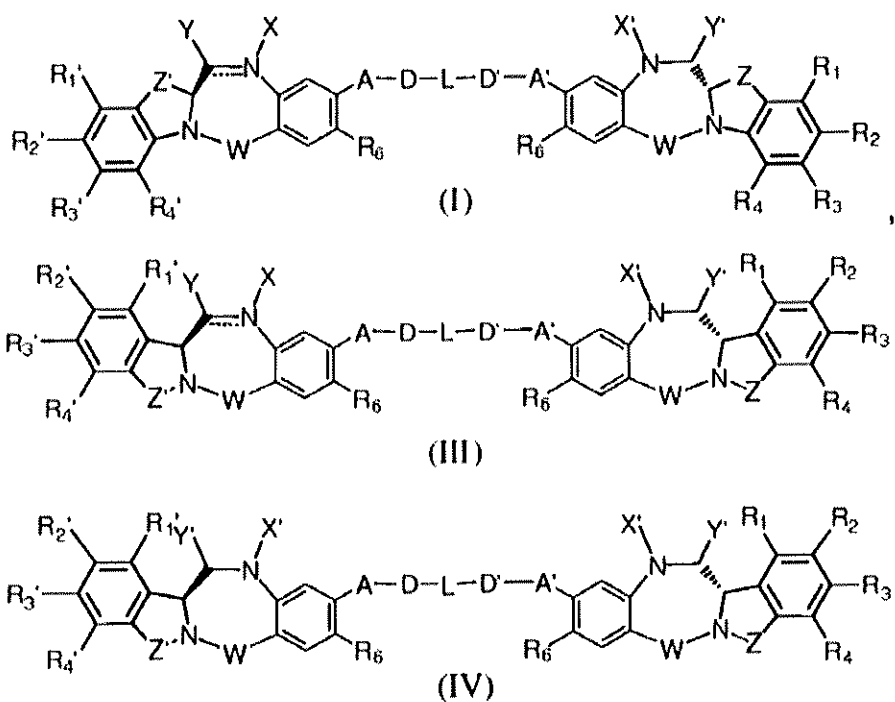
10  $X'$  e  $Y'$  sono entrambi -H;

A e A' sono entrambi -O-;

$\text{R}_6$  è -OMe; e

$\text{R}^x$  è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

15 13. Coniugato comprendente un composto citotossico e un agente legante cellulare (CBA), in cui il composto citotossico comprende un gruppo legante che lega covalentemente il composto citotossico al CBA e in cui detto composto citotossico è rappresentato da una qualsiasi delle seguenti formule:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame o un doppio legame, purché quando è un doppio legame, X sia assente e Y sia -H o un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio e quando è un singolo legame, X sia -H, il gruppo legante o una frazione protettiva dell'ammina;

Y è -H o un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', -OCOR', -OCOR', -CONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (ad es. piperidina, tetraidropirrola, pirazolo, morfolina, ecc.), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un aminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un aminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità aminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido; oppure

- Y è un solfito ( $\text{HSO}_3$ ,  $\text{HSO}_2$  o un sale di  $\text{HSO}_3$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  o  $\text{HSO}_2^-$  formato con un catione), metabisolfito ( $\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_5$  o un sale di  $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$  formato con un catione), mono-, di-, tri-, e tetra-tiofosfato ( $\text{PO}_3\text{SH}_3$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2\text{H}_2$ ,  $\text{POS}_3\text{H}_2$ ,  $\text{PS}_4\text{H}_2$  o un sale di  $\text{PO}_3\text{S}^3$ ,  $\text{PO}_2\text{S}_2^{3-}$ ,  $\text{POS}_3^{3-}$  o  $\text{PS}_4^{3-}$  formato con un catione), estere di tio fosfato  $\text{R}^i\text{O})_2\text{PS}(\text{OR}^i)$ ,  $\text{R}^i\text{S}^-$ ,  $\text{R}^i\text{SO}$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_2$ ,  $\text{R}^i\text{SO}_3$ , tiosolfato ( $\text{HS}_2\text{O}_3$  o un sale di  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  formato con un catione), ditionito ( $\text{HS}_2\text{O}_4$  o un sale di  $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$  formato con un catione),
- 5 fosforoditioato ( $\text{P}(=\text{S})(\text{OR}^k)(\text{S})(\text{OH})$  o un suo sale formato con un catione), acido idrossamico ( $\text{R}^k\text{C}(=\text{O})\text{NOH}$  o un sale formato con un catione), formaldeide solfossilato ( $\text{HOCH}_2\text{SO}_2$  o un sale di  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2^-$  formato con un catione, come  $\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{Na}^+$ ) o una loro miscela, in cui  $\text{R}^i$  è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 10 atomi di carbonio, ed è sostituito con almeno un sostituente selezionato da  $-\text{N}(\text{R}^i)_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{H}$ ,  $-\text{SO}_3\text{H}$ , e  $-\text{PO}_3\text{H}$ ;  $\text{R}^i$  può essere ulteriormente sostituito con un sostituente per un alchile qui descritto;  $\text{R}^j$  è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di
- 10 carbonio;  $\text{R}^k$  è un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, arile, eterociclice o eteroarile;
- M è -H oppure un catione;
- R, per ciascuna occorrenza, è indipendentemente scelto dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -
- 15  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ ,  $-\text{R}^c$ , un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico con da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo o un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- $\text{R}'$  e  $\text{R}''$  sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -OR, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -COR, un alchile, alchenile o alchinile
- 20 lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica -  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ ,  $-\text{R}^c$  e un anello eterociclico avente da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti tra O, S, N e P;
- $\text{R}^c$  è -H o un alchile lineare o ramificato sostituito o non sostituito avente da 1 a 4 atomi di carbonio o il gruppo legante;
- n è un numero intero compreso tra 1 e 24;
- 25 W è scelto tra C=O, C=S, CH<sub>2</sub>, BH, SO e SO<sub>2</sub>;

- X' è scelto tra -H, un gruppo protettivo dell'ammina, il gruppo legante, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(CH_2CH_2O)_n-R^c$ , un arile opzionalmente sostituito avente da 6 a 18 atomi di carbonio, un anello eteroarilico avente da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo e un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente scelti da O, S, N e P;
- Y' è scelto tra -H, un gruppo osso, il gruppo legante, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile con da 6 a 18 elementi opzionalmente sostituito, un anello eteroarilico con da 5 a 18 elementi opzionalmente sostituito contenente uno o più eteroatomi indipendentemente scelti tra azoto, ossigeno e zolfo, un anello eterociclico con da 3 a 18 elementi opzionalmente sostituito avente da 1 a 6 eteroatomi;
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', R<sub>3</sub>' ed R<sub>4</sub>' sono ciascuno indipendentemente selezionati da -H, un alchile, alchenile, alchinile, lineare, ramificato o ciclico, opzionalmente sostituito, avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , alogeno, guanidinio  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NCO, NR'COR'', -SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>·M<sup>+</sup>, un solfato -OSO<sub>3</sub>·M<sup>+</sup>, una solfonammide rappresentata da -SO<sub>2</sub>NR'R'', ciano, un azido, -COR', -OCOR', -OCONR'R'' e il gruppo legante;
- R<sub>6</sub> è -H, -R, -OR, -SR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, alogeno o il gruppo legante;
- Z e Z' sono indipendentemente selezionati da  $-(CH_2)_{n'}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-CR_7R_8-(CH_2)_{n'a}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-NR_9-(CH_2)_{n'a}$ ,  $-(CH_2)_{n'}-O-(CH_2)_{n'a}$  e  $-(CH_2)_{n'}-S-(CH_2)_{n'a}$ ;
- n' e n'a sono uguali o diversi e sono scelti tra 0, 1, 2 e 3;
- R<sub>7</sub> e R<sub>8</sub> sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente scelti tra -H, -OH, -SH, -COOH, -NHR', un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n$ , un amminoacido, un'unità peptidica recante da 2 a 6 amminoacidi, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;
- R<sub>9</sub> è indipendentemente scelto tra -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n$ ;

A e A' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti tra -O-, osso (-C(=O)-), -CRR'O-, -CRR'-, -S-, -CRR'S-, -N(R<sub>5</sub>)- e -CRR'N(R<sub>5</sub>)-;

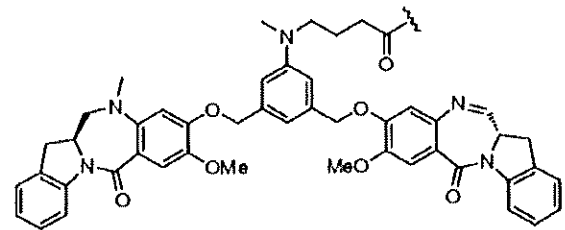
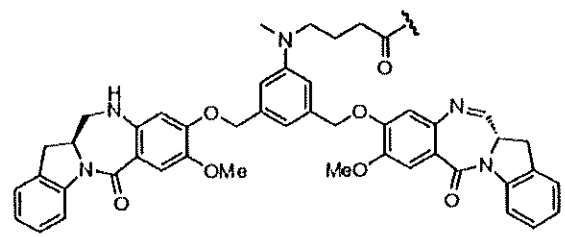
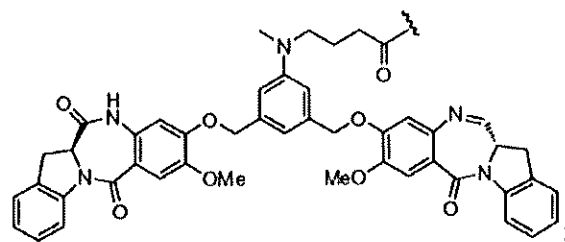
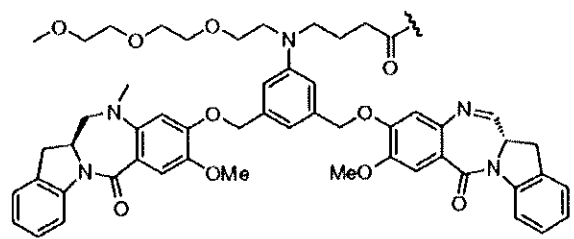
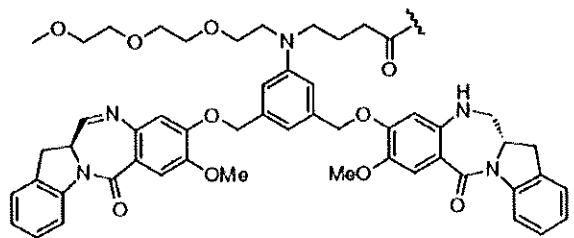
R<sub>5</sub> per ciascuna occorrenza è indipendentemente -H o un alchile lineare o ramificato opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

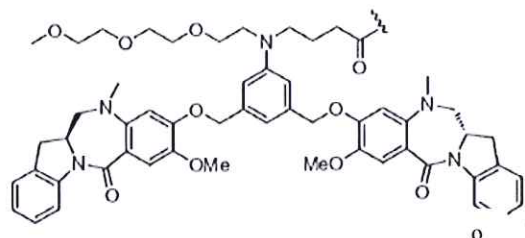
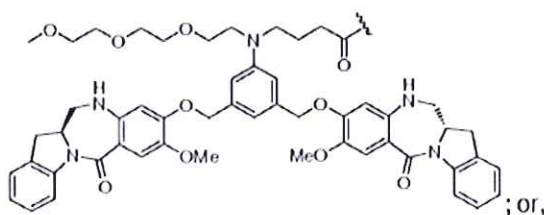
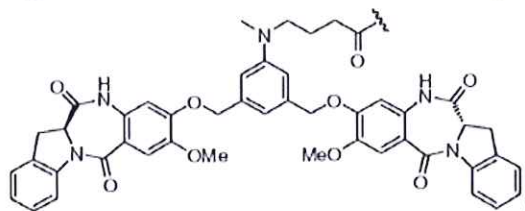
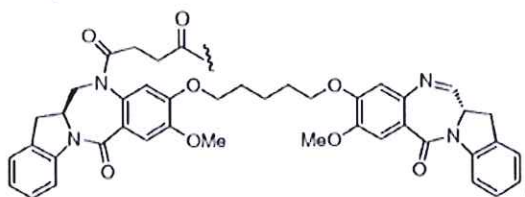
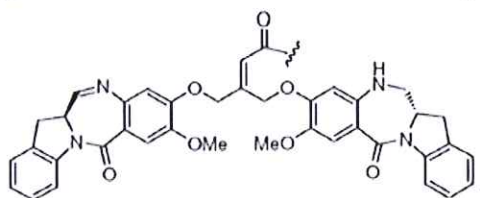
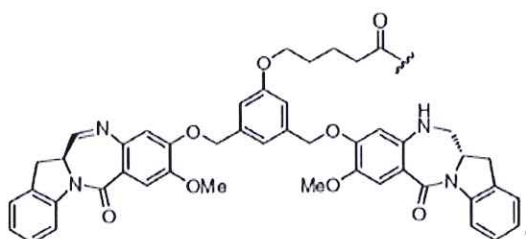
- 5 D e D' sono uguali o diversi e sono indipendentemente assenti o scelti dal gruppo costituito da un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un amminoacido, un peptide recante da 2 a 6 amminoacidi e un'unità polietilenglicolica (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>;

L è assente, il gruppo legante, un'unità polietilenglicolica (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, un alchile o alchenile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un gruppo fenile, un anello eterociclico di 3 - 18 componenti o un eteroarile

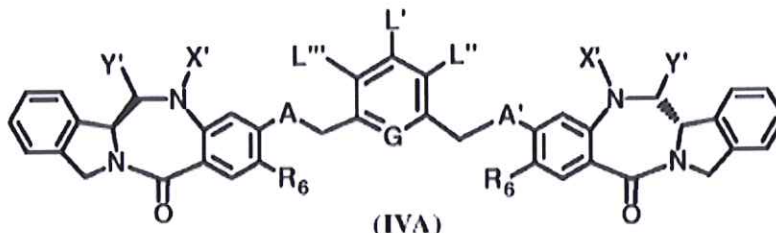
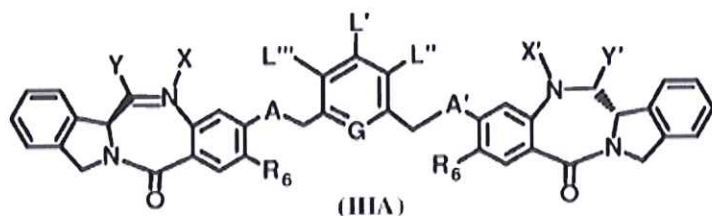
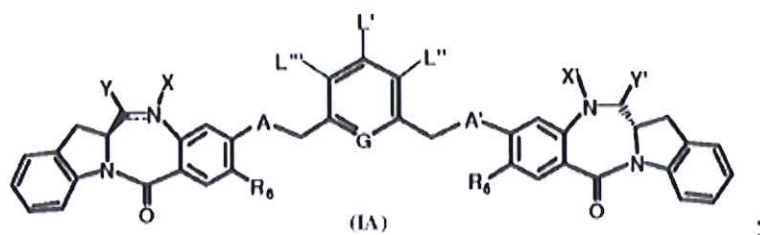
- 10 di 5 - 18 componenti anello avente da 1 a 6 eteroatomi indipendentemente selezionati da O, S, N e P, in cui l'alchile o alchenile è opzionalmente sostituito con il gruppo di collegamento; fenile o eterociclico o un anello di eteroarile può essere opzionalmente sostituito, in cui il sostituito può essere il gruppo di collegamento;

in cui il composto non è:





14. Il coniugato della rivendicazione 13, in cui il composto è rappresentato da una qualsiasi delle seguenti formule:

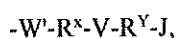


o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

- 5 L', L'' e L''' sono uguali o diversi e sono indipendentemente scelti dal gruppo costituito da -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un'unità polietilenglicolica  $-(OCH_2CH_2)_n-R^c$ , alogeno, guanidina  $[-NH(C=NH)NH_2]$ , -OR, -NR'R'', -NO<sub>2</sub>, -NR'COR'', -SR, un solfossido rappresentato da -SOR', un solfone rappresentato da -SO<sub>2</sub>R', un solfonato -SO<sub>3</sub>.M<sup>+</sup>, un solfato -OSO<sub>3</sub>M, una

solfonammide rappresentata da  $\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ , ciano, un azido,  $-\text{COR}'$ ,  $-\text{OCOR}'$ ,  $-\text{OCONR}'\text{R}''$  e il gruppo legante con il gruppo reattivo legato a esso, purché solo uno di  $\text{L}'$ ,  $\text{L}''$  e  $\text{L}'''$  sia il gruppo legante; e  
G è scelto tra  $-\text{CH}-$  o  $-\text{N}-$ .

5 15. Il coniugato della rivendicazione 14, in cui  $\text{L}''$  e  $\text{L}'''$  sono  $-\text{H}$ ; ed  $\text{L}'$  è rappresentato dalla seguente formula:



in cui:

$\text{W}^x$  e  $\text{V}$  sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente assente o scelto tra  $-\text{CR}^e\text{R}^e-$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SO}-$ ,  $-\text{SO}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^e-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{N}(\text{R}^e)-$ ,  $-\text{N}(\text{R}^e)-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)\text{C}(=\text{O})-$ ,  $-\text{N}(\text{C}(=\text{O})\text{R}^e)-$ ,  $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)-$ ,  $-\text{SS}-$ , o  $-\text{C}(=\text{O})$  o un amminoacido o un peptide avente da 2 a 8 amminoacidi;

$\text{R}^x$  e  $\text{R}^y$  sono uguali o diversi e sono ciascuno indipendentemente assenti o un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico opzionalmente sostituito avente da 1 a 10 atomi di carbonio, un arile recante da 6 a 10 atomi di carbonio o un anello eterociclico avente da 3 a 8 elementi recante da 1 a 3 eteroatomi selezionati da O, N o S;

15  $\text{R}^e$  e  $\text{R}^e'$  sono uguali o diversi e sono scelti tra  $-\text{H}$ , un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{R}^k$ , in cui  $\text{R}^k$  è  $-\text{H}$ , un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante un gruppo amminico secondario (*ad es.*  $-\text{NHR}^{101}$ ) o amminico terziario ( $-\text{NR}^{101}\text{R}^{102}$ ) o un eterociclo con 5 o 6 elementi contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui  $\text{R}^{101}$  e  $\text{R}^{102}$  sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

20 preferibilmente,  $\text{R}^{101}$  e  $\text{R}^{102}$  sono ciascuno indipendentemente un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;

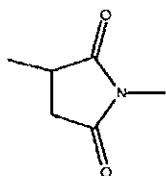
$n$  è un numero intero compreso tra 1 e 24; e

J è legato in modo covalente al CBA, ed è selezionato da una succinimide, un acetammido,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{SS}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}(\text{Me})\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{Me})_2\text{S}-$ ,  $-\text{NR}^{e1}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{NR}^{e1}-$ ,  $-\text{NR}^{e1}\text{N}-$  e  $-\text{C}(=\text{O})-$ , in cui  $\text{R}^{e1}$  è  $-\text{H}$  o un alchile lineare o ramificato, sostituito o non sostituito, avente da 1 a 4 atomi di carbonio.

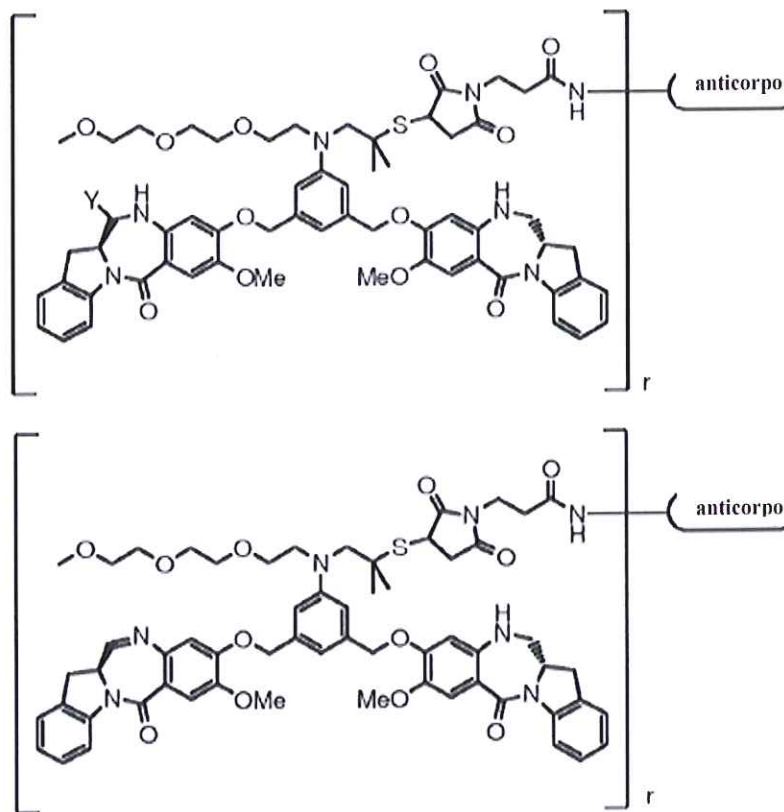
25

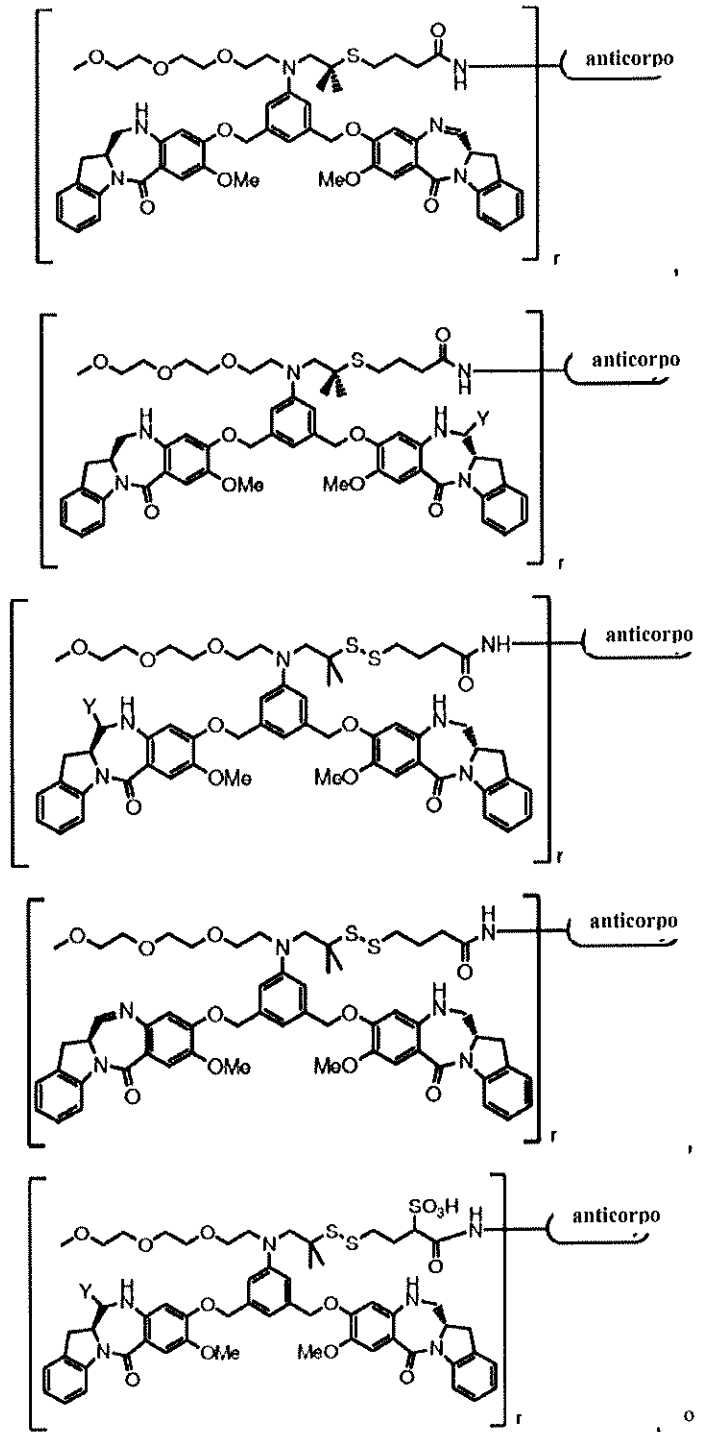


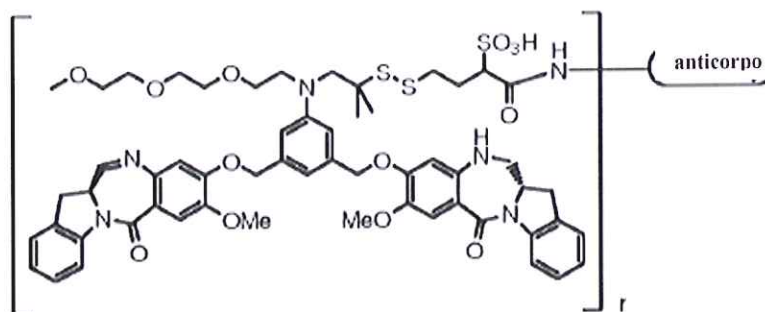
16. Il coniugato della rivendicazione 15, in cui:
- (i)  $W'$  è -O-, -N(R<sup>e</sup>)- o -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-;
- R<sup>e</sup> è -H, un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio oppure -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>;
- 5 R<sup>X</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio;
- V è assente, -(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)-, -C(=O)-NH-, -S-, -NH-C(=O)-;
- R<sup>Y</sup> è assente o è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 4 atomi di carbonio; e
- J è -S-, -SS-, o -C(=O)-; o
- (i.i)  $W'$  è -O-, -N(R<sup>e</sup>)- o -N(R<sup>e</sup>)-C(=O)-;
- 10 R<sup>e</sup> è -H, -Me, o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-Me;
- n è un numero intero compreso tra 2 e 6;
- R<sup>X</sup> è un alchile lineare o ramificato recante da 1 a 6 atomi di carbonio;
- V e R<sup>Y</sup> sono assenti; e
- J è -C(=O)-.
- 15
17. Il coniugato della rivendicazione 14, in cui L' è rappresentato da qualsiasi delle seguenti formule:
- W'-[CR<sub>1</sub>'R<sub>2</sub>']<sub>a</sub>-V-[CY]<sub>0-1</sub>-[CR<sub>3</sub>'R<sub>4</sub>']<sub>b</sub>-C(=O)-;
- NR<sup>e</sup>-[CR<sub>1</sub>'R<sub>2</sub>']<sub>a</sub>-S-[CR<sub>3</sub>'R<sub>4</sub>']<sub>b</sub>-C(=O)-; oppure
- NR<sup>e</sup>-[CR<sub>1</sub>'R<sub>2</sub>']<sub>a</sub>-S-C<sub>y</sub>-[CR<sub>3</sub>'R<sub>4</sub>']<sub>b</sub>-C(=O)-,
- 20 in cui:
- R<sub>1</sub>', R<sub>2</sub>', e R<sub>3</sub>' sono, ciascuno indipendentemente -H o -Me;
- R<sub>4</sub> è -H, -Me, -SO<sub>3</sub>H o -SO<sub>3</sub>M<sup>+</sup>, in cui M<sup>+</sup> è un catione farmaceuticamente accettabile;
- a è un numero intero tra 0-2, b è un numero intero tra 0-3; e
- 25 Cy è un anello eterociclico a 5 elementi opzionalmente sostituito recante un eteroatomo N preferibilmente Cy è



18. Il coniugato di qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 17, in cui la doppia linea  $\equiv$  tra N e C rappresenta un singolo legame, Y è un gruppo uscente scelto tra -OR, -OCOR', - OCOOR', -OCONR'R'', -NR'R'', -NR'COR'', -NR'NR'R'', un eterociclo a 5 o 6 elementi opzionalmente sostituito contenente azoto (ad es. piperidina, tetraidropirrolo, pirazolo, morfolina, ecc.), una guanidina rappresentata da -NR'(C=NH)NR'R'', un amminoacido o un peptide rappresentato da -NRCOP', in cui P' è un amminoacido o un polipeptide contenente da 2 a 20 unità amminoacidiche, -SR, -SOR', -SO<sub>2</sub>M, -SO<sub>3</sub>M, -OSO<sub>3</sub>M, alogeno, ciano e un azido.
- 10 19. Il coniugato della rivendicazione 18, in cui detto composto citotossico è di formula (I).
20. Il coniugato della rivendicazione 14, in cui il coniugato è:

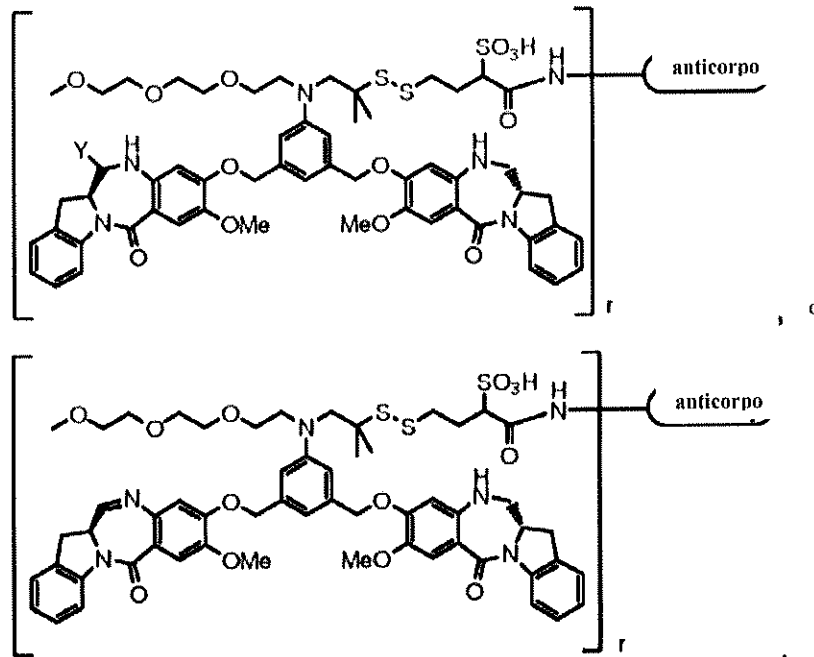






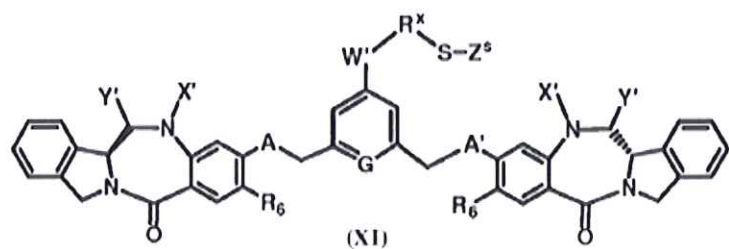
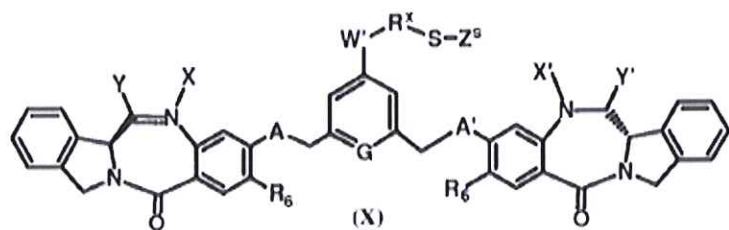
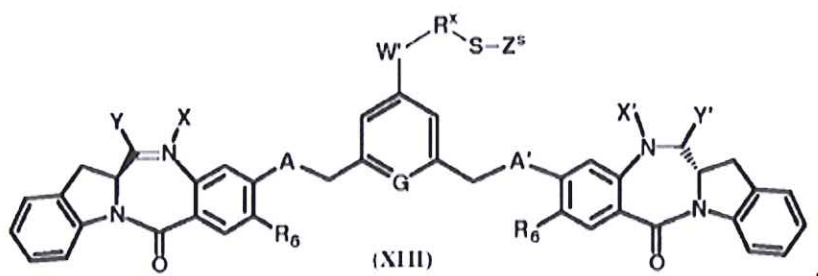
o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui  $r$  è un numero intero da 1 a 10,  $Y$  è -H o  $-\text{SO}_3\text{M}$  (ad es.  $Y$  è  $-\text{SO}_3\text{M}$ ), e  $M$  è -H o un suo catione farmaceuticamente accettabile.

- 5 21. Il coniugato della rivendicazione 14, in cui il coniugato è:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui  $r$  è un numero intero da 1 a 10,  $Y$  è  $-\text{SO}_3\text{M}$  e  $M$  è  $-\text{H}$  o un suo catione farmaceuticamente accettabile.

- 5 22. Il coniugato di una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 21, in cui l'anticorpo è huMy9-6.
23. Il coniugato della rivendicazione 14, in cui il composto è rappresentato dalla seguente formula:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui:

W' è assente o scelto tra -O-, -N(R<sup>c</sup>)-, -N(R<sup>c</sup>)-C(=O)-, -N(C(=O)R<sup>c</sup>)-, -S- o -CH<sub>2</sub>-S-, -CH<sub>2</sub>NR<sup>c</sup>-;

5 R<sup>x</sup> è assente o scelto tra un alchile lineare, ramificato, o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

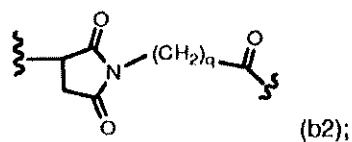
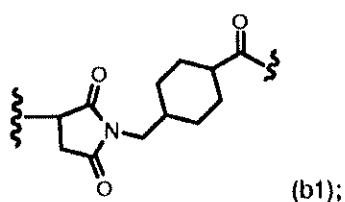
R<sup>c</sup> è -H, un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio o -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, in cui R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio, opzionalmente recante un gruppo amminico secondario (ad es. -NHR<sup>101</sup>) o amminico terziario (-NR<sup>101</sup>R<sup>102</sup>) o un eterociclo con 5 o 6 elementi

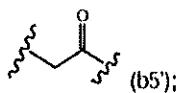
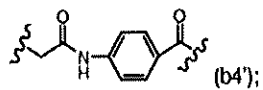
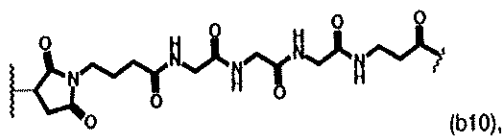
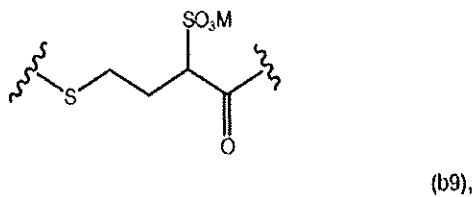
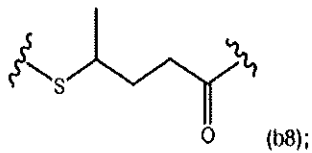
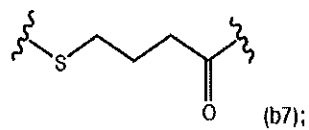
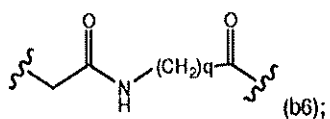
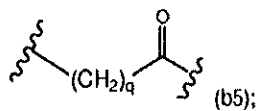
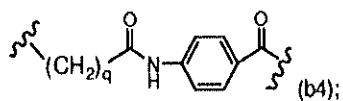
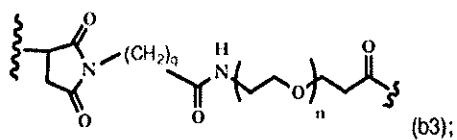
contenente azoto, come piperidina o morfolina, in cui R<sup>101</sup> e R<sup>102</sup> sono ciascuno indipendentemente un alchile, alchenile o alchinile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 10 atomi di carbonio;

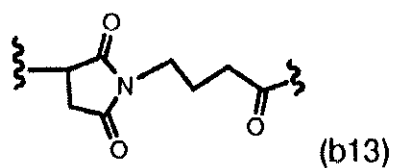
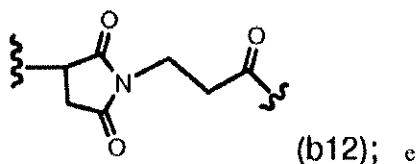
n è un numero intero compreso tra 2 e 6;

Z<sup>s</sup> è collegato al CBA, ed è selezionato da:

5 un legame;







in cui:

q è un numero intero compreso tra 1 e 5; e

M è -H o un catione, come Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>.

5

24. Il coniugato della rivendicazione 23, in cui W' è -N(R<sup>e</sup>)-; R<sup>e</sup> è -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-R<sup>k</sup>, in cui (i) R<sup>k</sup> è -H, un alchile lineare, ramificato o ciclico avente da 1 a 6 atomi di carbonio; o (ii) R<sup>k</sup> è -H o -Me, n è 4, e q è 2.

25. Il coniugato della rivendicazione 23 o 24, in cui:

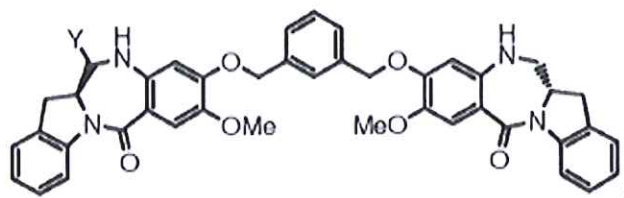
- 10 la doppia linea = tra N e C rappresenta un legame singolo o doppio legame, a condizione che, quando esso è un doppio legame, X è assente e Y è -H, e quando è un legame singolo, X è -H; Y è -OH o -SO<sub>3</sub>M;
- M è -H o un catione farmaceuticamente accettabile (*ad es.* Na<sup>+</sup>);
- X' e Y' sono entrambi -H;
- 15 A e A' sono entrambi -O-;
- R<sub>6</sub> è -OMe; e
- R<sup>x</sup> è un alchile lineare o ramificato avente da 1 a 6 atomi di carbonio.

26. Il coniugato di una qualsiasi delle rivendicazioni 13 - 25, in cui l'agente di legame cellulare è un anticorpo, un anticorpo a catena singola, un frammento di anticorpo che si lega specificatamente alla cellula bersaglio, un anticorpo monoclonale, un anticorpo monoclonale a catena singola, o un frammento di un anticorpo monoclonale che si lega in modo specifico ad una cellula bersaglio, un anticorpo chimerico, un frammento di anticorpo chimerico che si lega specificatamente alla cellula bersaglio, un anticorpo a dominio, un frammento di anticorpo a dominio che si lega specificatamente alla cellula bersaglio, un anticorpo sottoposto a resurfacing, un anticorpo sottoposto a resurfacing a catena singola o un frammento di anticorpo sottoposto a resurfacing, un anticorpo monoclonale, un anticorpo monoclonale a catena singola, o un suo frammento di anticorpo monoclonale, un anticorpo umanizzato, un anticorpo umanizzato a catena singola, o un suo frammento di anticorpo monoclonale, un anticorpo umanizzato, un anticorpo umanizzato a catena singola, o un frammento di anticorpo umanizzato, una linfocina, un ormone, una vitamina, un fattore di crescita, un fattore di stimolazione delle colonie, o una molecola di trasporto dei nutrienti.

27. Composizione farmaceutica comprendente il coniugato di qualsiasi delle rivendicazioni 13 a 25 e un supporto farmaceuticamente accettabile.

15

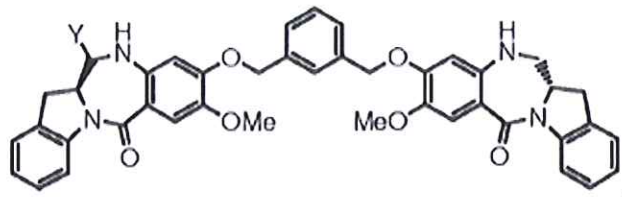
28. Composto come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, coniugato come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 26 o composto rappresentato dalla seguente formula:



20 o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui Y è -H o -SO<sub>3</sub>M (ad es. Y è -SO<sub>3</sub>M), e M è -H o un suo catione farmaceuticamente accettabile per l'uso come medicinale.



29. Composto come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12 , un coniugato come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 26 o un composto rappresentato dalla seguente formula:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui Y è -H o -SO<sub>3</sub>M (ad es. Y è -SO<sub>3</sub>M) e M è -H o un suo catione farmaceuticamente accettabile, per l'uso in un metodo per inibire la crescita cellulare anomala o per trattare un disturbo proliferativo, una malattia autoimmune, un disturbo osseo-distruttivo, malattie infettive, malattie virali, malattie fibrotiche, disturbi neurodegenerativi, pancreatite o malattie renali in un mammifero comprendente la somministrazione a detto mammifero di una quantità terapeuticamente efficace del composto o del coniugato e, opzionalmente, un agente chemioterapico.

10


30. Il composto o coniugato per l'uso della rivendicazione 29, che serve a trattare:

- (i) una condizione selezionata dal gruppo costituito da: cancro, artrite reumatoide, sclerosi multipla, malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), rigetto di trapianto, lupus, miosite, infezione e immunodeficienza; o
- (ii) un cancro

15

opzionalmente, in cui il cancro è selezionato dal gruppo costituito da: cancro della mammella, cancro del colon, cancro del cervello, cancro alla prostata, cancro al rene, cancro del pancreas, cancro dell'ovaio, cancro di testa e collo, melanoma, cancro del colon-retto, cancro gastrico, cancro squamoso, cancro del polmone a piccole cellule, cancro del polmone non a piccole cellule, cancro testicolare, carcinoma a cellule di Merkel, glioblastoma, neuroblastoma, cancro degli organi linfatici e malignità ematologica tra cui leucemia (leucemia linfoblastica acuta (ALL), leucemia mieloide acuta (AML), leucemia linfatica cronica (LLC) , leucemia mieloide cronica (LMC), leucemia acuta monocitica (AMOL), leucemia a cellule capellute (HCL), leucemia prolinfocitica a cellule T (T-PLL), leucemia granulosa a grandi cellule T, leucemia a

20

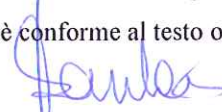


Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

5 cellule T adulte), linfoma (piccolo linfoma linfocitico (SLL), linfomi di Hodgkin (linfoma di Hodgkin a sclerosi nodulare, a cellularità mista, ricco in linfociti, con o senza linfocitopenia e a predominanza linfocitaria nodulare), linfomi non-Hodgkin (tutti i sottotipi), leucemia linfocitica cronica/piccolo linfoma linfocitico, leucemia prolinfocitica a cellule B, linfoma linfoplasmacitico (come macroglobulinemia di Waldenstrom), linfoma della zona marginale splenica, neoplasie  
10 delle plasmacellule (mieloma delle plasmacellule, plasmocitoma, malattie di deposito di immunoglobuline monoclonali, malattie delle catene pesanti), linfoma a cellule B della zona marginale extranodale (linfoma MALT), linfoma a cellule B della zona marginale nodale (NMZL), linfoma follicolare, linfoma delle cellule del mantello, linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma a grandi cellule B del mediastino (timo), linfoma intravascolare a grandi cellule B, linfoma a effusione primaria, linfoma/leucemia di Burkitt, leucemia prolinfocitica a cellule T, leucemia linfocitica granulosa a grandi cellule  
15 T, leucemia aggressiva a cellule NK, leucemia/ linfomi a cellule T adulte, linfoma a cellule NK/T extranodali (tipo nasale), linfoma a cellule T tipo enteropatia, linfoma a cellule T epatosplenico, linfoma a cellule NK blastiche, micosi fungoide/sindrome di Sezary, disordini linfoproliferativi a cellule T primarie CD30-positive cutanee, linfoma anaplastico a grandi cellule cutanee primarie, papulosi linfomatoide, linfoma a cellule T angioimmunoblastiche, linfoma periferico a cellule T (non specificate), linfoma anaplastico a grandi cellule) e mieloma multiplo (mieloma delle plasmacellule o  
malattia di Kahler).

31. Il composto o coniugato per l'uso della rivendicazione 29, che serve a trattare la leucemia mieloide acuta (LMA).

20 Il sottoscritto dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale.



Dott.ssa Tiziana SANTORO (USBM-CPI-072 BM)

TAVOLA I

Figura 1. Schema sintetico di linker 1b e dimeri 1d-g

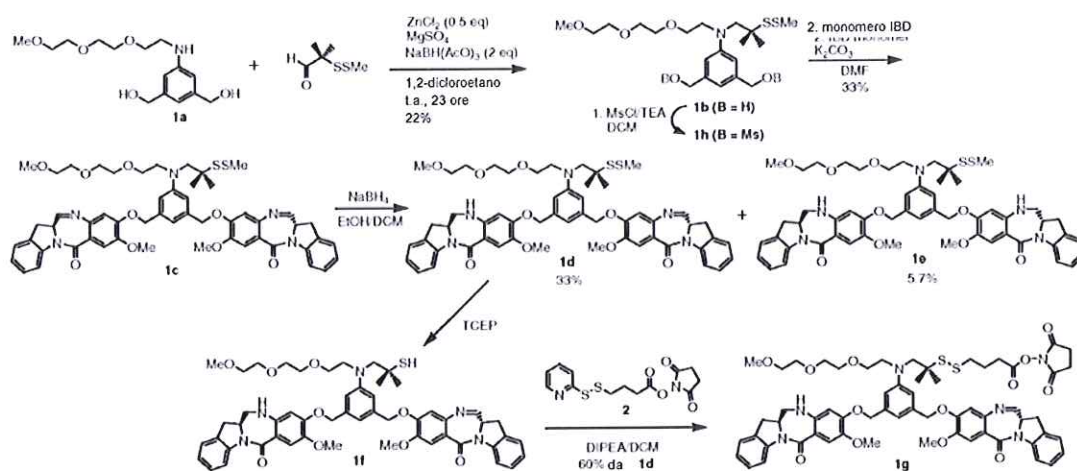
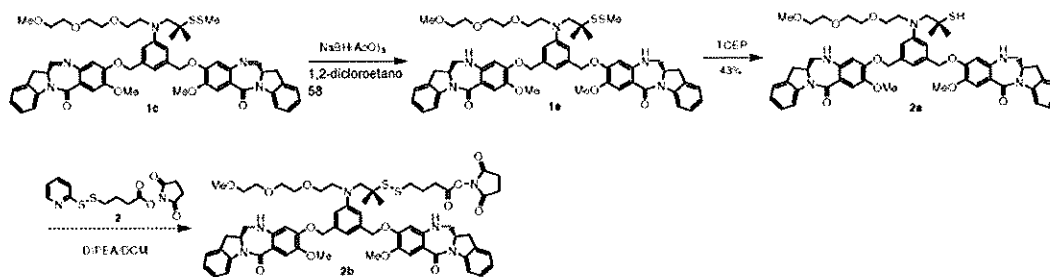
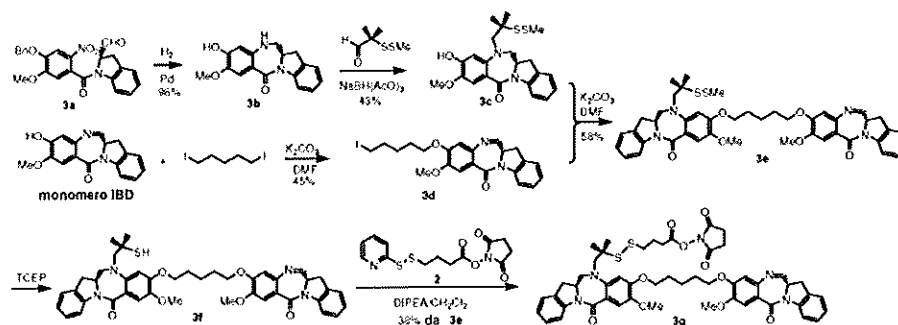


Figura 2. Schema sintetico di dimeri 2a-b



5

Figura 3. Schema sintetico di dimeri 3e-g



5 Figura 4. Schema sintetico di dimeri 4b-e

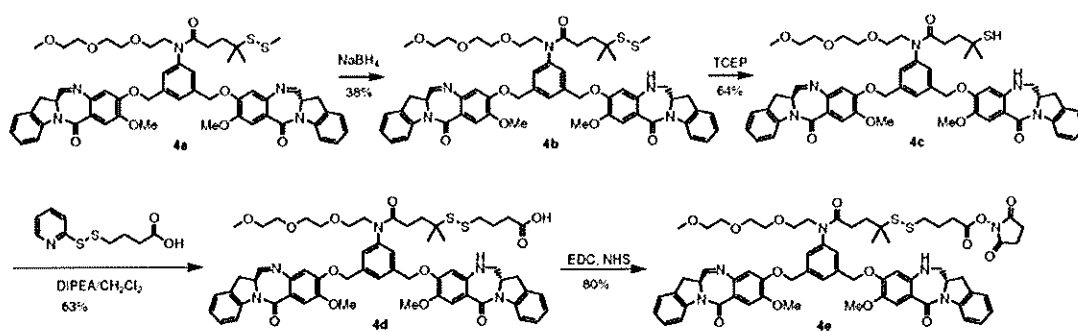


Figura 5. Schema sintetico di linker 5e e dimeri 5g-j

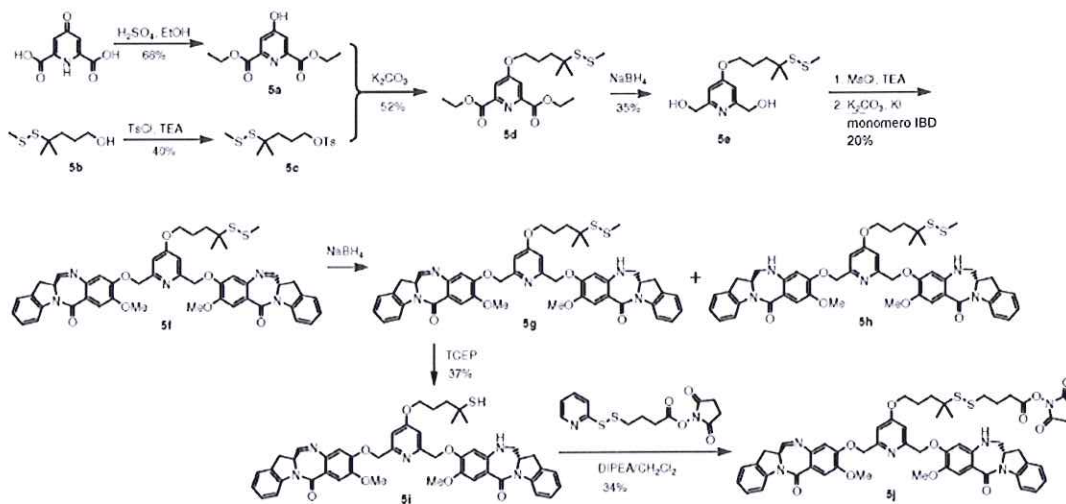
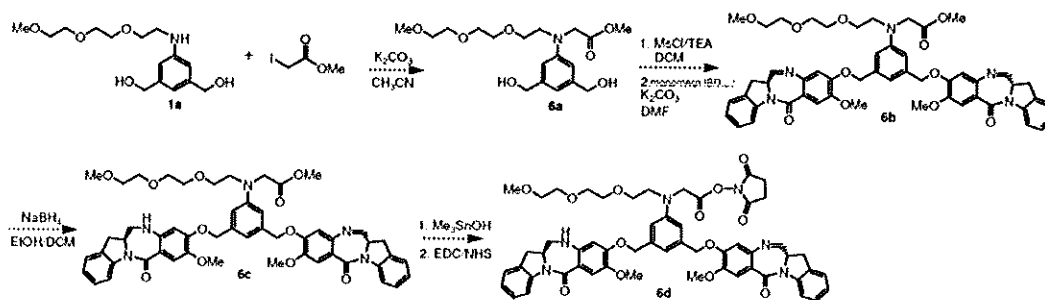


Figura 6. Schema Sintetico di linker 6a e dimeri 6c-d



5 Figura 7. Schema Sintetico di Linker PEG modificati 7b e dimeri 7d-f

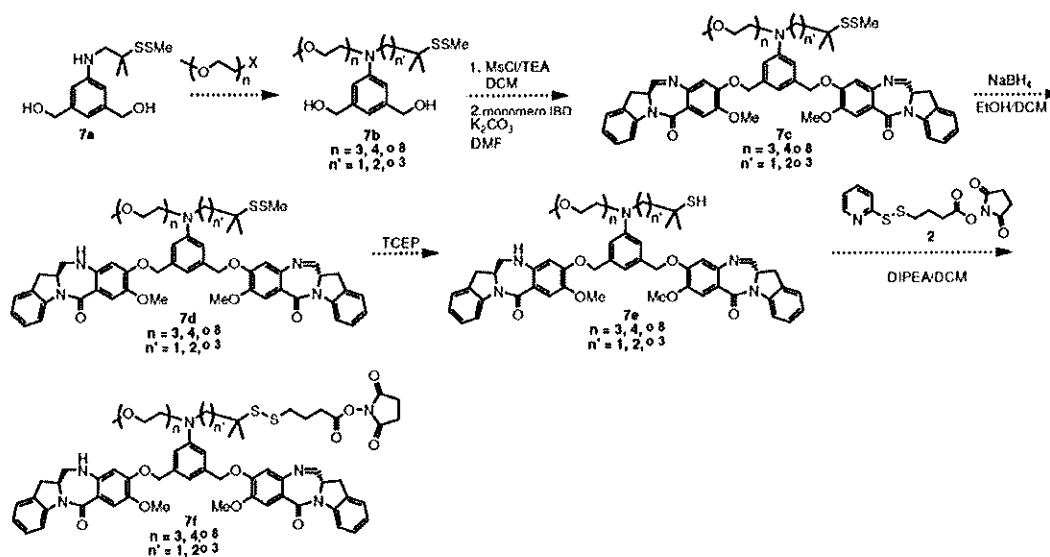
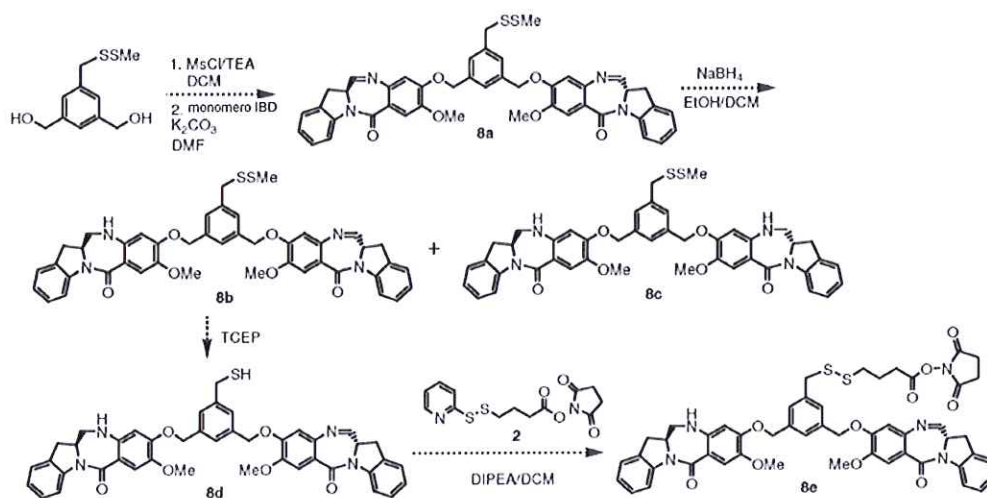
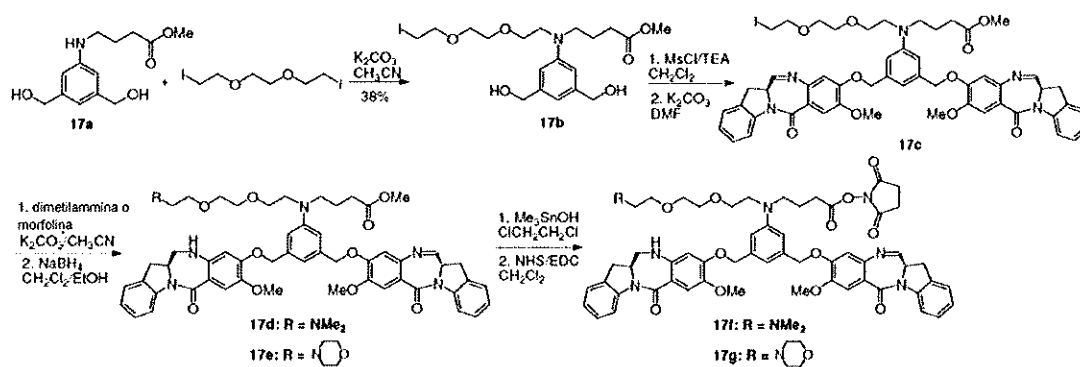


Figura 8. Schema sintetico di dimeri contenenti tiolo 8b-e



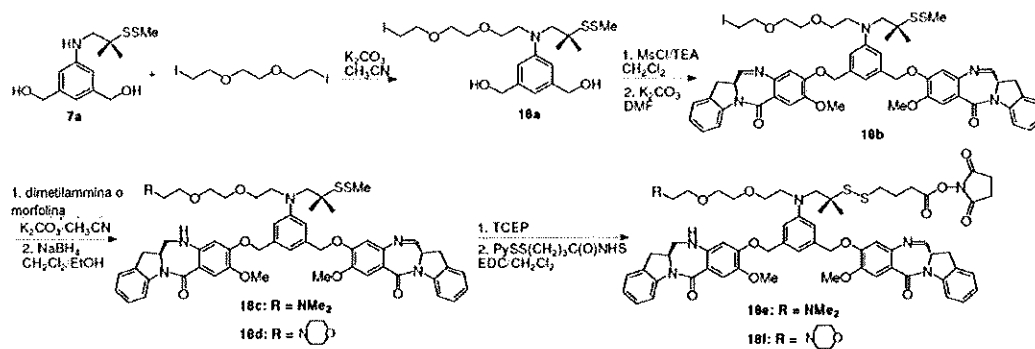
5

5 Figura 9. Schema sintetico di dimeri 17d-g contenenti un'ammina terziaria

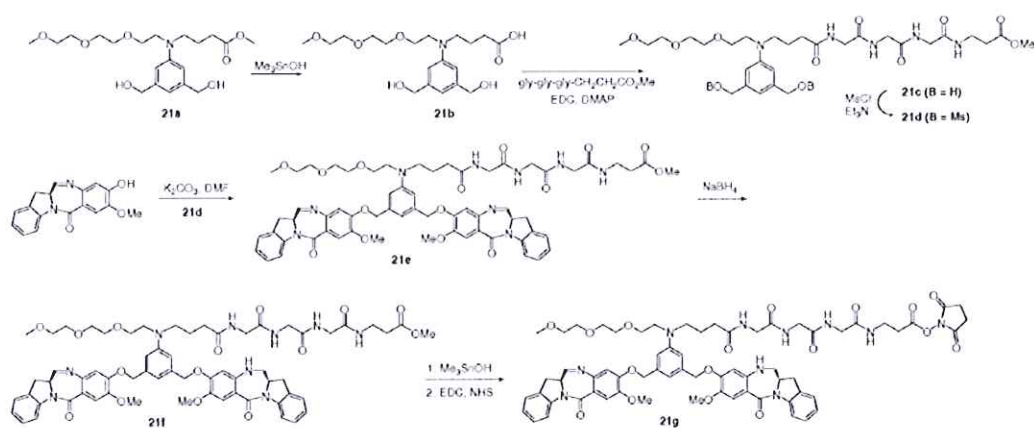


5

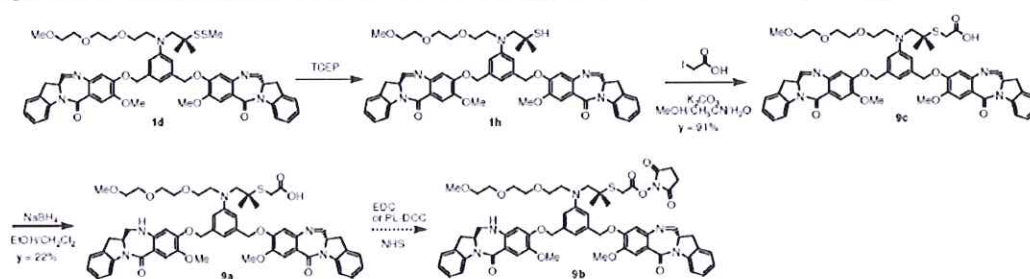
Figura 10. Schema sintetico di dimeri 18c-f contenenti un'ammina terziaria



5 Figura 11. Schema sintetico di dimeri 21f-g contenenti un linker peptidico



5 Figura 12A. Schema sintetico dei dimeri 9a-b collegabili con tioacetile in un passaggio



5 Figura 12B. Schema sintetico alternativo dei dimeri 9a-b collegabili con tioacetile in un passaggio

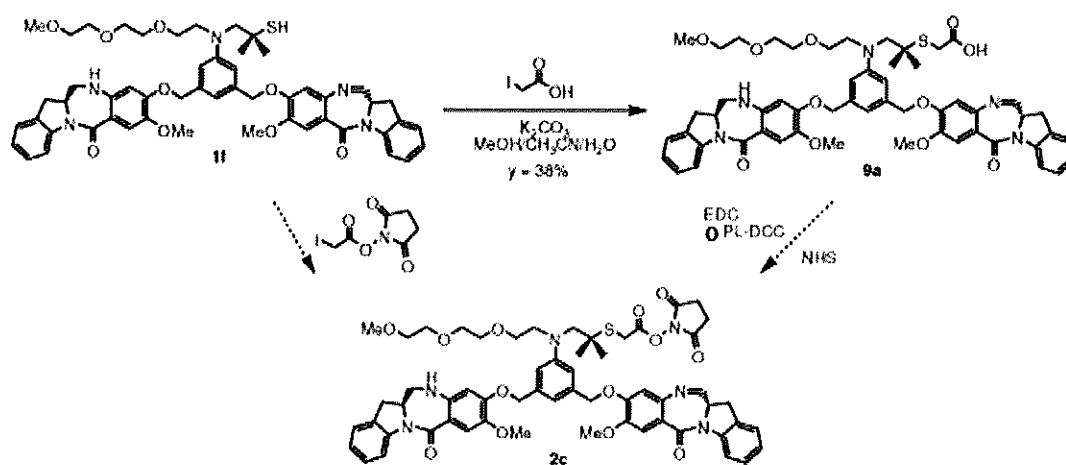
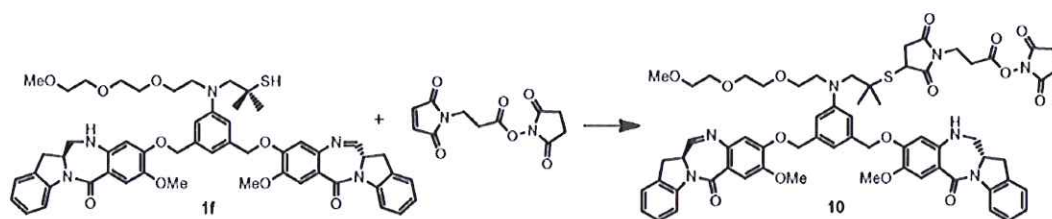


Figura 13. Schema sintetico del dimero 10 collegabile con BMPS in un passaggio



5

Figura 14. Schema sintetico del dimero 11 collegabile con SMCC in un passaggio

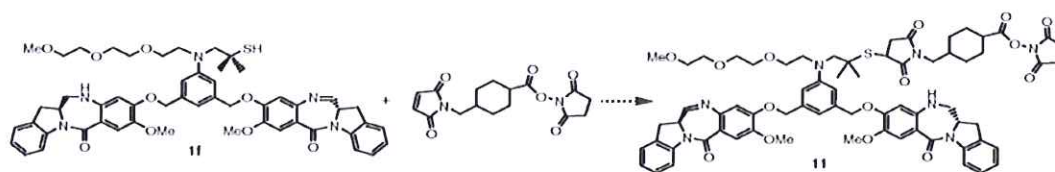
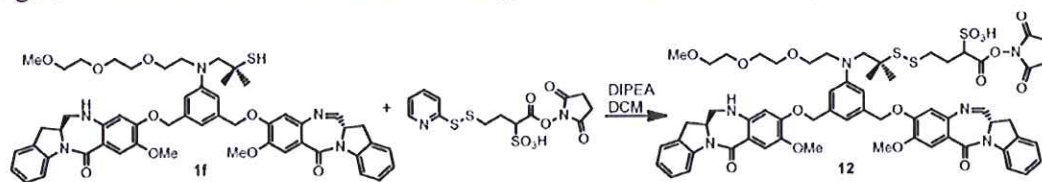


Figura 15. Schema sintetico del dimero 12 collegabile con solfo-SPDB in un passaggio



5

Figura 16. Schema sintetico del dimero 13 collegabile con SPP in un passaggio

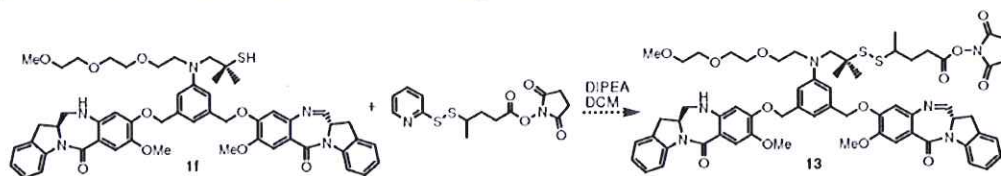
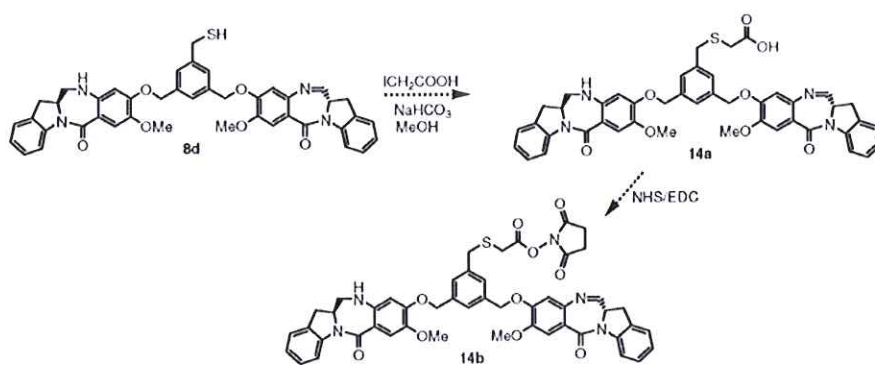
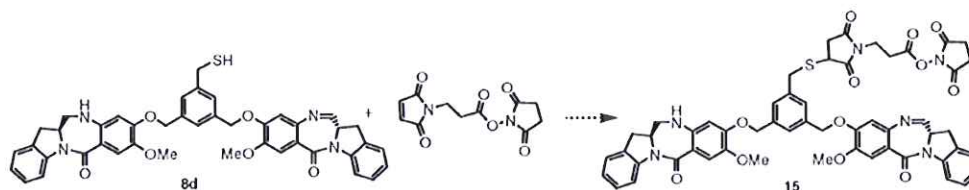


Figura 17. Schema sintetico dei dimeri 14a-b collegabili con tioacetile in un passaggio

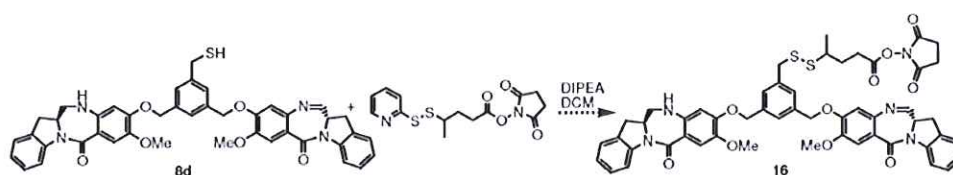


5

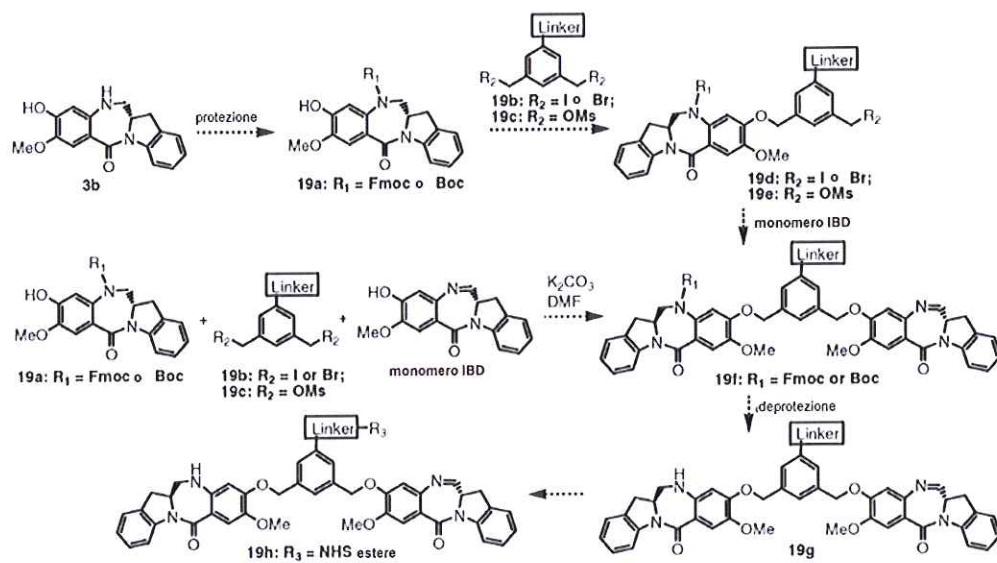
Figura 18. Schema sintetico del dimero 15 collegabile con BMPS in un passaggio



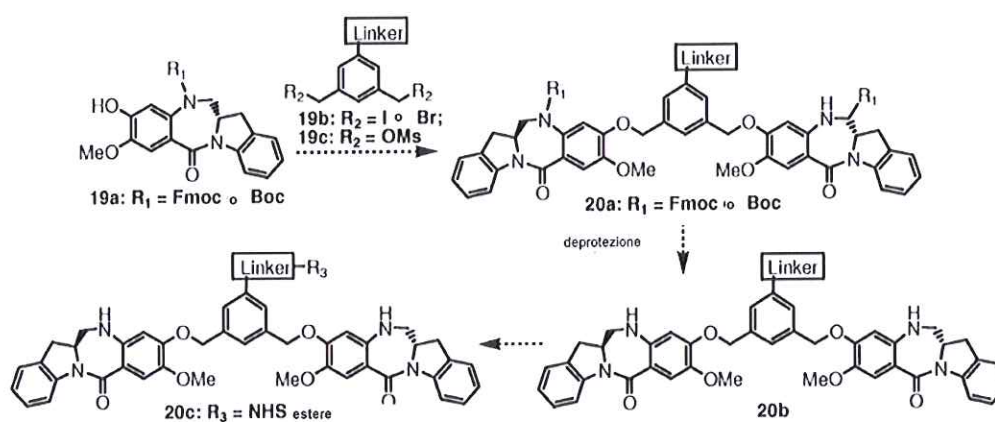
5 Figura 19. Schema sintetico del dimero 16 collegabile con SPP in un passaggio



5 Figura 20. Schema sintetico di una sintesi di un dimero di monoimmuna in due passaggi



5 Figura 21. Schema sintetico di una sintesi di un dimero di-ridotto in due passaggi



5 Figura 22. Schema di coniugazione a un passaggio

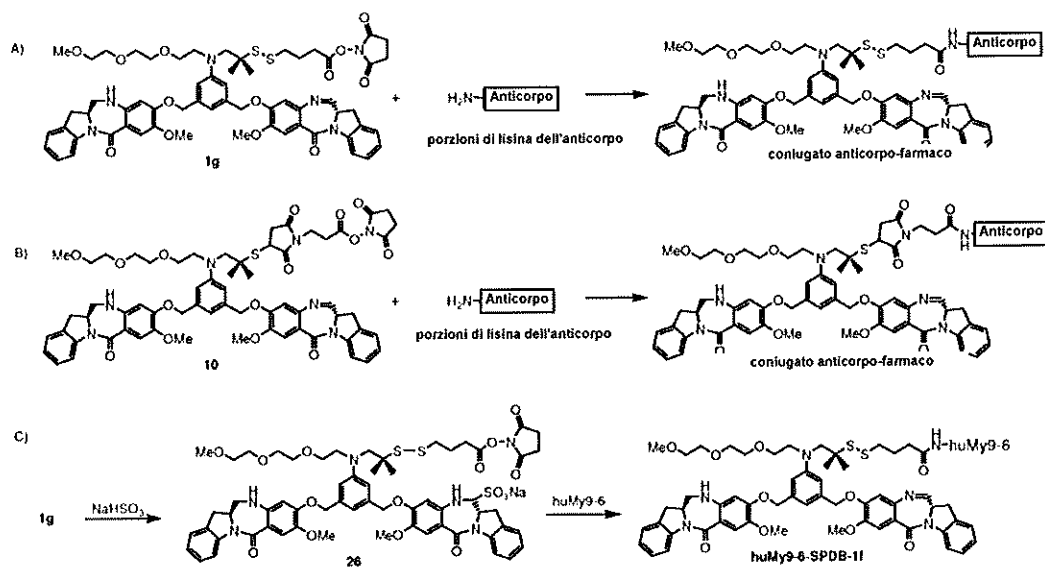
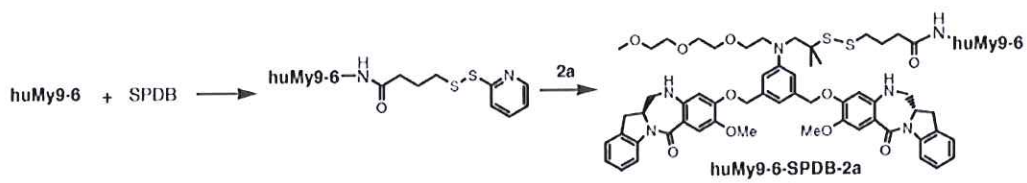
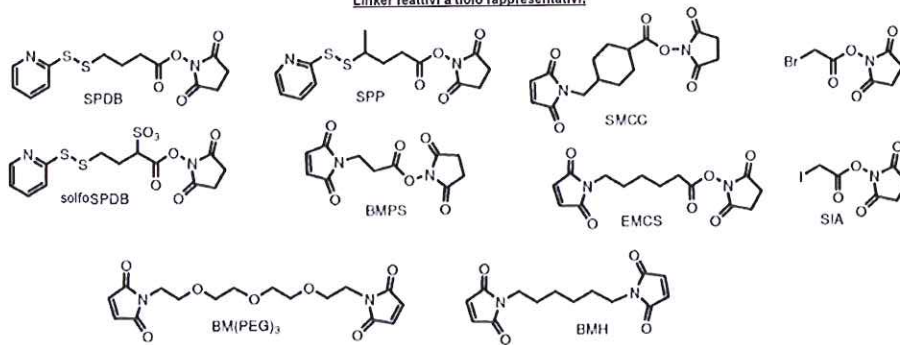


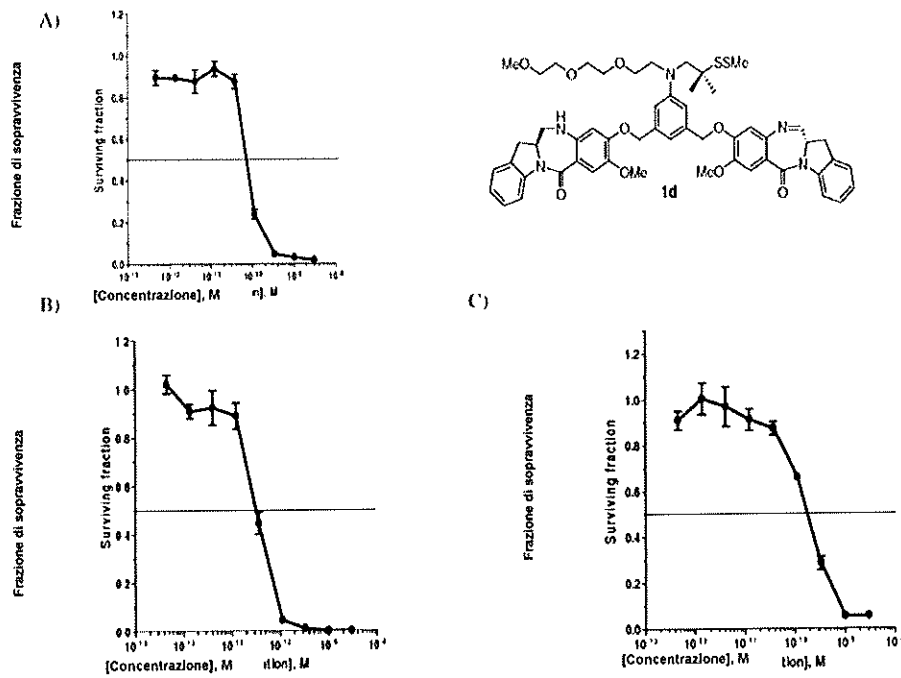
Figura 23. Schema di coniugazione a due passaggi



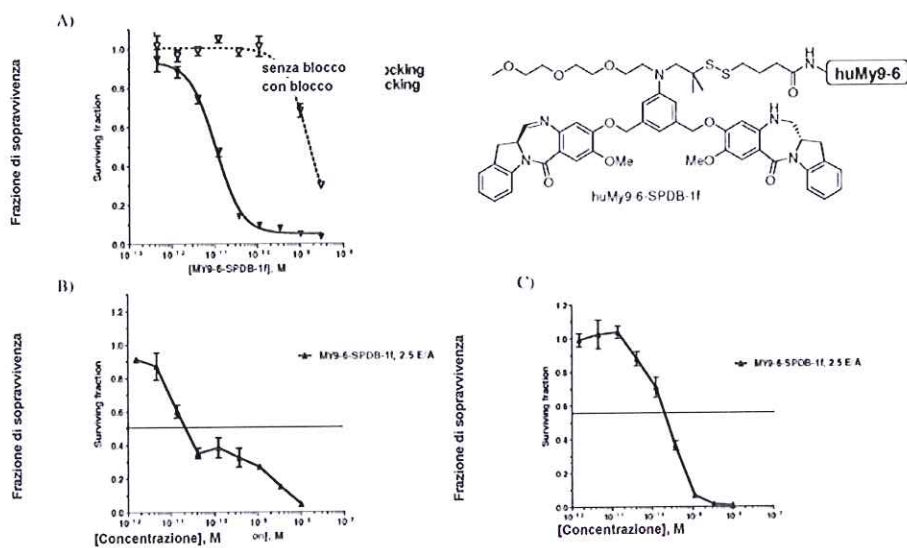
Linker reattivi a tiolo rappresentativi:



5 Figura 24. Attività anti-proliferativa di dimero metilditio 1d contro (A) cellule Namalwa, (B) cellule HL60/QC e (C) cellule KB



5 Figura 25. Attività antiproliferativa di huMY9-6-SPDB-1f contro (A) cellule HL60/QC ( $Ag^+$ ) con e senza il blocco dei siti antigene-leganti, (B) cellule HL60/ATCC ( $Ag^+$ ) e (C) cellule NB-4 ( $Ag^+$ )



5 Figura 26. Attività antiproliferativa di huFOLR1-SPDB-If contro cellule KB ( $Ag^+$ ) con e senza il blocco dei siti antigene-leganti

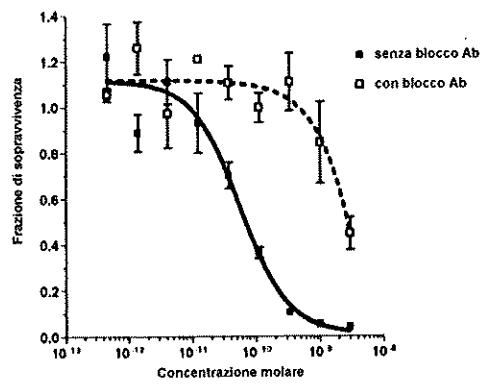
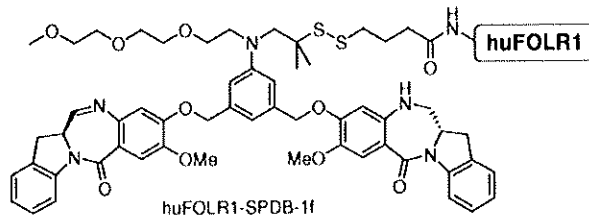
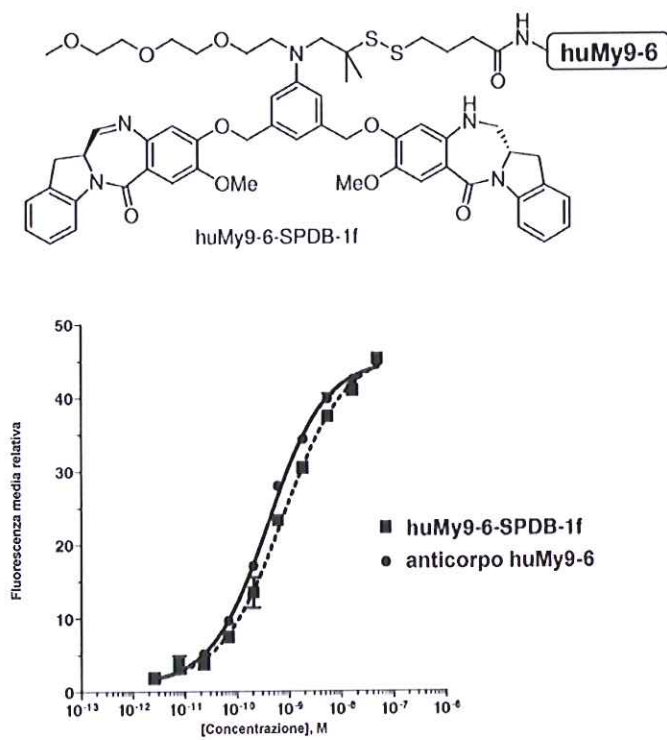
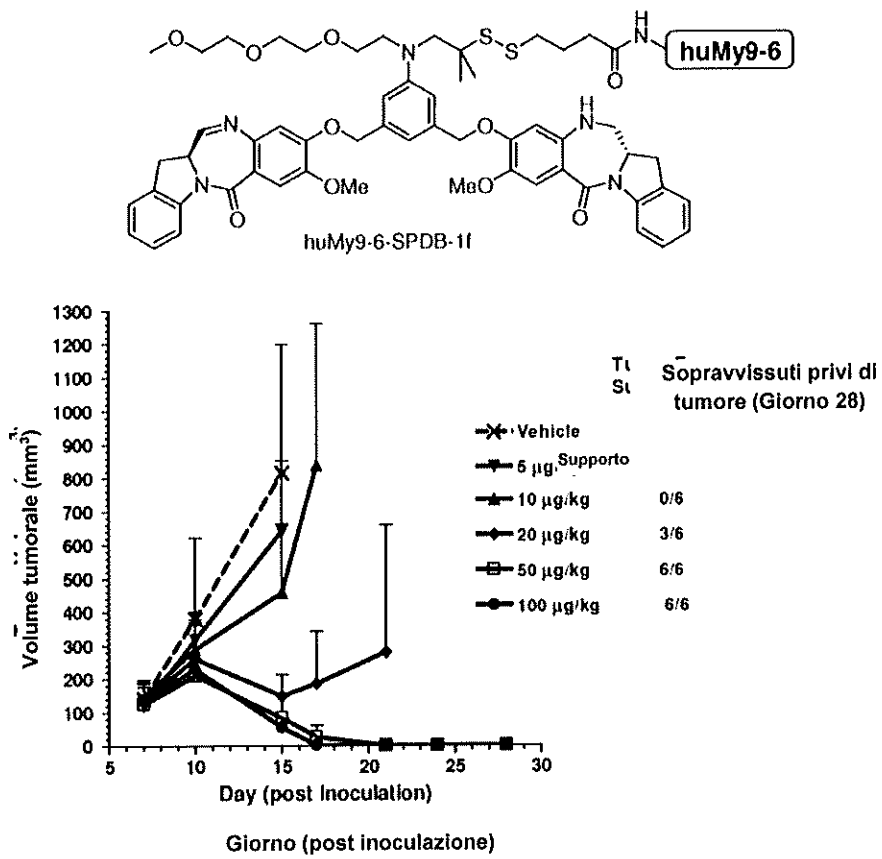


Figura 27. Affinità di legame di huMY9-6-SPDB-1f (analisi FACS)



5 Figura 28. Efficacia *in vivo* di huMy9-6-SPDB-1f in topi nudi portanti in tumore HL60/QC.



5 Figura 29. Attività antiproliferativa di huMY9-6-SPDB-1f contro (A) cellule HL60/QC, (B) cellule HL60/ATCC, (C) cellule NB-4 e (D) cellule HEL 92.1.7 dilinea cellulare antigene-positiva

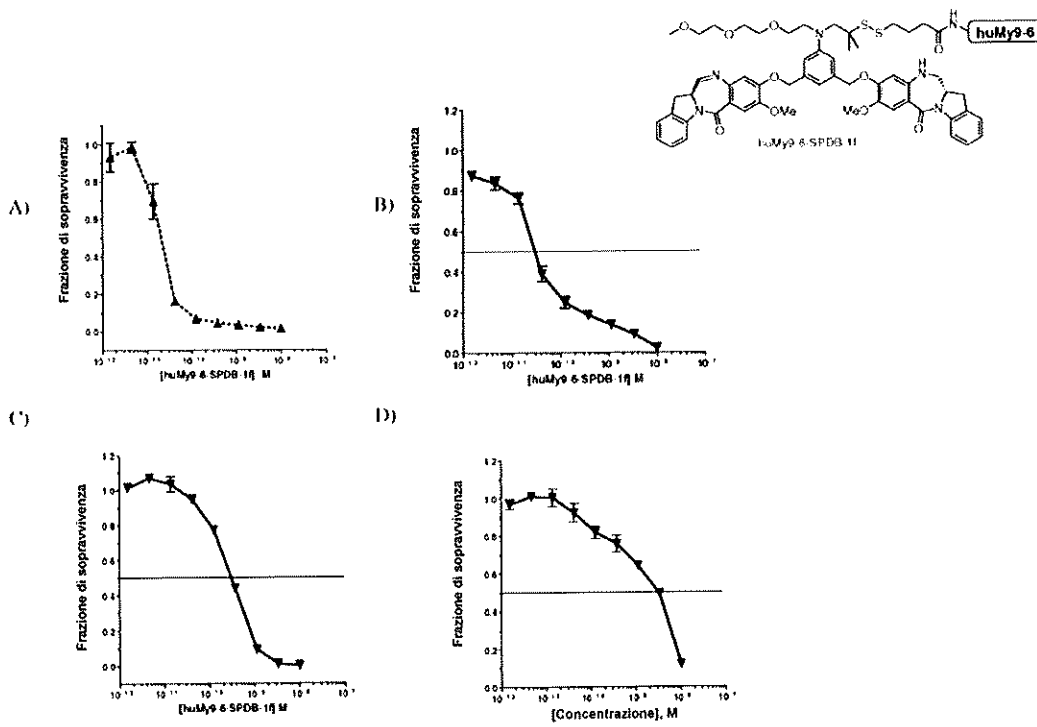


Figura 30. Schema sintetico per disolfuri 27e-h linker contenenti tioetere

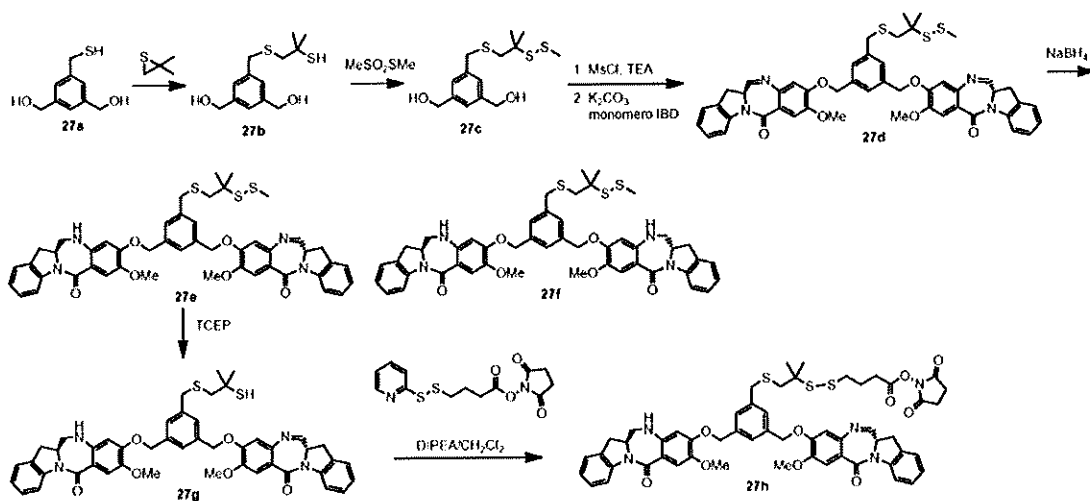


Figura 31. Schema sintetico di dimeri 28c-f

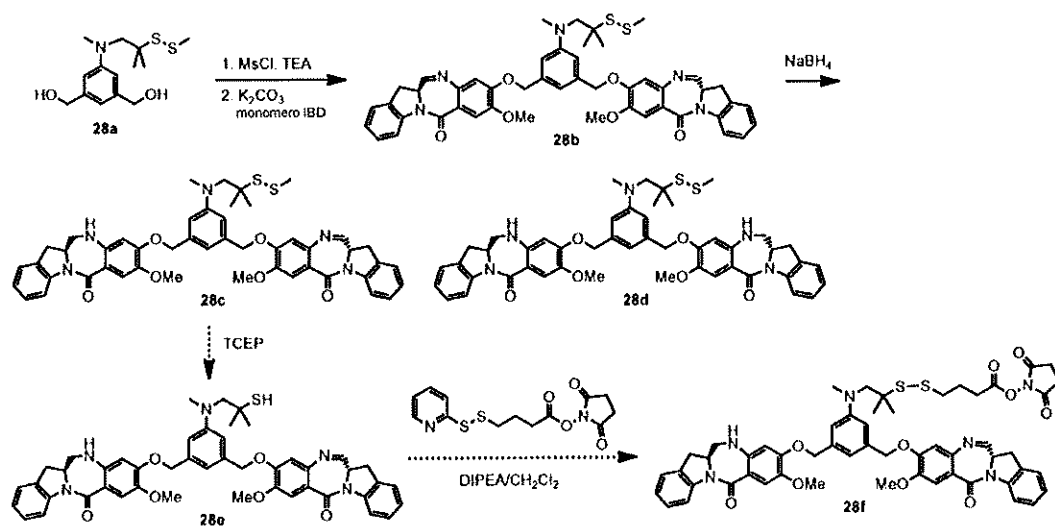
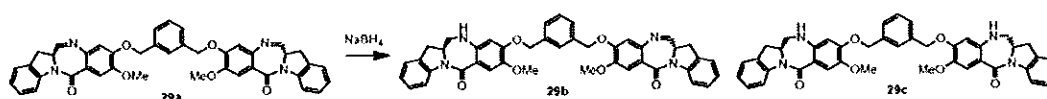
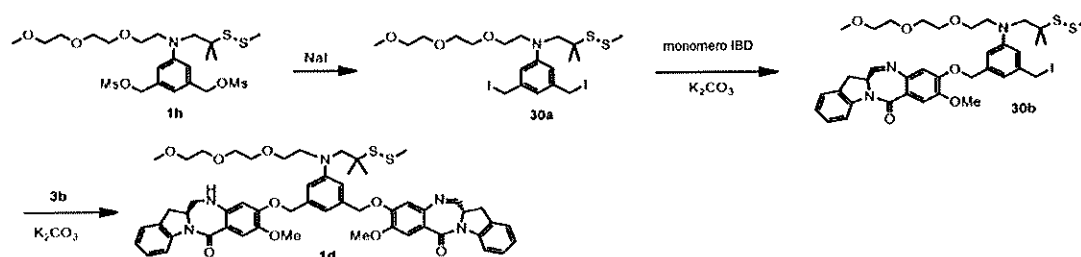


Figura 32. Schema sintetico per dimeri 29b-c legati a fenile

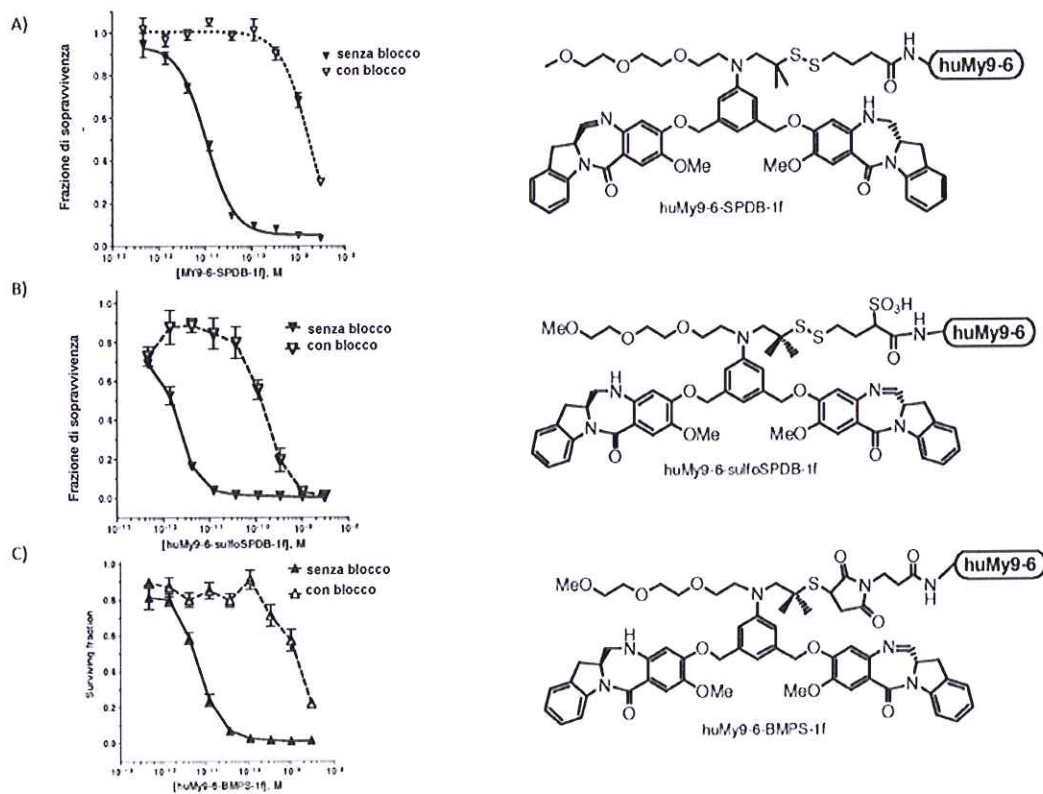


5

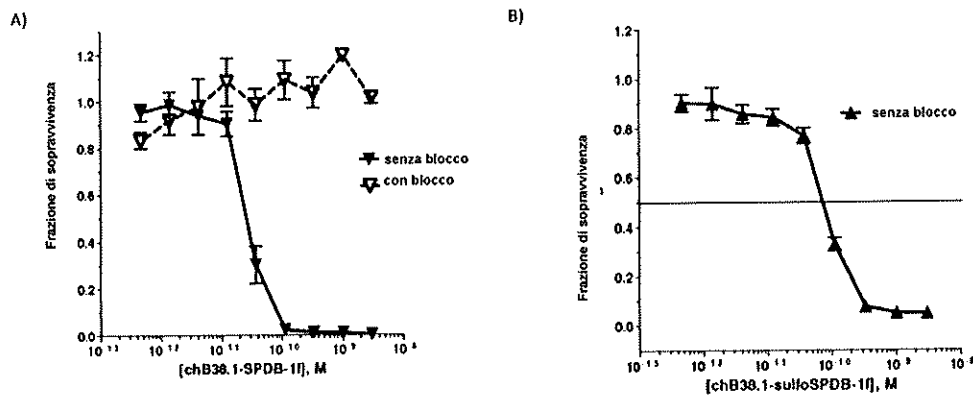
Figura 33. Sintesi alternativa in due passaggi di dimero mono-immidico



5 Figura 34. Attività antiproliferativa che confronta (A) huMy9-6-SPDB-1f e (B) huMy9-6-solfoSPDB-1f e (C) huMy9-6-BMPS-1f contro cellule HL60/QC ( $Ag^+$ ) con e senza blocco dei siti antigen-leganti



5 Figura 35. Attività antiproliferativa che confronta (A) chB38.1-SPDB-1f e (B) chB38.1-solfoSPDB-1f contro cellule COLO205 (Ag<sup>+</sup>)



5

Figura 36. Efficacia *in vivo* di huMy9-6-SPDB-1f in topi portanti tumore HL60/QC

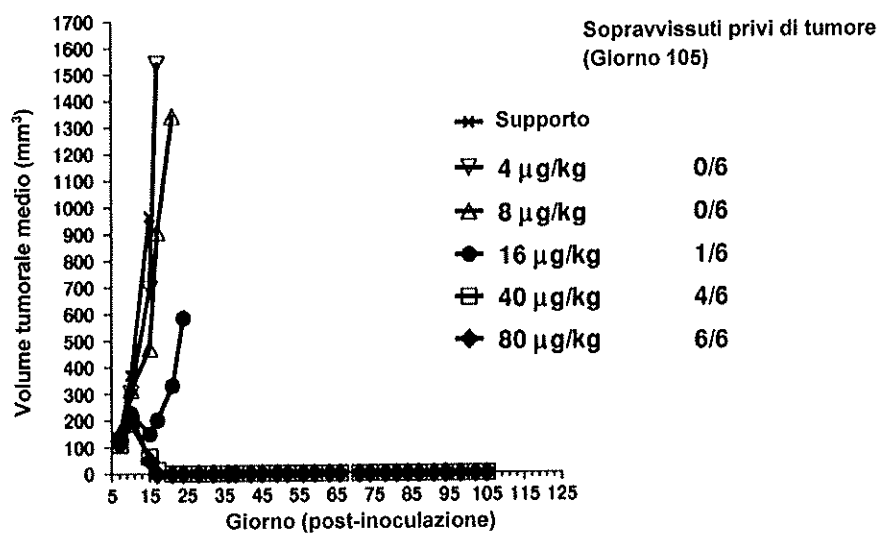


TAVOLA XXXIII

Figura 37. Efficacia *in vivo* di huFOLR1-SPDB-1f in topi portanti tumore KB

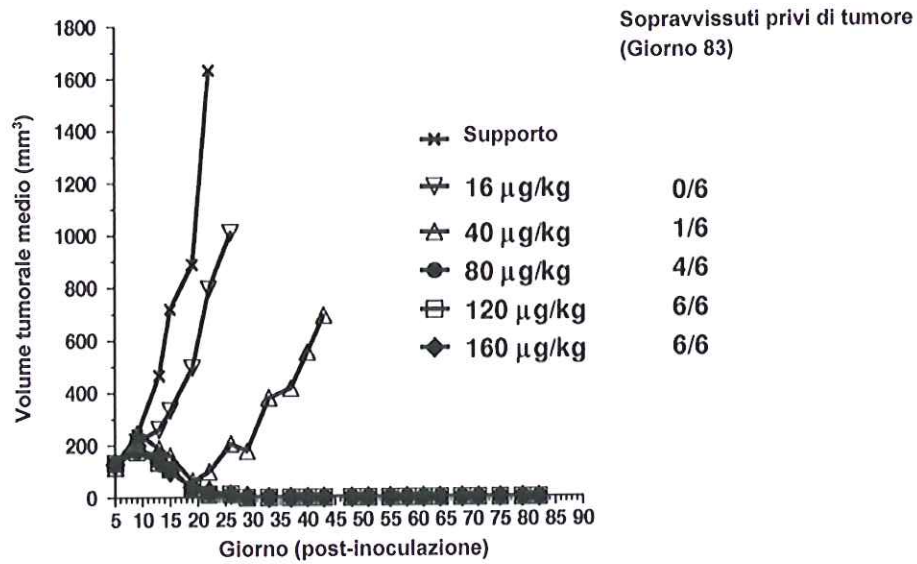


Figura 38. Schema sintetico del Composto 1

5

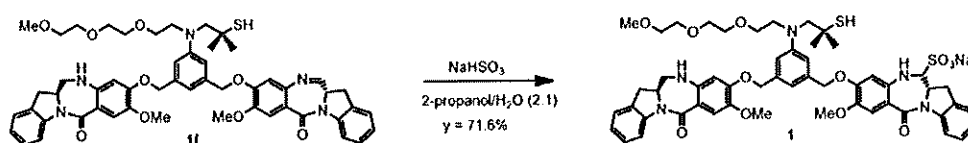


Figura 39. Schema sintetico del Composto 1d con 5-etil-2-metilpiridina borano (PEMB)

10

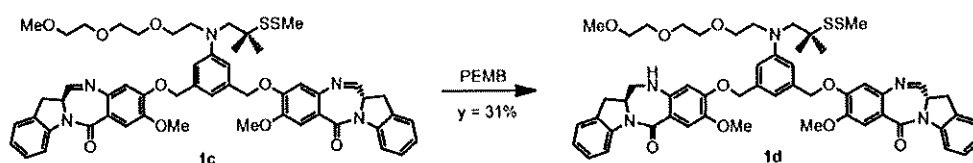
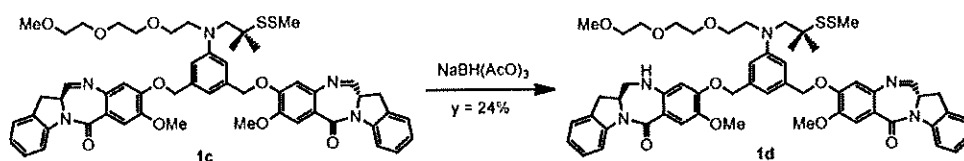
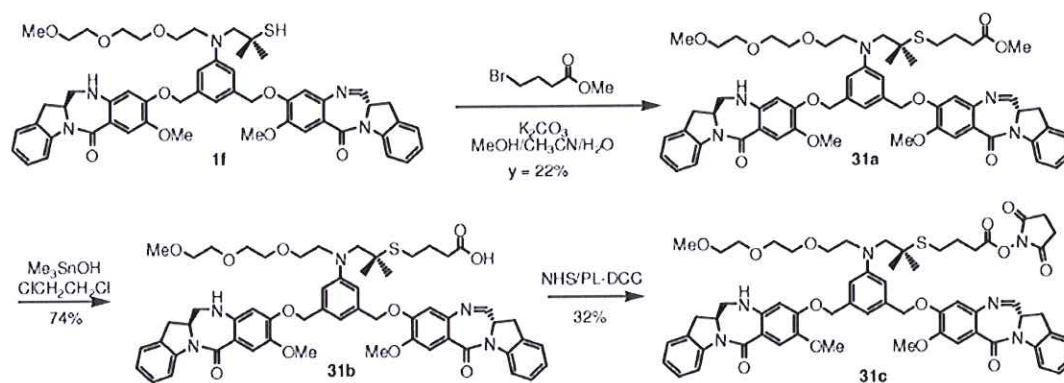


Figura 40. Schema sintetico del Composto 1d con triacetossiboroidruo di sodio (STAB)

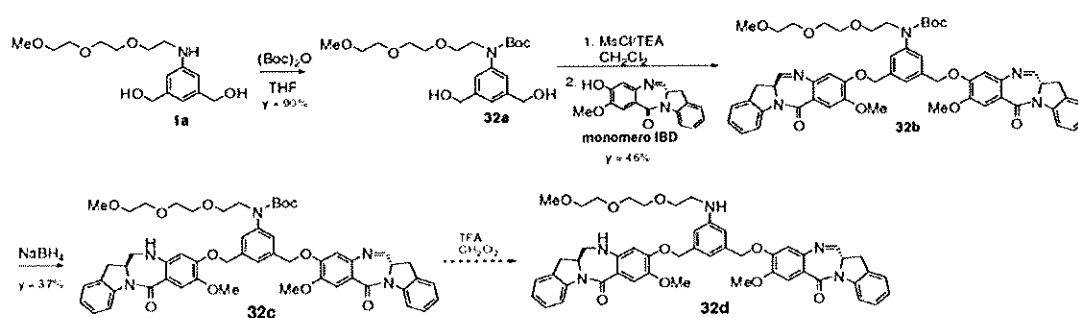
15



5 Figura 41. Schema sintetico del Composto 31a-c.



5 Figura 42. Schema sintetico del Composto 32d



5 Figura 43. Schema sintetico dei Composti Ii e 12a

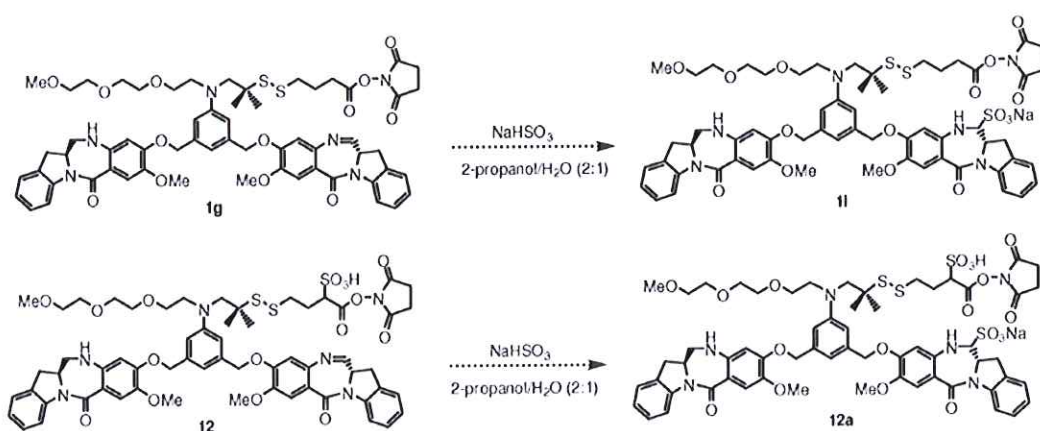
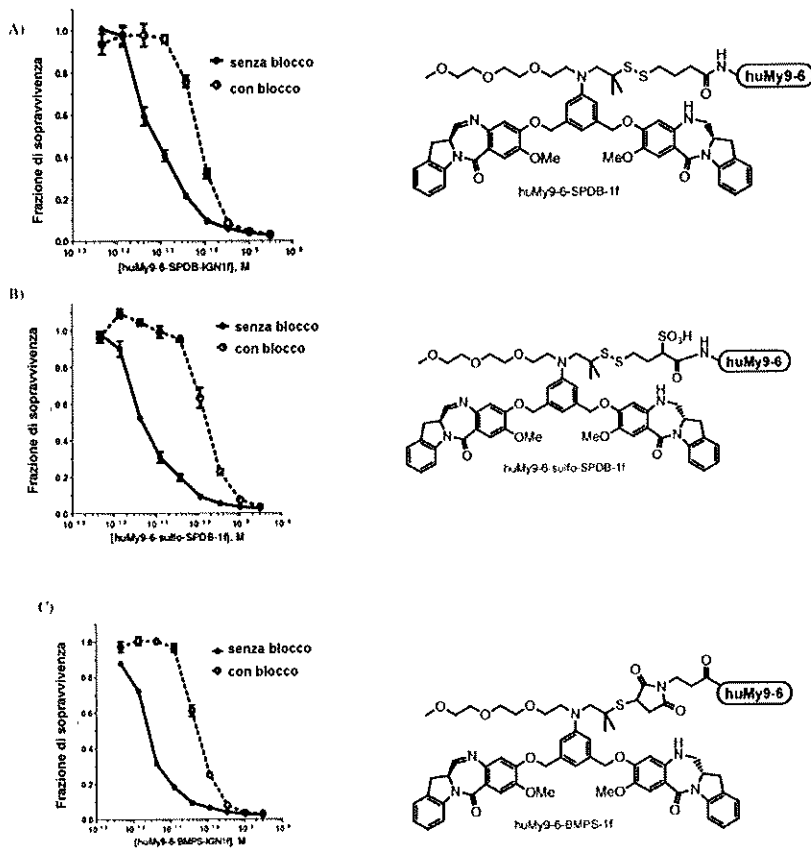


TAVOLA XXXVIII

Figura 44. Attività antiproliferativa che confronta (A) huMy9-6-SPDB-1f, (B) huMy9-6-solfoSPDB-1f e (C) huMy9-6-BMPS-1f contro cellule OCI-AML3 (Ag<sup>+</sup>) con e senza blocco dei siti antigene-leganti

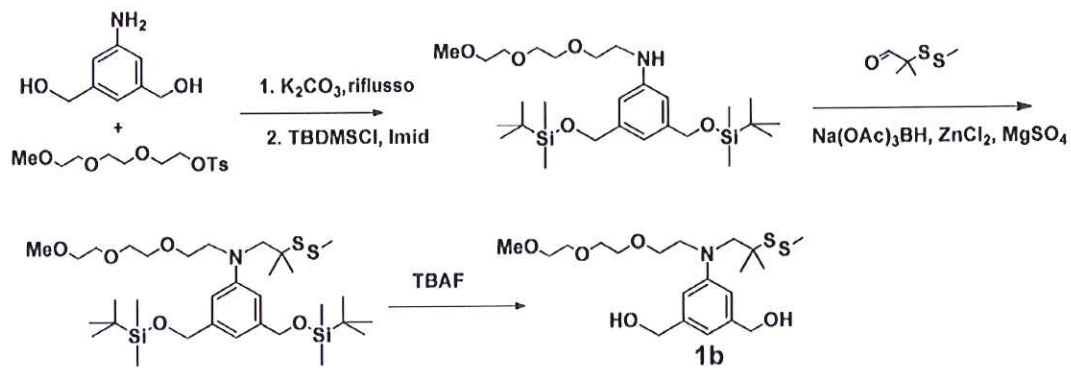
5



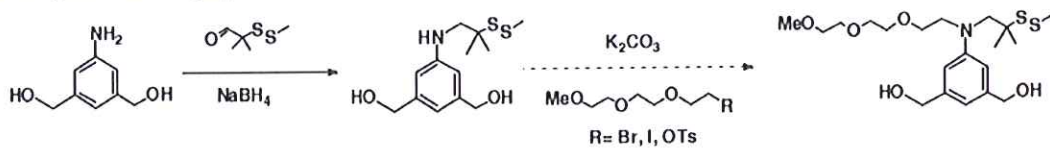
- 5 Figura 45. Sintesi alternativa dell'acido 4-(benzilossi)-5-metossi-2-nitrobenzoico utilizzato nella preparazione del monomero IBD



- 5 Figura 46. Sintesi alternativa di (5-((2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)(2-metil-2(metildisolfanil)propil)ammino)-1,3-fenilene)dimetanolo (1b)



- 10 Figura 47. Sintesi alternativa di (5-((2-(2-(2-metossietossi)etossi)etil)(2-metil-2(metildisolfanil)propil)ammino)-1,3-fenilene)dimetanolo (1b)



5 Figura 48. Schema di sintesi alternativo per la sintesi di un dimero di monoimmuna in due passaggi

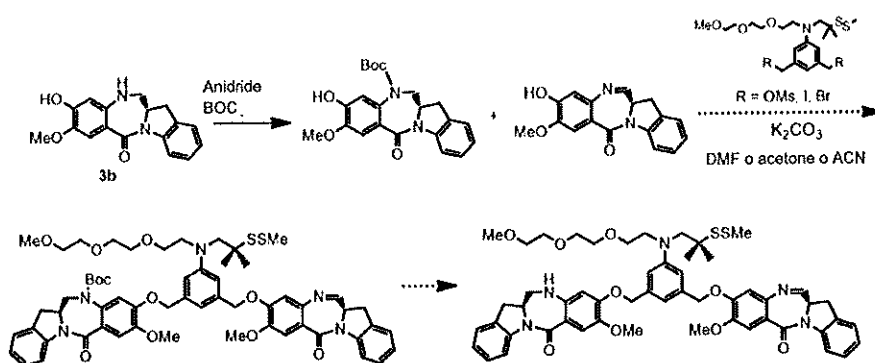


Figura 49. Potenza dei coniugati contro varie linee cellulari misurata mediante i valori di IC<sub>50</sub> (nM)

coniugato	HL60/QC	MOI.M-13	NB4	HEP2.1.7	OCI-AML3
huMy9-6-SPDB-1f	0.005	0.003	0.3	0.5	0.01
huMy9-6-sulfo-SPDB-1f	0.006	0.002	0.4	0.05	0.008
huMy9-6-BMPS-1f	0.003	0.001	0.04	0.04	0.003

TAVOLA XLII

5 Figura 50. Efficacia *in vivo* di huMy9-6-solfo-SPDB-1f in topi portanti tumore MOLM-13

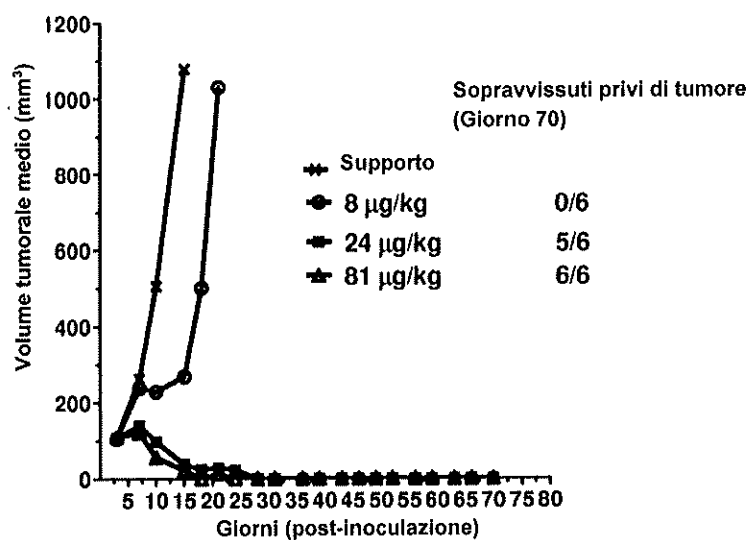
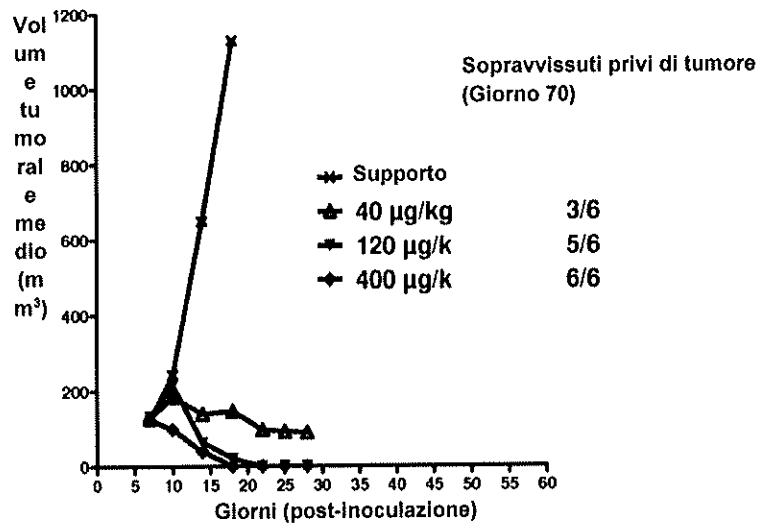




TAVOLA XLIII

5 Figura 51. Efficacia *in vivo* di huMy9-6-solfo-SPDB-1f in topi portanti tumore NB4



5 Figura 52. Efficacia *in vivo* di huMy9-6-BMPS-1f in topi portanti tumore HL60/QC

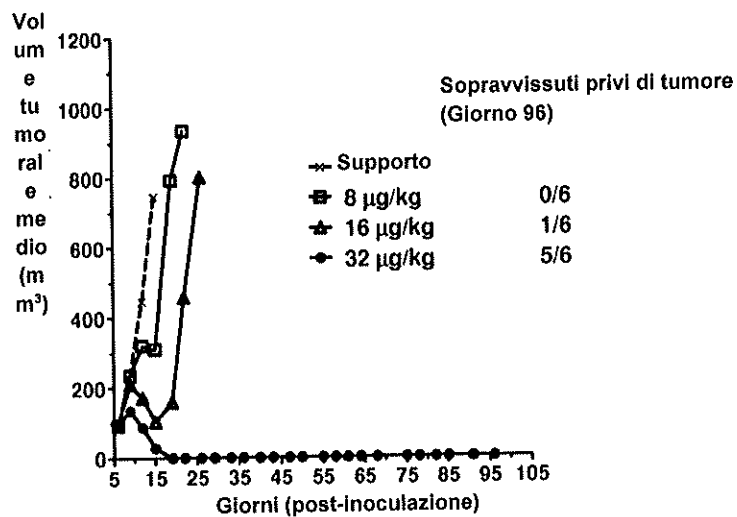
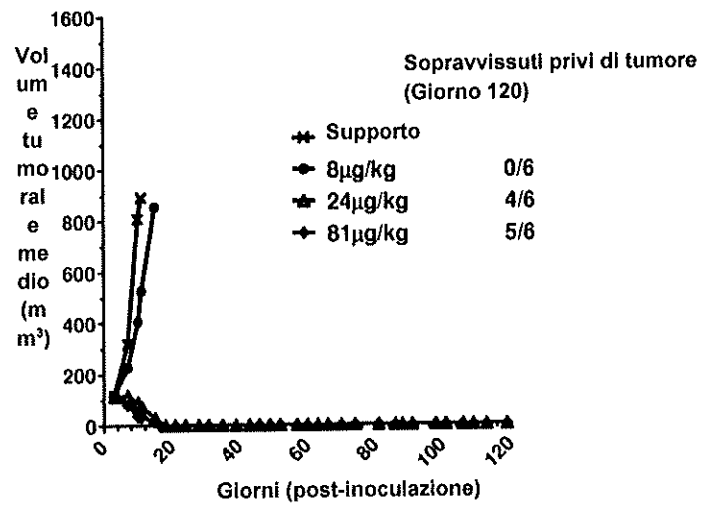


TAVOLA XLV

5 Figura 53. Efficacia *in vivo* di huMy9-6-BMPS-1f in topi portanti tumore MOLM-13



5

Figura 54. Schema di sintesi rappresentativo per un coniugato di folato solfonato / composto citotossico

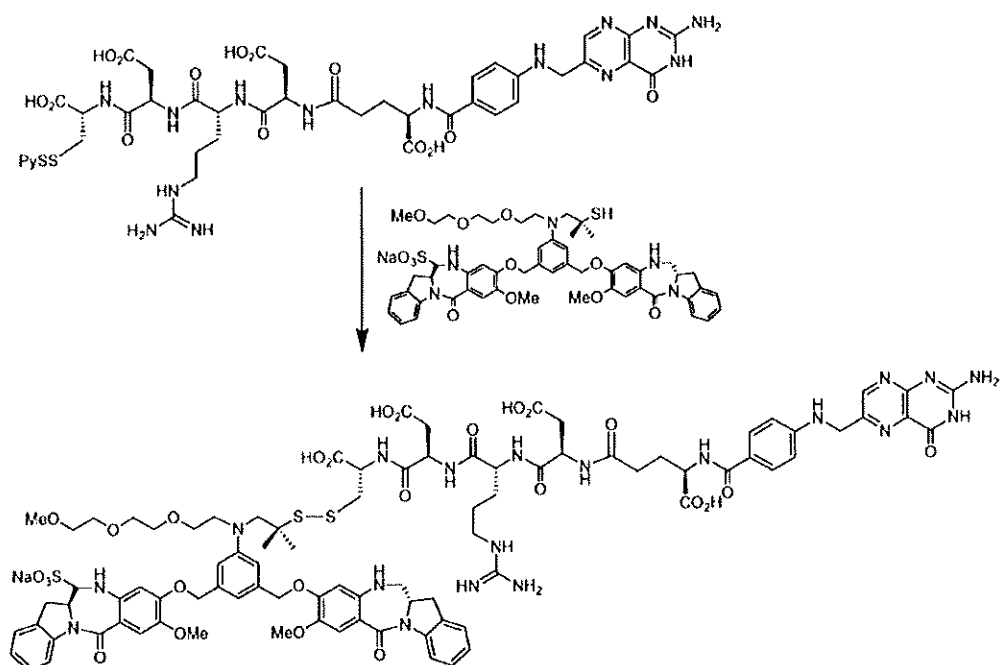
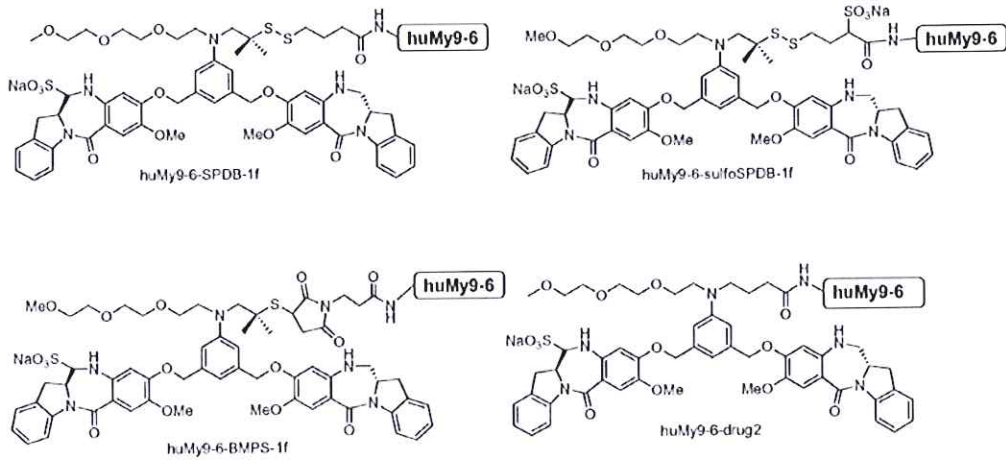


Figura 55. Strutture di diversi coniugati solfonati farmaco-anticorpo (huMy9-6)

5



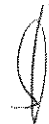
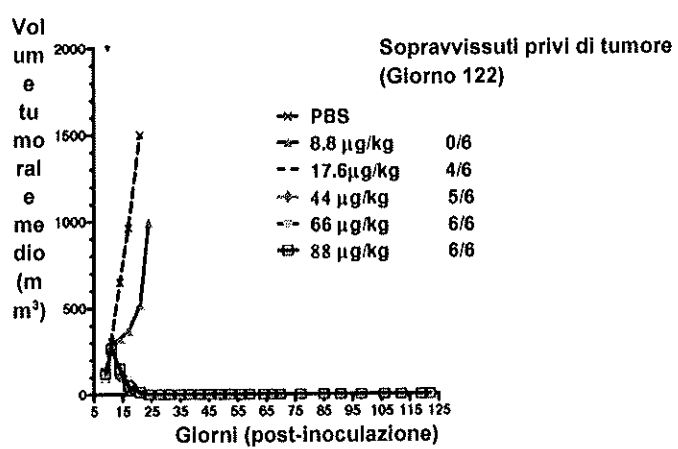
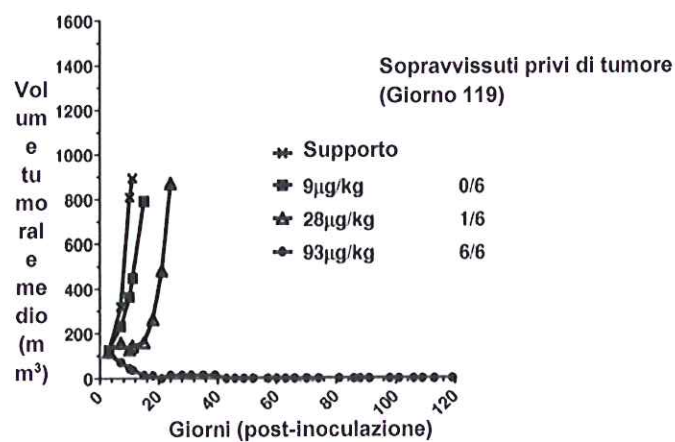


TAVOLA XLVIII

Figura 56. Efficacia *in vivo* di huMy9-6-farmaco 2 in topi portanti tumore HL60/QC

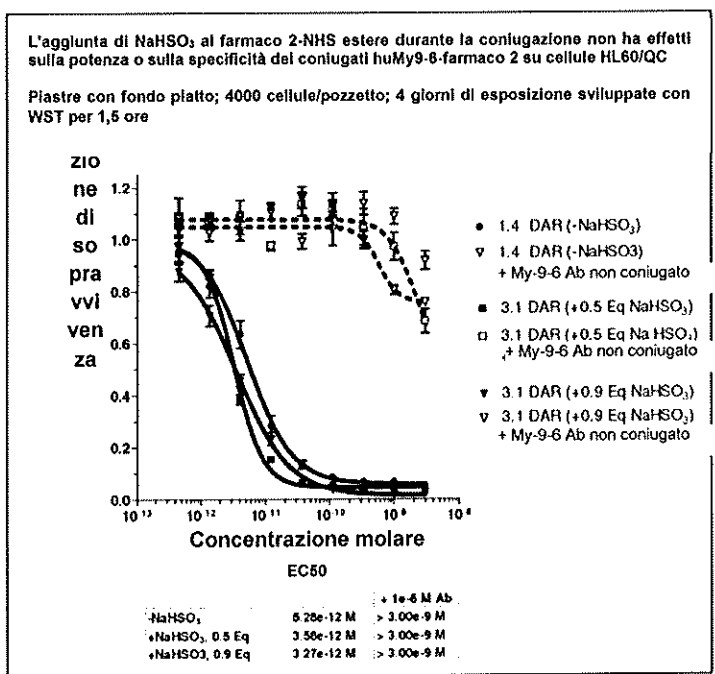


5 Figura 57. Efficacia *in vivo* di huMy9-6-farmaco 2 in topi portanti tumore MOLM-13



5 Figura 58

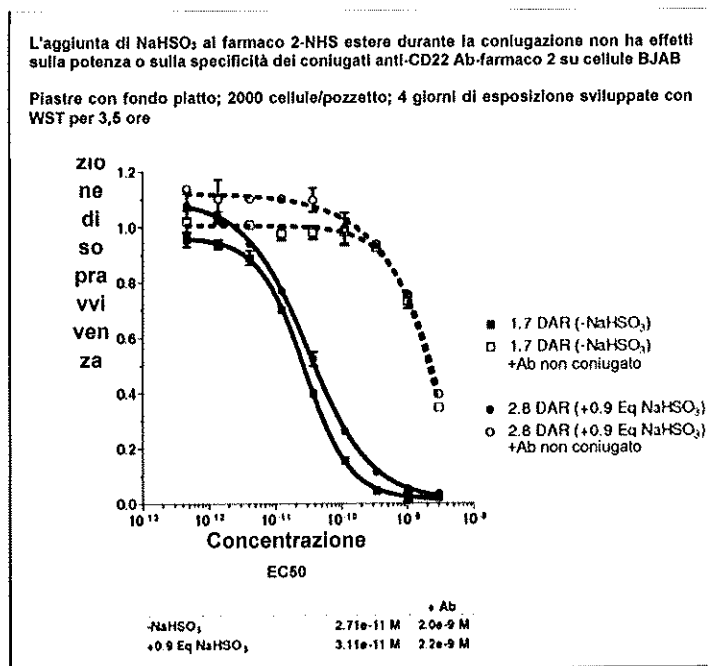
I coniugati HuMy9-6-2, preparati senza e con bisolfito di sodio mostrano una simile citotossicità *in vitro* verso cellule HL60 esprimenti l'antigene CD33



5

Figura 59.

I coniugati anti-CD22Ab-2, preparati senza e con bisolfito di sodio, mostrano una simile citotossicità *in vitro* verso cellule BJAB esprimenti l'antigene CD22.



10

5

Figura 60

