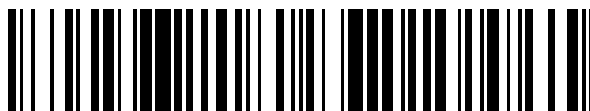


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 699**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07H 15/203 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2017 PCT/EP2017/076162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2018 WO18069490**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2017 E 17791980 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 3525830**

54 Título: **Conjugados de pirrolobenzodiazepina**

30 Prioridad:

14.10.2016 GB 201617466

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

05.11.2021

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**HOWARD, PHILIP WILSON y
GREGSON, STEPHEN JOHN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 874 699 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

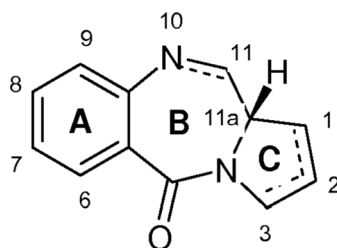
DESCRIPCIÓN

Conjugados de pirrolobenzodiazepina

- 5 La presente invención se refiere conjugados que comprenden pirrolobenzodiazepinas y dímeros relacionados (PBD) y enlazadores de fármaco precursor utilizados para fabricar dichos conjugados.

Antecedentes de la invención

- 10 Algunas pirrolobenzodiazepinas (PBDs) tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferida es PuGpu. El primer antibiótico antitumoral de PBD, la antramycin, se descubrió en 1965 (Leimgruber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se ha informado de una serie de PBDs que se producen naturalmente, y se han desarrollado
- 15 más de 10 rutas de síntesis para varios análogos (Thurston, *et al.*, *Chem. Rev.* 1994, 433-465 (1994)). Miembros de la familia incluyen abeimicina (Hochlowski, *et al.*, *J. Antibiotics*, 40, 145-148 (1987)), chicamicina (Konishi, *et al.*, *J. Antibiotics*, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (Patente Japonesa 58-180 487; Thurston, *et al.*, *Chem. Brit.*, 26, 767-772 (1990); Bose, *et al.*, *Tetrahedron*, 48, 751-758 (1992)), mazetramicina (Kuminoto, *et al.*, *J. Antibiotics*, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi, *et al.*, *J. Antibiotics*, 29, 93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa, *et al.*, *J. Antibiotics*, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu, *et al.*, *J. Antibiotics*, 29, 2492-2503 (1982); Langley y
- 20 Thurston, *J. Org. Chem.*, 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara, *et al.*, *J. Antibiotics*, 41, 702-704 (1988); Itoh, *et al.*, *J. Antibiotics*, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima, *et al.*, *J. Antibiotics*, 25, 437-444 (1972)). Las PBDs son de la estructura general:

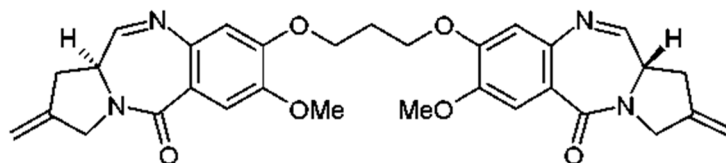


- 25 Ellas difieren en el número, el tipo y la posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos A aromáticos como en sus anillos C de pirrolo, y en el grado de saturación del anillo B. En el anillo B existe ya sea una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)), o un éter metílico de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11 que es el centro electrófilo responsable de la alquilación del ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una
- 30 configuración (S) en la posición C11a quiral que les proporciona un giro hacia la derecha cuando se miran desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional apropiada para isohelicidad con el surco menor del ADN de forma B, conduciendo a un encaje ajustado en el sitio de unión (Kohn, en *Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nueva York, p.p. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230-237 (1986)). Su capacidad para formar un aducto en el surco menor les permite interferir con el procesamiento del ADN, de ahí su uso como agentes
- 35 antitumorales.

- Se describió anteriormente que la actividad biológica de estas moléculas puede potenciarse mediante la unión de dos unidades de PBD entre sí a través de sus funcionalidades de C8/C'-hidroxilo mediante un enlazador de alqueno flexible (Bose, D.S., et ál., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 4939-4941 (1992); Thurston, D.E., et ál., *J. Org. Chem.*, 61, 8141-8147 (1996)). Se cree que los dímeros de PBD forman lesiones de ADN selectivas de la secuencia tales como
- 40 reticulación intercatenarias 5'-Pu-GATC-Py-3' palindrómicas (Smellie, M., et ál., *Biochemistry*, 42, 8232-8239 (2003); Martin, C., et ál., *Biochemistry*, 44, 4135-4147), que se cree son las principales responsables de su actividad biológica.

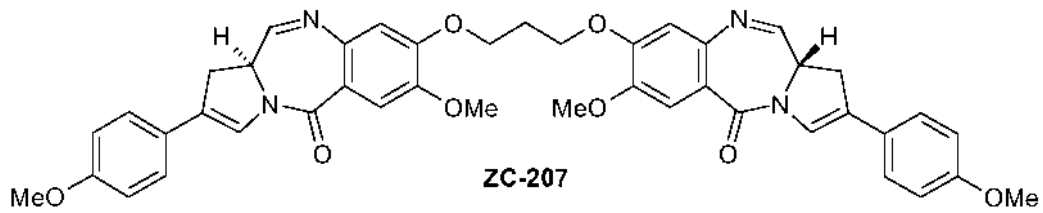
Un ejemplo de un dímero de PBD es SG2000 (SJG-136):

45



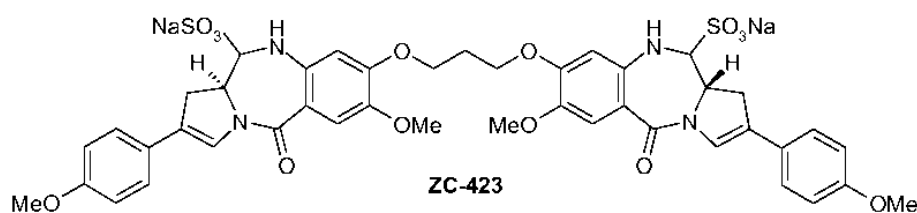
- (Gregson, S., et ál., *J. Med. Chem.*, 44, 737-748 (2001); Alley, M.C., et ál., *Cancer Research*, 64, 6700-6706 (2004); Hartley, J.A., et ál., *Cancer Research*, 64, 6693-6699 (2004)), que se vio implicado en pruebas clínicas como un agente
- 50 independiente, por ejemplo, NCT02034227 que investiga su uso en el tratamiento de leucemia mieloide aguda y leucemia linfocítica crónica (ver: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034227>).

Los compuestos de PBD diméricos que contienen los sustituyentes de arilo C2, tales como SG2202 (ZC-207, se describen en WO 2005/085251:



5

y en WO2006/111759, bisulfitos de dichos compuestos de PBD, por ejemplo, SG2285 (ZC-423):



10

Estos compuestos mostraron ser agentes citotóxicos ampliamente útiles (Howard, P.W., et ál., Bioorg. Med. Chem. (2009), doi: 10.1016/j.bmcl.2009.09.012).

15

WO 2007/085930 describe la preparación de compuestos diméricos de PBD con grupos enlazadores para la conexión a un agente de unión celular, tal como un anticuerpo. El enlazador se encuentra presente en el puente que enlaza las unidades monoméricas de PBD del dímero.

20

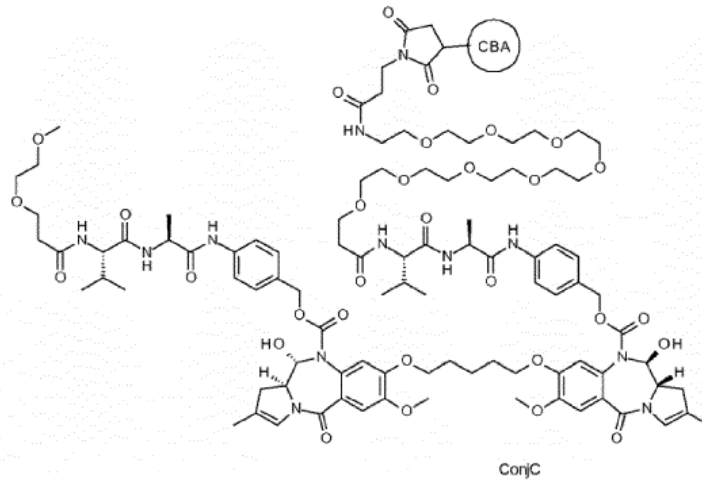
Los compuestos diméricos de PBD que tienen grupos enlazadores para la conexión a un agente de unión celular, tal como un anticuerpo, se describen en WO 2011/130598. El enlazador en estos compuestos se une a una de las posiciones N10 disponibles y, en general, se escinde mediante la acción de una enzima en el grupo enlazador. Si la posición N10 no unida se encuentra protegida con un grupo de terminación, los grupos de terminación ejemplificados tienen la misma activación de escisión que el enlazador al anticuerpo.

25

WO 2014/057074 describe dos conjugados diméricos de PBD unidos mediante la posición N10 en un monómero, el otro monómero de PBD se encuentra en forma de imina.

30

WO 2015/052322 describe un conjugado de dímero de PBD unidos mediante la posición N10 en un monómero, el otro monómero de PBD se encuentra en forma de imina. También describe un conjugado dimérico de PBD específico enlazado mediante la posición N10 en un monómero, el otro monómero de PBD tiene un grupo de terminación con la misma activación de escisión que el enlazador al anticuerpo:



Descripción de la invención

5 La presente invención proporciona un PBD y conjugados diméricos relacionados donde el grupo N10-C11 que no se encuentra unido a la unidad de ligando es un grupo de terminación de β-glucurónido. La activación de escisión para la unidad enlazadora a la unidad de ligando es escindible de forma no glucurónida.

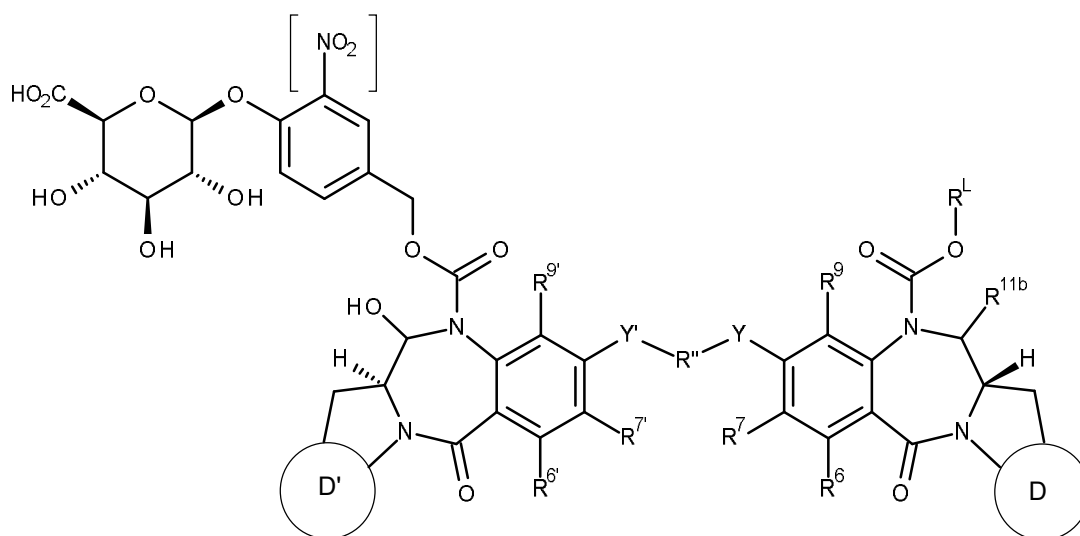
10 Se cree que el uso de una unidad de terminación glucurónida en estos conjugados es ventajoso, ya que si el conjugado es escindido del anticuerpo fuera de la célula diana, el compuesto protegido liberado permanece inactivo, ya que es incapaz de atravesar las membranas de la célula debido a su hidrofiliidad.

15 La presente invención también proporciona un PBD y enlazadores de fármaco diméricos relacionados adecuados para conjugarse en una unidad de ligando, donde el grupo N10-C11 que no se pretende que se encuentre unido a la unidad de ligando es un grupo de terminación de glucurónido. La activación de escisión para la unidad enlazadora es una unidad de terminación no glucurónida.

20 Se cree que el uso de una unidad de terminación glucurónida en estos enlazadores de fármaco es ventajoso, ya que aumenta la hidrofiliidad del enlazador de fármaco generalmente hidrofóbico, lo que hace que los enlazadores de fármaco puedan conjugarse más fácilmente en una unidad de ligando.

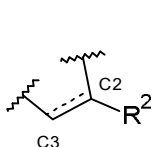
25 La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines de información. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

Un primer aspecto de la presente invención comprende un compuesto con la fórmula I:

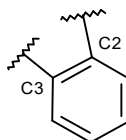


y sales y solvatos de este, donde:

- 5 los paréntesis rectos indican que el grupo NO₂ es opcional:
D representa cualquiera de los grupos D1 o D2:



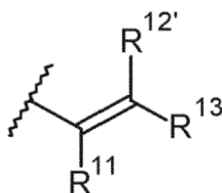
D1



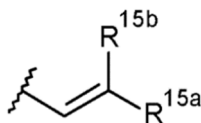
D2

- 10 la línea punteada indica la presencia opcional de un enlace doble entre C2 y C3; cuando existe un enlace doble entre C2 y C3, R² se selecciona del grupo que consiste en:

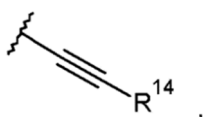
- (ia) grupo arilo C₅₋₁₀, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que comprende: halo, nitro, ciano, éter, carboxi, éster, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₇ y bis-oxi-alquilenos C₁₋₃;
15 (ib) alquilo C₁₋₅ alifático saturado;
(ic) cicloalquilo C₃₋₆ saturado;
(id)



- 20 donde cada uno de R¹¹, R¹² y R¹³ se selecciona de forma independiente de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo, donde la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R² es menos de 5;
(ie)

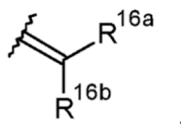


- 25 donde uno de R^{15a} y R^{15b} es H y el otro se selecciona de: fenilo, que se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo o metoxi, piridilo y tiofenilo, y
(if)



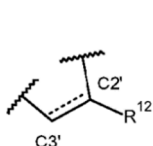
5 donde R¹⁴ se selecciona de: H; alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃, ciclopropilo; fenilo, dicho fenilo se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo,

cuando existe un enlace simple entre C2 y C3, R² se selecciona de H, OH, F, diF y

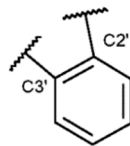


10 donde R^{16a} y R^{16b} se seleccionan independientemente de H, F, alquilo C₁₋₄ saturado, alqueno C₂₋₃, cuyos grupos alquilo y alqueno están opcionalmente sustituidos por un grupo que se selecciona de alquilamido C₁₋₄ y alquiléster C₁₋₄; o, cuando uno de R^{16a} y R^{16b} es H, el otro se selecciona de nitrilo y un alquiléster C₁₋₄;

15 D' representa ya sea al grupo D'1 o D'2:



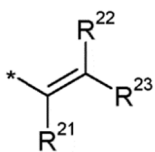
D'1



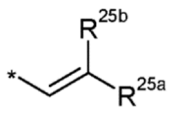
D'2

20 donde la línea punteada indica la presencia opcional de un enlace doble entre C2' y C3'; cuando existe un enlace doble entre C2' y C3', R¹² se selecciona del grupo que consiste en:

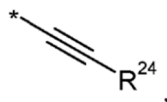
- 25 (iia) grupo arilo C₅₋₁₀, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que comprende: halo, nitro, ciano, éter, carboxi, éster, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₇ y bis-oxi-alqueno C₁₋₃;
 (iib) alquilo C₁₋₅ alifático saturado;
 (iic) cicloalquilo C₃₋₆ saturado;
 (iid)



30 donde cada uno de R²¹, R²² y R²³ se selecciona de forma independiente de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo, donde la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R¹² es menos de 5;
 (iie)

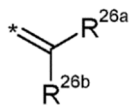


35 donde uno de R^{25a} y R^{25b} es H y el otro se selecciona de: fenilo, que se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo, y
 (iif)



40 donde R²⁴ se selecciona de: H; alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃, ciclopropilo; fenilo, dicho fenilo se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo,

cuando existe un enlace simple entre C2' y C3',
R¹² se selecciona de H, OH, F, diF y



5

donde R^{26a} y R^{26b} se seleccionan independientemente de H, F, alquilo C₁₋₄ saturado, alqueno C₂₋₃, cuyos grupos alquilo y alqueno están opcionalmente sustituidos por un grupo que se selecciona de alquilamido C₁₋₄ y alquiléster C₁₋₄; o, cuando uno de R^{26a} y R^{26b} es H, el otro se selecciona de nitrilo y un alquiléster C₁₋₄;

10 R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', nitro, Me₃Sn y halo; donde R y R' se seleccionan de forma independiente de grupos alquilo C₁₋₁₂, heterociclilo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos;

R⁷ se selecciona de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', nitro, Me₃Sn y halo;

15 Rⁿ es un grupo alqueno C₃₋₁₂ cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, S, NR^{N2} (donde R^{N2} es H o alquilo C₁₋₄) y/o anillos aromáticos, por ejemplo, benceno o piridina;

Y e Y' se seleccionan de O, S o NH;

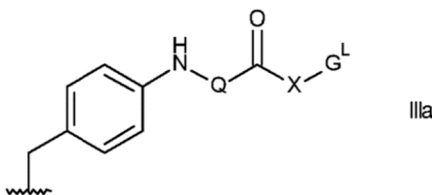
R^{6'}, R^{7'}, R^{9'} se seleccionan de los mismos grupos que R⁶, R⁷ y R⁹, respectivamente;

R^{11b} se selecciona de OH, OR^A, donde R^A es alquilo C₁₋₄; y

R^L es un enlazador para la conexión a un agente de unión celular, que es:

20

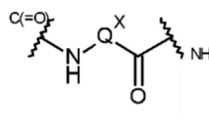
(iii):



25

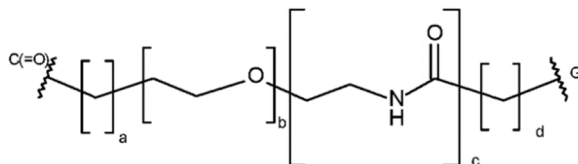
donde

Q es:



30

donde Q^X es tal que Q es un residuo de aminoácidos, un residuo de dipéptido o un residuo de tripéptido;
X es:



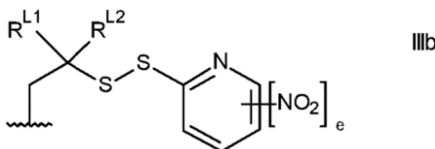
35

donde a = 0 a 5, b = 0 a 16, c = 0 o 1, d = 0 a 5;

G^L es un enlazador para la conexión a una unidad de ligando; el enlazador G^L usado en la presente invención es como se define en la reivindicación 1 y en el presente documento se divulga que R^L es un enlazador para la conexión a un agente de unión celular que es

40

(iii):

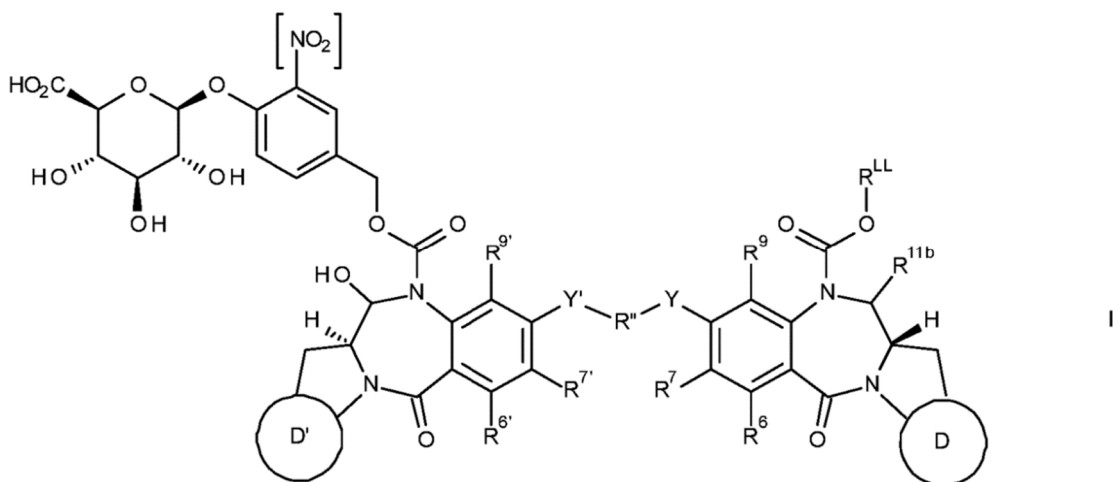


donde R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente de H y metilo, o junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo ciclopropileno o ciclobutileno; y e es 0 o 1.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona Conjugados de fórmula II:

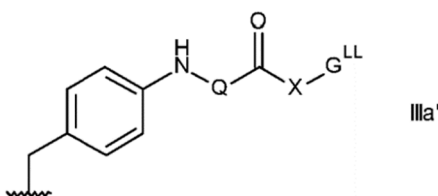


donde L es una unidad de ligando (es decir, un agente de direccionamiento), D^L es una unidad de enlazador de fármaco de fórmula I':

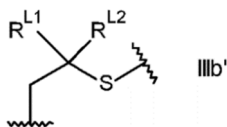


donde D, R², R⁶, R⁷, R⁹, R^{11b}, Y, R'', Y', D', R^{6'}, R^{7'}, R^{9'} and R¹² (que incluye la presencia o ausencia de enlaces dobles entre C2 y C3 y C2' y C3' respectivamente, y el grupo NO₂) son como se definen en el primer aspecto de la invención;

R^{LL} es un enlazador para la conexión a un agente de unión celular, que es:
(iii)



donde Q y X son como se definen en el primer aspecto y G^{LL} es un enlazador conectado a una unidad de ligando; y en el presente documento se divulga que R^{LL} es un enlazador para la conexión a un agente de unión celular (iii):



donde R^{L1} y R^{L2} son como se definen en el primer aspecto; donde p es un número entero de 1 a 20.

30 La unidad de ligando, descrita en más detalle más adelante, es un agente de direccionamiento que se une a un resto diana. La unidad de ligando puede, por ejemplo, unirse específicamente a un componente celular (un agente de unión) o a otras moléculas diana de interés. La unidad de ligando puede ser, por ejemplo, una proteína, polipéptido o péptido, tal como un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo u otro agente de unión, tal como una proteína de fusión Fc.

35 En el presente documento se describe el uso de un conjugado del segundo aspecto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa. El tercer aspecto también proporciona un conjugado del segundo aspecto de la invención para el uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa. El tercer aspecto también proporciona un conjugado del segundo aspecto de la invención para su uso para el tratamiento de una enfermedad proliferativa que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjunto

40

del segundo aspecto de la invención a un paciente que lo necesita.

Un experto en la técnica puede determinar si un conjugado candidato trata o no una afección proliferativa para cualquier tipo de célula particular. Por ejemplo, en los ejemplos que se encuentran más adelante se describen ensayos que se pueden utilizar de forma conveniente para evaluar la actividad que ofrece un compuesto particular.

Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona la síntesis de un conjugado del segundo aspecto de la invención que comprende conjugar un compuesto (enlazador de fármaco) del primer aspecto de la invención con una unidad del ligando.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto en la viabilidad de células SKOV3 luego de la incubación con un conjugado de la presente invención;

La Figura 2 muestra el efecto en la viabilidad de células SKOV3 luego de la incubación con un conjugado diferente de la presente invención;

La Figura 3 muestra el efecto en el volumen de un tumor de xenoinjerto NCI-N87 luego del tratamiento con un conjugado diferente de la presente invención;

La Figura 4 muestra el efecto en el volumen de un tumor de xenoinjerto JIMT-1 luego del tratamiento con un conjugado igual de la presente invención, como se observa en la Figura 3

Definiciones

Sustituyentes

La expresión "opcionalmente sustituido", tal como se usa en la presente, hace referencia a un grupo original que puede estar no sustituido o que puede estar sustituido.

A menos que se especifique lo contrario, el término "sustituido", tal como se usa en la presente, hace referencia a un grupo original que contiene uno o más sustituyentes. El término "sustituyente" se utiliza en la presente en el sentido convencional y hace referencia a un resto químico que se encuentra unido de manera covalente, o si corresponde, fusionado, a un grupo original. Se conoce una amplia variedad de sustituyentes y también se conocen métodos para su formación e introducción en varios grupos originales.

A continuación se describen en más detalle ejemplos de sustituyentes.

Alquilo C₁₋₁₂: El término "alquilo C₁₋₁₂", tal como se usa en la presente, hace referencia a un resto monovalente que se obtiene al quitar un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarburo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, el que puede ser alifático o alicíclico, y que se puede encontrar saturado o insaturado (por ejemplo, parcialmente no saturado, totalmente no saturado). El término "alquilo C₁₋₄", tal como se usa en la presente, hace referencia a un resto monovalente que se obtiene al quitar un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono de un compuesto hidrocarburo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, el que puede ser alifático o alicíclico, y que se puede encontrar saturado o insaturado (por ejemplo, parcialmente insaturado, totalmente no saturado). Por lo tanto, el término "alquilo" incluye las subclases alquenoilo, alquinoilo, cicloalquilo, etc., las que se discuten más adelante.

Los ejemplos de grupos alquilo saturados incluyen, de modo no taxativo, metilo (C₁), etilo (C₂), propilo (C₃), butilo (C₄), pentilo (C₅), hexilo (C₆) y heptilo (C₇).

Los ejemplos de grupos alquilo lineales saturados incluyen, de modo no taxativo, metilo (C₁), etilo (C₂), n-propilo (C₃), n-butilo (C₄), n-pentilo (amilo) (C₅), n-hexilo (C₆) y n-heptilo (C₇).

Los ejemplos de grupos alquilo ramificados saturados incluyen iso-propilo (C₃), iso-butilo (C₄), sec-butilo (C₄), terc-butilo (C₄), iso-pentilo (C₅) y neo-pentilo (C₅).

Alquenoilo C₂₋₁₂: El término "alquenoilo C₂₋₁₂", tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces dobles carbono-carbono.

Los ejemplos de grupos alquenoilo insaturados incluyen, de modo no taxativo, etenilo (vinilo, -CH=CH₂), 1-propenilo (-CH=CH-CH₃), 2-propenilo (alilo, -CH-CH=CH₂), isopropenilo (1-metilvinilo, -C(CH₃)=CH₂), butenilo (C₄), pentenilo (C₅) y hexenilo (C₆).

Alquinoilo C₂₋₁₂: El término "alquinoilo C₂₋₁₂", tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo alquilo que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono.

Los ejemplos de grupos alquinoilo insaturados incluyen, de modo no taxativo, etinilo (-C≡CH) y 2-propinilo (propargilo, -CH₂C≡CH).

Cicloalquilo C₃₋₁₂: El término "cicloalquilo C₃₋₁₂" tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo alquilo que es también un grupo ciclico; es decir, un resto monovalente que se obtiene al quitar un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo alicíclico de un compuesto de hidrocarburo cíclico (carbocíclico), cuyo resto tiene de 3 a 7 átomos de carbono, incluyendo de 3 a 7 átomos del anillo.

Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen, de modo no taxativo, aquellos derivados de:

compuestos de hidrocarburos monocíclicos saturados:

10 ciclopropano (C₃), ciclobutano (C₄), ciclopentano (C₅), ciclohexano (C₆), cicloheptano (C₇), metilciclopropano (C₄), dimetilciclopropano (C₅), metilciclobutano (C₅), dimetilciclobutano (C₆), metilciclopentano (C₆), dimetilciclopentano (C₇) y metilciclohexano (C₇);

compuestos de hidrocarburos monocíclicos no saturados:

15 ciclopropeno (C₃), ciclobuteno (C₄), ciclopenteno (C₅), ciclohexeno (C₆), metilciclopropeno (C₄), dimetilciclopropeno (C₅), metilciclobuteno (C₅), dimetilciclobuteno (C₆), metilciclopenteno (C₆), dimetilciclopenteno (C₇) y metilciclohexeno (C₇); y

compuestos de hidrocarburos policíclicos saturados:

norcarano (C₇), norpinano (C₇), norbornano (C₇).

20 Heterociclilo C₃₋₂₀: El término "heterociclilo C₃₋₂₀", tal como se usa en la presente, se refiere a un resto monovalente que se obtiene al quitar un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un compuesto heterocíclico, cuyo resto tiene de 3 a 20 átomos del anillo, de los cuales de 1 a 10 son heteroátomos del anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 3 a 7 átomos del anillo, de los cuales de 1 a 4 son heteroátomos del anillo.

25 En este contexto, los prefijos (por ejemplo, C₃₋₂₀, C₃₋₇, C₅₋₆, etc.) indican la cantidad de átomos del anillo o intervalo de números de átomos del anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, el término "heterociclilo C₅₋₆", tal como se usa en la presente, se refiere a un grupo heterociclilo que tiene 5 o 6 átomos del anillo.

Los ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos incluyen, de modo no taxativo, aquellos derivados de:

30 N₁: aziridina (C₃), azetidina (C₄), pirrolidina (tetrahidropirrol) (C₅), pirrolina (por ejemplo, 3-pirrolina, 2,5-dihidropirrol) (C₅), 2H-pirrol o 3H-pirrol (isopirrol, isoazol) (C₅), piperidina (C₆), dihidropiridina (C₆), tetrahidropiridina (C₆), azequina (C₇);

35 O₁: oxirano (C₃), (C₄), oxolano (tetrahidrofurano) (C₅), oxol (dihidrofurano) (C₅), oxano (tetrahidropirano) (C₆), dihidropirano (C₆), pirano (C₆), oxepin (C₇);

S₁: tiirano (C₃), tietano (C₄), tiolano (tetrahidrotiofeno) (C₅), tiano (tetrahidrotiopiran) (C₆), tiepano (C₇);

O₂: dioxolano (C₅), dioxano (C₆) y dioxepano (C₇);

O₃: trioxano (C₆);

40 N₂: imidazolidina (C₅), pirazolidina (diazolidina) (C₅), imidazolina (C₅), pirazolina (dihidropirazol) (C₅), piperazina (C₆);

N₁O₁: tetrahidrooxazol (C₅), dihidrooxazol (C₅), tetrahidroisoxazol (C₅), dihidroisoxazol (C₅), morfolina (C₆), tetrahidrooxazina (C₆), dihidrooxazina (C₆), oxazina (C₆);

N₁S₁: tiazolina (C₅), tiazolidina (C₅), tiomorfolina (C₆);

N₂O₁: oxadiazina (C₆);

45 O₁S₁: oxatiol (C₅) y oxatiano (tioxano) (C₆); y

N₁O₁S₁: oxatiazina (C₆).

Los ejemplos de grupos heterociclilo monocíclicos sustituidos incluyen aquellos derivados de sacáridos, en forma cíclica, por ejemplo, furanosas (C₅), tales como arabinofuranosa, lixofuranosa, ribofuranosa y xilofuranosa, y piranosas (C₆), tales como alopiranosa, altropiranosa, glucopiranosa, manopiranosa, gulopiranosa, idopiranosa, galactopiranosa y talopiranosa.

Arilo C₅₋₂₀: El término "arilo C₅₋₂₀", tal como se usa en la presente, se refiere a un resto monovalente que se obtiene al quitar un átomo de hidrógeno de un átomo de un anillo aromático de un compuesto aromático, cuyo resto tiene de 3 a 20 átomos del anillo. El término "arilo C₅₋₇", tal como se usa en la presente, hace referencia a un resto monovalente que se obtiene al quitar un átomo de hidrógeno de un átomo de un anillo aromático de un compuesto aromático, cuyo resto tiene de 5 a 7 átomos del anillo y el término "arilo C₅₋₁₀", tal como se usa en la presente, hace referencia a un resto monovalente que se obtiene al quitar un átomo de hidrógeno de un átomo de un anillo aromático de un compuesto aromático, cuyo resto tiene de 5 a 10 átomos del anillo. Preferentemente, cada anillo tiene de 5 a 7 átomos del anillo.

60 Tal como se usa en la presente, los prefijos (por ejemplo, C₃₋₂₀, C₅₋₇, C₅₋₆, C₅₋₁₀, etc.) indican la cantidad de átomos del anillo o el intervalo de números de átomos del anillo, ya sean átomos de carbono o heteroátomos. Por ejemplo, el término "arilo C₅₋₆", tal como se utiliza en la presente, hace referencia a un grupo arilo que tiene 5 o 6 átomos del anillo.

65 Todos los átomos del anillo pueden ser átomos de carbono, tal como en los "grupos carboarilo".

Los ejemplos de grupos carboarilo incluyen, de modo no taxativo, aquellos derivados de benceno (es decir, fenilo)

(C₆), naftaleno (C₁₀), azuleno (C₁₀), antraceno (C₁₄), fenantreno (C₁₄), naftaceno (C₁₈) y pireno (C₁₆).

Los ejemplos de grupos arilo que comprenden anillos fusionados, de los cuales al menos uno es un anillo aromático, incluyen, de modo no taxativo, grupos derivados de indano (por ejemplo, 2,3-dihidro-1H-indeno) (C₉), indeno (C₉), isoindeno (C₉), tetralina (1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (C₁₀), acenafteno (C₁₂), fluoreno (C₁₃), fenaleno (C₁₃), acefenantreno (C₁₅) y aceantreno (C₁₆).

De manera alternativa, los átomos del anillo pueden incluir uno o más heteroátomos, como en los "grupos heteroarilo". Los ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen, de modo no taxativo, aquellos derivados de:

10 N₁: pirrol (azol) (C₅), piridina (azina) (C₆);
 O₁: furano (oxol) (C₅);
 S₁: tiofeno (tiol) (C₅);
 N₁O₁: oxazol (C₅), isoxazol (C₅), isoxazina (C₆);
 15 N₂O₁: oxadiazol (furazan) (C₅);
 N₃O₁: oxatriazol (C₅);
 N₁S₁: tiazol (C₅), isotiazol (C₅);
 N₂: imidazol (1,3-diazol) (C₅), pirazol (1,2-diazol) (C₅), piridazina (1,2-diazina) (C₆), pirimidina (1,3-diazina) (C₆) (por ejemplo, citosina, timina, uracilo), pirazina (1,4-diazina) (C₆);
 20 N₃: triazol (C₅), triazina (C₆); y,
 N₄: tetrazol (C₅).

Los ejemplos de heteroarilo que comprende anillos fusionados incluyen, de modo no taxativo:

25 C₉ (con 2 anillos fusionados) derivado de benzofurano (O₁), isobenzofurano (O₁), indol (N₁), isoindol (N₁), indolizina (N₁), indolina (N₁), isoindolina (N₁), purina (N₄) (por ejemplo, adenina, guanina), bencimidazol (N₂), indazol (N₂), benzoxazol (N₁O₁), benzisoxazol (N₁O₁), benzodioxol (O₂), benzofurazano (N₂O₁), benzotriazol (N₃), benzotiofurano (S₁), benzotiazol (N₁S₁), benzotiadiazol (N₂S);
 30 C₁₀ (con 2 anillos fusionados) derivado de cromo (O₁), isocromo (O₁), cromo (O₁), isocromo (O₁), benzodioxano (O₂), quinolina (N₁), isoquinolina (N₁), quinolizina (N₁), benzoxazina (N₁O₁), benzodiazina (N₂), piridopiridina (N₂), quinoxalina (N₂), quinazolina (N₂), cinolina (N₂), ftalazina (N₂), naftiridina (N₂), pteridina (N₄);
 C₁₁ (con 2 anillos fusionados) derivados de benzodiazepina (N₂);
 C₁₃ (con 3 anillos fusionados) derivados de carbazol (N₁), dibenzofurano (O₁), dibenzotiofeno (S₁), carbolina (N₂), perimidina (N₂), piridoindol (N₂); y
 35 C₁₄ (con 3 anillos fusionados) derivados de acridina (N₁), xanteno (O₁), tioxanteno (S₁), oxantreno (O₂), fenoxatiin (O₁S₁), fenazina (N₂), fenoxazina (N₁O₁), fenotiazina (N₁S₁), tiantrena (S₂), fenantridina (N₁), fenantrolina (N₂), fenazina (N₂).

Los grupos anteriores, ya sea solos o como parte de otro sustituyente, pueden estar ellos mismos opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados para ellos mismos y los sustituyentes adicionales indicados a continuación.

Halo: -F, -Cl, -Br, y -I.

45 Hidroxi: -OH.

Éter: -OR, donde R es un sustituyente éter, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado grupo alquilo C₁₋₇, descrito más adelante), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ (también denominado grupo heterocicli C₃₋₂₀), o un grupo arilo C₅₋₂₀ (también denominado grupo arilo C₅₋₂₀), preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇.

50 Alcoxi: -OR, donde R es un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos alcoxi C₁₋₇ incluyen, de modo no taxativo, -OMe (metoxi), -OEt (etoxi), -O(nPr) (n-propoxi), -O(iPr) (isopropoxi), -O(nBu) (n-butoxi), -O(sBu) (sec-butoxi), -O(iBu) (isobutoxi) y -O(tBu) (terc-butoxi).

55 Acetal: -CH(OR¹)(OR²), en el que R¹ y R² son independientemente sustituyentes de acetal, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇ o, en el caso de un grupo acetal "cíclico", R¹ y R², junto con los dos átomos de oxígeno a los que se encuentran unidos, y los átomos de carbono a los que se encuentran unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos del anillo. Los ejemplos de grupos acetal incluyen, de modo no taxativo, -CH(OMe)₂, -CH(OEt)₂ y -CH(OMe)(OEt).

60 Hemiacetal: -CH(OH)(OR¹), donde R¹ es un sustituyente hemiacetal, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos acetal incluyen, de modo no taxativo, -CH(OH)(OMe) y -CH(OH)(OEt).

65 Cetal: -CR(OR¹)(OR²), donde R¹ y R² son como se definieron para los acetales, y R es un sustituyente cetal diferente de hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀,

preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos cetal incluyen, de modo no taxativo, -C(Me)(OMe)₂, -C(Me)(OEt)₂, -C(Me)(OMe)(OEt), -C(Et)(OMe)₂, -C(Et)(OEt)₂ y -C(Et)(OMe)(OEt).

Hemicetal: -CR(OH)(OR¹), donde R¹ es como se definió para los hemiacetales, y R es un sustituyente hemicetal diferente de hidrógeno, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos hemiacetal incluyen, de modo no taxativo, -C(Me)(OH)(OMe), -C(Et)(OH)(OMe), -C(Me)(OH)(OEt) y -C(Et)(OH)(OEt).

Oxo (ceto, -ona): =O.

Tiona (tiocetona): =S.

Imino (imina): =NR, en el que R es un sustituyente imino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos éster incluyen, de modo no taxativo, =NH, =NMe, =NEt y =NPh.

Formilo (carbaldehído, carboxaldehído): -C(=O)H.

Acilo (ceto): -C(=O)R, donde R es un sustituyente acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado alquilacilo C₁₋₇ o alcanoil C₁₋₇), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ (también denominado heterocicilacilo C₃₋₂₀) o un grupo arilo C₅₋₂₀ (también denominado arilacilo C₅₋₂₀), preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos acilo incluyen, de modo no taxativo, -C(=O)CH₃ (acetilo), -C(=O)CH₂CH₃ (propionilo), -C(=O)C(CH₃)₃ (tbutirilo) y -C(=O)Ph (benzoil, fenona).

Carboxi (ácido carboxílico): -C(=O)OH.

Tiocarboxi (ácido tiocarboxílico): -C(=S)SH.

Tiolarboxi (ácido tiolarboxílico): -C(=O)SH.

Tionocarboxi (ácido tionocarboxílico): -C(=S)OH.

Ácido imídico: -C(=NH)OH.

Ácido hidroxámico: -C(=NOH)OH.

Éster (carboxilato, éster de ácido carboxílico, oxicarbonilo): -C(=O)OR, donde R es un sustituyente éster, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos éster incluyen, de modo no taxativo, -C(=O)OCH₃, -C(=O)OCH₂CH₃, -C(=O)OC(CH₃)₃ y -C(=O)OPh.

Aciloxi (éster inverso): -OC(=O)R, donde R es un sustituyente aciloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos aciloxi incluyen, de modo no taxativo, -OC(=O)CH₃ (acetoxi), -OC(=O)CH₂CH₃, -OC(=O)C(CH₃)₃, -OC(=O)Ph y -OC(=O)CH₂Ph.

Oxicarboiloxi: -OC(=O)OR, en el que R es un sustituyente éster, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos éster incluyen, de modo no taxativo, -OC(=O)OCH₃, -OC(=O)OCH₂CH₃, -OC(=O)OC(CH₃)₃ y -OC(=O)OPh.

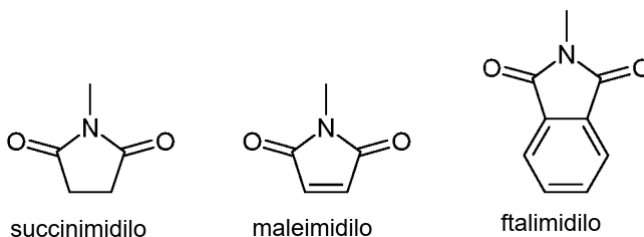
Amino: -NR¹R², en el que R¹ y R² son independientemente sustituyentes amino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C₁₋₇ (al que también se hace referencia como alquilamino C₁₋₇ o dialquilamino C₁₋₇), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente H o un grupo alquilo C₁₋₇ o, en el caso de un grupo amino "cíclico", R¹ y R², junto con el átomo de nitrógeno al que se encuentran unidos, forman un anillo heterocíclico que tiene de 4 a 8 átomos del anillo. Los grupos amino pueden ser primarios (-NH₂), secundarios (-NHR¹) o terciarios (-NHR¹R²), y en forma catiónica, pueden ser cuaternarios (-⁺NR¹R²R³). Los ejemplos de grupos amino incluyen, de modo no taxativo, -NH₂, -NHCH₃, -NHC(CH₃)₂, -N(CH₃)₂, -N(CH₂CH₃)₂ y -NHPh. Los ejemplos de grupos amino cíclicos incluyen, de modo no taxativo, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, piperazino, morfolino y tiomorfolino.

Amido (carbamoil, carbamilo, aminocarbonilo, carboxamida): -C(=O)NR¹R², donde R¹ y R² son independientemente sustituyentes amino, como se definió para los grupos amino. Los ejemplos de grupos amido incluyen, de modo no taxativo, -C(=O)NH₂, -C(=O)NHCH₃, -C(=O)N(CH₃)₂, -C(=O)NHCH₂CH₃ y -C(=O)N(CH₂CH₃)₂, así como también grupos amido en los que R¹ y R², junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, forman una estructura heterocíclica como en, por ejemplo, piperidinocarbonilo, morfolinocarbonilo, tiomorfolinocarbonilo y piperazinocarbonilo.

Tioamido (tiocarbamilo): -C(=S)NR¹R², donde R¹ y R² son independientemente sustituyentes amino, como se

definió para los grupos amino. Los ejemplos de grupos amido incluyen, de modo no taxativo, $-\text{C}(=\text{S})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{S})\text{NHCH}_3$, $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ y $-\text{C}(=\text{S})\text{NHCH}_2\text{CH}_3$.

Acilamido (acilamino): $-\text{NR}^1\text{C}(=\text{O})\text{R}^2$, donde R^1 es un sustituyente amida, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} , y R^2 es un sustituyente acilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos acilamida incluyen, de modo no taxativo, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$ y $-\text{NHC}(=\text{O})\text{Ph}$. R^1 y R^2 juntos pueden formar una estructura cíclica, como en, por ejemplo, succinimidilo, maleimidilo y ftalimidilo:

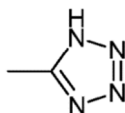


Aminocarboniloxi: $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^1\text{R}^2$, donde R^1 y R^2 son independientemente sustituyentes amino, como se definió para los grupos amino. Los ejemplos de grupos aminocarboniloxi incluyen, de modo no taxativo, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NHMe}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{NMe}_2$ y $-\text{OC}(=\text{O})\text{NEt}_2$.

Ureido: $-\text{N}(\text{R}^1)\text{CONR}^2\text{R}^3$ donde R^2 y R^3 son independientemente sustituyentes amino, como se define para los grupos amino, y R^1 es un sustituyente ureido, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente hidrógeno o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos ureido incluyen, de modo no taxativo, $-\text{NHCONH}_2$, $-\text{NHCONHMe}$, NHCONHEt , $-\text{NHCONMe}_2$, $-\text{NHCONEt}_2$, $-\text{NMeCONH}_2$, $-\text{NMeCONHMe}$, NMeCONHEt , $-\text{NMeCONMe}_2$ y $-\text{NMeCONEt}_2$.

Guanidino: $-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$.

Tetrazolilo: un anillo aromático de cinco miembros que tiene cuatro átomos de nitrógeno y un átomo de carbono:



Imino: $=\text{NR}$, en el que R es un sustituyente imino, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente H o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos imino incluyen, de modo no taxativo, $=\text{NH}$, $=\text{NMe}$ y $=\text{NEt}$.

Amidina (amidino): $-\text{C}(=\text{NR})\text{NR}^2$, en el que cada R es un sustituyente amidina, por ejemplo, hidrógeno, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente H o un grupo alquilo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos amidino incluyen, de modo no taxativo, $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-\text{C}(=\text{NH})\text{NMe}_2$ y $-\text{C}(=\text{NMe})\text{NMe}_2$.

Nitro: $-\text{NO}_2$.

Nitroso: $-\text{NO}$.

Azido: $-\text{N}_3$.

Ciano (nitrilo, carbonitrilo): $-\text{CN}$.

Isociano: $-\text{NC}$.

Cianato: $-\text{OCN}$.

Isocianato: $-\text{NCO}$.

Tiociano (tiocianato): $-\text{SCN}$.

Isotiociano (isotiocianato): $-\text{NCS}$.

Sulfhidrilo (tiol, mercapto): $-\text{SH}$.

Tioéter (sulfuro): SR, donde R es un sustituyente tioéter, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ (también denominado grupo alquilitio C₁₋₇), un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos alquilitio C₁₋₇ incluyen, de modo no taxativo, SCH₃ y SCH₂CH₃.

Disulfuro: -SS-R, en el que R es un sustituyente disulfuro, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇ (al que también se hace referencia en la presente como disulfuro de alquilo C₁₋₇). Los ejemplos de grupos alquil disulfuro C₁₋₇ incluyen, de modo no taxativo, -SSCH₃ y -SSCH₂CH₃.

Sulfino (sulfinil, sulfóxido): -S(=O)R, en el que R es un sustituyente sulfino, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente, un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos de sulfino incluyen, de modo no taxativo, S(=O)CH₃ y S(=O)CH₂CH₃.

Sulfono (sulfonilo): -S(=O)₂R, en el que R es un sustituyente sulfona, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente, un grupo alquilo C₁₋₇ que incluye, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇ fluorado o perfluorado. Los ejemplos de grupos de sulfono incluyen, de modo no taxativo, -S(=O)₂CH₃ (metanosulfonilo, mesilo), -S(=O)₂CF₃ (triflilo), -S(=O)₂CH₂CH₃ (esilo), -S(=O)₂C₄F₉ (nonafililo), -S(=O)₂CH₂CF₃ (tresilo), -S(=O)₂CH₂CH₂NH₂ (taurilo), -S(=O)₂Ph (fenilsulfonilo, besilo), 4-metilfenilsulfonilo (tosilo), 4-clorofenilsulfonilo (closilo), 4-bromofenilsulfonilo (brosilo), 4-nitrofenilo (nosilo), 2-naftalenosulfonato (napsilo), y 5-dimetilamino-naftalen-1-ilsulfonato (dansilo).

Ácido sulfínico (sulfino): -S(=O)OH, -SO₂H.

Ácido sulfónico (sulfo): -S(=O)₂OH, -SO₃H.

Sulfinato (éster de ácido sulfínico): -S(=O)OR; donde R es un sustituyente de sulfinato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos de sulfinato incluyen, de modo no taxativo, -S(=O)OCH₃ (metoxisulfinilo; sulfinato de metilo) y -S(=O)OCH₂CH₃ (etoxisulfinilo; sulfinato de etilo).

Sulfonato (éster de ácido sulfónico): -S(=O)₂OR, donde R es un sustituyente de sulfonato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos de sulfonato incluyen, de modo no taxativo, -S(=O)₂OCH₃ (metoxisulfonylo; sulfonato de metilo) y -S(=O)₂OCH₂CH₃ (etoxisulfonylo; sulfonato de etilo).

Sulfiniloxi: -OS(=O)R, en el que R es un sustituyente sulfiniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente, un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos de sulfiniloxi incluyen, de modo no taxativo, -OS(=O)CH₃ y -OS(=O)CH₂CH₃.

Sulfoniloxi: -OS(=O)₂R, en el que R es un sustituyente sulfoniloxi, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀ o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente, un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos de sulfoniloxi incluyen, de modo no taxativo, -OS(=O)₂CH₃ (mesilato) y -OS(=O)₂CH₂CH₃ (esilato).

Sulfato: -OS(=O)₂OR, donde R es un sustituyente de sulfato, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo alquilo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos de sulfato incluyen, de modo no taxativo, -OS(=O)₂OCH₃ y -SO(=O)₂OCH₂CH₃.

Sulfamilo (sulfamoilo; amida de ácido sulfínico; sulfinamida): -S(=O)NR¹R², donde R¹ y R² son independientemente sustituyentes de amino, tal como se define para los grupos amino. Los ejemplos de grupos de sulfamilo incluyen, de modo no taxativo, -S(=O)NH₂, -S(=O)NH(CH₃), -S(=O)N(CH₃)₂, -S(=O)NH(CH₂CH₃), -S(=O)N(CH₂CH₃)₂, y -S(=O)NHPh.

Sulfonamido (sulfnamoilo; amida de ácido sulfónico; sulfonamida): -S(=O)₂NR¹R², donde R¹ y R² son independientemente sustituyentes de amino, tal como se define para los grupos amino. Los ejemplos de grupos de sulfonamido incluyen, de modo no taxativo, -S(=O)₂NH₂, -S(=O)₂NH(CH₃), -S(=O)₂N(CH₃)₂, -S(=O)₂NH(CH₂CH₃), -S(=O)₂N(CH₂CH₃)₂, y -S(=O)₂NHPh.

Sulfamino: NR¹S(=O)₂OH, donde R¹ es un sustituyente amino, tal como se define para los grupos amino. Los ejemplos de grupos de sulfamino incluyen, de modo no taxativo, NHS(=O)₂OH and N(CH₃)S(=O)₂OH.

Sulfonamino: -NR¹S(=O)₂R, donde R¹ es un sustituyente amino, tal como se define para los grupos amino, y R es un sustituyente sulfonamino, por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₇, un grupo heterociclilo C₃₋₂₀, o un grupo arilo C₅₋₂₀, preferentemente un grupo C₁₋₇. Los ejemplos de grupos de sulfonamino incluyen, de modo no taxativo, -NHS(=O)₂CH₃ y -N(CH₃)S(=O)₂C₆H₅.

Sulfenamino: $-\text{NR}^1\text{S}(=\text{O})\text{R}$, donde R^1 es un sustituyente amino, tal como se define para los grupos amino, y R es un sustituyente sulfenamino, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente un grupo C_{1-7} . Los ejemplos de grupos de sulfenamino incluyen, de modo no taxativo, $-\text{NHS}(=\text{O})\text{CH}_3$ y $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{S}(=\text{O})\text{C}_6\text{H}_5$.

5 Fosfino (fosfina): $-\text{PR}_2$, en el que R es un sustituyente fosfino, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Ejemplos de grupos fosfino incluyen, de modo no taxativo, $-\text{PH}_2$, $-\text{P}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(\text{t-Bu})_2$, y $-\text{P}(\text{Ph})_2$.

10 Fosfo: $-\text{P}(=\text{O})_2$.

Fosfinilo (óxido de fosfina): $-\text{P}(=\text{O})\text{R}_2$, donde R es un sustituyente fosfinilo, por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosfinilo incluyen, de modo no taxativo, $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{t-Bu})_2$, y $-\text{P}(=\text{O})(\text{Ph})_2$.

15

Ácido fosfónico (fosfono): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$.

20 Fosfonato (éster de fosfonato): $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$, en el que R es un sustituyente fosfonato, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente, H , un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosfonato incluyen, de modo no taxativo, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, $\text{P}(=\text{O})(\text{O-tBu})_2$, y $\text{P}(=\text{O})(\text{OPh})_2$.

25 Ácido fosfórico (fosfonooxi): $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OH})_2$.

Fosfato (éster de fosfonooxi): $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$, donde R es un sustituyente fosfato, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosfato incluyen, de modo no taxativo, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OtBu})_2$, y $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OPh})_2$.

30

Ácido de fósforo: $-\text{OP}(\text{OH})_2$.

35 Fosfito: $-\text{OP}(\text{OR})_2$, en el que R es un sustituyente fosfito, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} , un grupo heterociclilo C_{3-20} o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosfito incluyen, de modo no taxativo, $-\text{OP}(\text{OCH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{O-tBu})_2$ y $-\text{OP}(\text{OPh})_2$.

40 Fosforamidita: $-\text{OP}(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$, donde R^1 y R^2 son sustituyentes de fosforamidita, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosforamidita incluyen, de modo no taxativo, $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$, y $-\text{OP}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$.

45 Fosforamidato: $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^1)-\text{NR}^2_2$, donde R^1 y R^2 son sustituyentes de fosforamidato, por ejemplo, $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} (opcionalmente sustituido), un grupo heterociclilo C_{3-20} , o un grupo arilo C_{5-20} , preferentemente $-\text{H}$, un grupo alquilo C_{1-7} o un grupo arilo C_{5-20} . Los ejemplos de grupos fosforamidato incluyen, de modo no taxativo, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{N}(\text{i-Pr})_2$, y $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN})-\text{N}(\text{i-Pr})_2$.

Alquilenos

50 Alquilenos C_{3-12} : El término "alquilenos C_{3-12} ", tal como se usa en la presente, hace referencia a un resto bidentado que se obtiene al quitar dos átomos de hidrógeno, ya sea ambos del mismo átomo de carbono, o uno de cada uno de dos átomos de carbono diferentes, de un compuesto de hidrocarburo que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (a menos que se especifique lo contrario), los que pueden ser alifáticos o alicíclicos, y los que pueden ser saturados, parcialmente insaturados o totalmente insaturados. Por lo tanto, el término "alquilenos" incluye las subclases alquenileno, alquinileno, cicloalquilenos, etc., que se discuten más adelante.

Los ejemplos de grupos alquilenos C_{3-12} lineales saturados incluyen, de modo no taxativo, $(\text{CH}_2)_n$ - donde n es un número entero entre 3 y 12, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (propileno), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (butileno), $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (pentileno) y $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (heptileno).

60 Los ejemplos de grupos alquilenos C_{3-12} saturados ramificados incluyen, de modo no taxativo, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$.

65 Los ejemplos de grupos alquilenos C_{3-12} parcialmente no saturados lineales (alquenileno C_{3-12} , y grupos alquinilenos) incluyen, de modo no taxativo, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$

CH=CH-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-, -CH=CH-CH=CH-CH₂-CH₂-, -CH=CH-CH₂-CH=CH-, -CH=CH-CH₂-CH₂-CH=CH-, y -CH₂-C≡C-CH₂-.

5 Los ejemplos de grupos alquilenos C₃₋₁₂ parcialmente no saturados ramificados (alquilenos C₃₋₁₂ y grupos alquilenos) incluyen, de modo no taxativo, -C(CH₃)=CH-, -C(CH₃)=CH-CH₂-, -CH=CH-CH(CH₃)- y -C≡C-CH(CH₃)-

Los ejemplos de grupos alquilenos C₃₋₁₂ saturados alicíclicos (cicloalquilenos C₃₋₁₂) incluyen, de modo no taxativo, ciclopentileno (por ejemplo, ciclopent-1,3-ileno), y ciclohexileno (por ejemplo, ciclohex-1,4-ileno).

10 Los ejemplos de grupos alquilenos C₃₋₁₂ parcialmente no saturados alicíclicos (cicloalquilenos C₃₋₁₂) incluyen, de modo no taxativo, ciclopentenileno (por ejemplo, 4-ciclopenten-1,3-ileno), ciclohexenileno (por ejemplo, 2-ciclohexen-1,4-ileno; 3-ciclohexen-1,2-ileno; 2,5-ciclohexadien-1,4-ileno).

Unidad de ligando

15 La unidad de ligando puede ser de cualquier tipo, e incluir una proteína, polipéptido, péptido y un agente no peptídico que se une específicamente a una molécula diana. En algunas modalidades, la unidad de ligando puede ser una proteína, polipéptido o péptido. En algunas modalidades, la unidad de ligando puede ser un polipéptido cíclico. Estas unidades de ligando pueden incluir anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión a la molécula diana, linfocitos, hormonas, factores de crecimiento o cualquier otra molécula o sustancia de unión a la célula que puede unirse específicamente a una diana.

20 Las expresiones "se une específicamente" y "unión específica" hace referencia a la unión de un anticuerpo u otra proteína, polipéptido o péptido a una molécula predeterminada (por ejemplo, un antígeno). Normalmente, el anticuerpo u otra molécula se une con una afinidad de al menos alrededor de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y se une a la molécula predeterminada con una afinidad que es al menos dos veces más alta que su afinidad para la unión a una molécula específica (por ejemplo, la BSA, caseína) distinta a la molécula predeterminada o una molécula estrechamente relacionada.

30 Los ejemplos de unidades de ligando incluyen aquellos agentes descritos para el uso en WO 2007/085930.

35 En algunas modalidades, la unidad de ligando es un agente de unión a célula que se une a una diana extracelular en una célula. Dicho agente de unión a célula puede ser una proteína, polipéptido, péptido o un agente no peptídico. En algunas modalidades, el agente de unión a célula puede ser una proteína, polipéptido o péptido. En algunas modalidades, el agente de unión a célula puede ser un polipéptido cíclico. El agente de unión a célula también puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. Por lo tanto, en una modalidad, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC).

Agente de Unión a Célula

40 Un agente de unión a célula puede ser de cualquier tipo, e incluir péptidos y no péptidos. Éstos pueden incluir anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene por lo menos un sitio de unión, linfocinas, hormonas, miméticos de hormonas, vitaminas, factores de crecimiento, moléculas de transporte de nutrientes, o cualquier otra molécula de unión a célula o sustancia.

45 Péptidos

50 En una modalidad, el agente de unión a célula es un péptido lineal o cíclico que comprende 4-30, preferiblemente 6-20, residuos de aminoácidos contiguos. En esta modalidad, se prefiere que un agente de unión a célula esté enlazado a un compuesto de pirrolobenzodiazepina monomérico o dimérico.

En una modalidad, el agente de unión a célula comprende un péptido que se une a la integrina $\alpha_v\beta_6$. El péptido puede ser selectivo para $\alpha_v\beta_6$ con respecto a XYS.

55 En una modalidad, el agente de unión a célula comprende el polipéptido A20FMDV-Cys. El A20FMDV-Cys tiene la secuencia: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Alternativamente, se puede utilizar una variante de la secuencia de A20FMDV-Cys en donde uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez residuos de aminoácidos están sustituidos con otro residuo de aminoácido. Adicionalmente, el polipéptido puede tener la secuencia NAVXXXXXXXXXXXXXXXXXRTTC.

60 Anticuerpos

65 El término "anticuerpo" en el presente documento se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (Miller *et al* (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmune que es

capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítopes, reconocidos por CDRs en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítipo diferente tiene una estructura diferente. De esta manera, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte del mismo, tales dianas incluyendo, pero no se limitan a, célula cancerosa o células que producen anticuerpos autoinmunes asociados a una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas se pueden derivar de cualquier especie, que incluye origen humano, murino o de conejo.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una librería de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "anticuerpo monoclonal", como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se pueden sintetizar sin ser contaminados por otros anticuerpos. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no se debe interpretar como que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que serán utilizados de conformidad con la presente invención se pueden preparar mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al* (1975) *Nature* 256:495, o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase el documento US 4816567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de librerías de anticuerpos de fago utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks *et al* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, o de ratones transgénicos que llevan un sistema de inmunoglobulina completamente humana (Lonberg (2008) *Curr. Opinion* 20(4):450-459).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados a partir de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados a partir de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison *et al* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas a partir de un primate no humano (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo o Simio Superior) y secuencias de la región constante humanas.

Un "anticuerpo intacto" en el presente documento es uno que comprende un dominio VL y VH, así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de la misma. El anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras", las cuales se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y regulación por disminución de receptores de la superficie celular tales como receptor de células B y BCR.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, e IgA2. Los dominios constantes de cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Humanización

Las técnicas para reducir la inmunogenicidad *in vivo* de un anticuerpo no humano o fragmento de anticuerpo incluyen las denominadas "humanización".

- 5 Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un polipéptido que comprende por lo menos una porción de una región variable modificada de un anticuerpo humano en donde una porción de la región variable, preferiblemente una porción sustancialmente menor que el dominio variable humano intacto, se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana y en donde la región variable modificada está enlazada a por lo menos otra parte de otra proteína, preferiblemente la región constante de un anticuerpo humano. La expresión "anticuerpos humanizados" incluye anticuerpos humanos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad ("CDR") y/o uno o más residuos de aminoácidos de la región estructural ("FW" o "FR") están sustituidos por residuos de aminoácidos de sitios análogos en roedores u otros anticuerpos no humanos. La expresión "anticuerpo humanizado" también incluye una variante de la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende una FR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. O, visto de otra forma, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo humano que también contiene secuencias seleccionadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) en lugar de las secuencias humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones de aminoácidos conservativas o residuos no naturales de las mismas especies o de especies diferentes que no alteran significativamente su unión y/o actividad biológica. Tales anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas.

25 Existe una gama de técnicas de humanización, que incluyen "injerto de CDR", "selección guiada", "desinmunización", "acondicionamiento superficial" (también conocido como "inactivación"), "anticuerpos compuestos", "Optimización de Contenidos de la Cadena Humana" y barajado de regiones estructurales.

30 Injerto de CDR

En esta técnica, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en donde los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo del receptor están sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo del donante) tales como ratón, rata, camello, bovino, cabra o conejo que tiene las propiedades deseadas (de hecho, las CDRs no humanas están 'inertadas' sobre la región estructural humana). En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por residuos no humanos correspondientes (esto puede ocurrir cuando, por ejemplo, un residuo de FR particular tiene efecto significativo sobre la unión a antígeno).

40 Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que ni se encuentran en el anticuerpo del receptor ni en la CDR importada o secuencias de la región estructural. Estas modificaciones se hacen para refinar y maximizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. De esta manera, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá todos de por lo menos uno, y en un aspecto dos, dominios variables, en los cuales todos o todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), o aquella de una inmunoglobulina humana.

50 Selección guiada

El procedimiento consiste en combinar el dominio V_H o V_L de un anticuerpo no humano dado específico para un epítipo particular con una librería de V_H o V_L humana y los dominios V humanos específicos se seleccionan contra el antígeno de interés. Este V_H humano seleccionado se combina a continuación con una librería de V_L para generar una combinación de $V_H \times V_L$ completamente humana. El método se describe en Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899-903.

60 Anticuerpos compuestos

En este método, dos o más segmentos de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano se combinan dentro de la molécula de anticuerpo final. Se construyen mediante la combinación de múltiples segmentos de la secuencia de V_H y V_L humana en combinaciones que limitan o evitan los epítopos de células T humanos en las regiones V de anticuerpos compuestos finales. Si se requiere, los epítopos de células T se limitan o evitan mediante el intercambio de segmentos de las regiones V que contribuyen a o que codifican un epítipo de células T con segmentos alternativos que evitan epítopos de células T. Este método se describe en el documento US 2008/0206239 A1.

65

Desimmunización

Este método implica la eliminación de epítopes de células T humanos (u otra segunda especie) de las regiones V del anticuerpo terapéutico (u otra molécula). La secuencia de las regiones V de anticuerpos terapéuticos se analiza en cuanto a la presencia de motivos de unión al MHC de clase II por, por ejemplo, comparación con bases de datos de motivos de unión al MHC (tales como la base de datos de "motivos" alojada en www.wehi.edu.au). Alternativamente, los motivos de unión al MHC de clase II se pueden identificar utilizando métodos de plegamiento computacional tales como aquellos contemplados por Altuvia et al (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); en estos métodos, los péptidos de solapamiento consecutivos de las secuencias de las regiones V se están probando en cuanto sus energías de unión a proteínas del MHC de clase II. Estos datos se pueden combinar a continuación con información sobre otras características de secuencias que se refieren a péptidos satisfactoriamente presentados, tales como anfipaticidad, motivos de Rothbard, y sitios de escisión para cathepsina B y otras enzimas de procesamiento.

Una vez que se han identificado epítopes de células T (por ejemplo, humanos) de segundas especies potenciales, se eliminan mediante la alteración de uno o más aminoácidos. Los aminoácidos modificados están normalmente dentro del propio epítope de células T, pero también pueden estar adyacentes al epítope en términos de la estructura primaria o secundaria de la proteína (y, por tanto, pueden no estar adyacentes en la estructura primaria). Lo más típico, la alteración es a modo de sustitución pero, en algunas circunstancias, será más apropiada la adición o delección de aminoácidos.

Todas las alteraciones se pueden realizar mediante tecnología de ADN recombinante, de manera que la molécula final se pueda preparar mediante la expresión de un huésped recombinante utilizando métodos bien establecidos tales como Mutagénesis Dirigida al Sitio. Sin embargo, también es posible el uso de química de proteínas o cualquier otro medio de alteración molecular.

Acondicionamiento superficial

Este método implica:

- (a) determinar la estructura conformacional de la región variable del anticuerpo no humano (por ejemplo, roedor) (o fragmento del mismo) mediante la construcción de un modelo tridimensional de la región variable del anticuerpo no humano;
- (b) generar alineamientos de secuencias utilizando distribuciones de relativa accesibilidad a partir de estructuras cristalográficas de rayos X de un número suficiente de cadenas pesadas y ligeras de las regiones variables de anticuerpos no humanos y humanos para dar un conjunto de posiciones de las regiones estructurales de las cadenas pesadas y ligeras en donde las posiciones de alineamiento son idénticas en 98% del número suficiente de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos no humanos;
- (c) definir para el anticuerpo no humano que será humanizado un conjunto de residuos de aminoácidos expuestos sobre la superficie de las cadenas pesadas y ligeras utilizando el conjunto de posiciones de la región estructural generadas en la etapa (b);
- (d) identificar a partir de las secuencias de aminoácidos de anticuerpo humano un conjunto de residuos de aminoácidos expuestos sobre la superficie de las cadenas pesadas y ligeras que es lo más estrechamente idéntico al conjunto de residuos de aminoácidos expuestos sobre la superficie definidos en la etapa (c), en donde la cadena pesada y ligera del anticuerpo humano están o no están naturalmente apareadas;
- (e) sustituir, en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo no humano que será humanizado, el conjunto de residuos de aminoácidos expuestos sobre la superficie de las cadenas pesadas y ligeras definido en la etapa (c) con el conjunto de residuos de aminoácidos expuestos sobre la superficie de las cadenas pesadas y ligeras identificado en la etapa (d);
- (f) construir un modelo tridimensional de la región variable del anticuerpo no humano resultante de la sustitución especificada en la etapa (e);
- (g) identificar, mediante la comparación de los modelos tridimensionales construidos en las etapas (a) y (f), cualquier residuo de aminoácido de los conjuntos identificados en las etapas (c) o (d), que están dentro de 5 Angstroms de cualquier átomo de cualquier residuo de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo no humano que será humanizado; y
- (h) cambiar cualquier residuo identificado en la etapa (g) del residuo de aminoácido no humano original para definir de ese modo un conjunto humanizante de anticuerpos no humanos de residuos de aminoácidos expuestos sobre la superficie; con la condición de que la etapa (a) no necesita realizarse primero, pero debe realizarse antes de la etapa (g).

Superhumanización

El método compara la secuencia no humana con el repertorio de genes de la línea germinal humana funcional. Se seleccionan aquellos genes humanos que codifican estructuras canónicas idénticas o estrechamente relacionadas con las secuencias no humanas. Se eligen aquellos genes humanos seleccionados con la mayor homología dentro de las CDRs como donantes de FR. Finalmente, las CDRs no humanas se injertan sobre estas FRs humanas. Este método se describe en la patente WO 2005/079479 A2.

Optimización de Contenidos de la Cadena Humana

Este método compara la secuencia no humana (por ejemplo, de ratón) con el repertorio de genes de la línea germinal humana y las diferencias se puntúan como Contenido de la Cadena Humana (HSC) que cuantifica una secuencia en el nivel de epítopes de MHC/células T potenciales. A continuación, la secuencia diana se humaniza maximizando su HSC en lugar de utilizar una medición de identidad global para generar múltiples variantes humanizadas diversas (descritas en *Molecular Immunology*, 44, (2007) 1986-1998).

Barajado de Regiones Estructurales

Las CDRs del anticuerpo no humano están fusionadas en marco con conjuntos de ADNc que abarcan todas las regiones estructurales de genes de la línea germinal humana de cadenas pesadas y ligeras conocidas. A continuación, los anticuerpos humanizados se seleccionan, por ejemplo, mediante inmunopurificación de la librería de anticuerpos desplegados en fago. Esto se describe en *Methods* 36, 43-60 (2005).

Ejemplos de agentes de unión a célula incluyen aquellos agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930.

A continuación se enumeran antígenos asociados a tumor y anticuerpos relacionados para su uso en las modalidades de la presente invención.

ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR Y ANTICUERPOS RELACIONADOS**(1) BMPR1B (receptor de la proteína morfogenética ósea tipo 1B)**Nucleótido

Acceso de GenBank No. NM_001203

Versión de Genbank No. NM_001203.2 GI:169790809

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:06 PM

Polipéptido

Acceso de GenBank No. NP_001194

Versión de Genbank No. NP_001194.1 GI:4502431

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:06 PM

Referencias cruzadas

Ten Dijke, P., *et al Science* 264 (5155): 101-104 (1994), *Oncogene* 14 (11):1377-1382 (1997); WO2004/063362 (Reivindicación 2); WO2003/042661 (Reivindicación 12); US2003/134790-A1 (Páginas 38-39); WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 296); WO2003/055443 (Página 91-92); WO2002/99122 (Ejemplo 2; Páginas 528-530); WO2003/029421 (Reivindicación 6); WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig. 112); WO2002/98358 (Reivindicación 1; Página 183); WO2002/54940 (Páginas 100-101); WO2002/59377 (Páginas 349-350); WO2002/30268 (Reivindicación 27; Página 376); WO2001/48204 (Ejemplo; Fig. 4); NP_001194 receptor de la proteína morfogenética ósea, tipo 1B/pid=NP_001194.1.; MIM:603248; AY065994

(2) E16 (LAT1, SLC7A5)Nucleótido

Acceso de GenBank No. NM_003486

Versión de Genbank No. NM_003486.5 GI:71979931

Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:06 PM

Polipéptido

Acceso de GenBank No. NP_003477

Versión de Genbank No. NP_003477.4 GI:71979932

Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:06 PM

Referencias cruzadas

Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), *Nature* 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., *et al* (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16):11267-11273; WO2004/048938 (Ejemplo 2); WO2004/032842 (Ejemplo IV); WO2003/042661

(Reivindicación 12); WO2003/016475 (Reivindicación 1); WO2002/78524 (Ejemplo 2); WO2002/99074 (Reivindicación 19; Páginas 127-129); WO2002/86443 (Reivindicación 27; Páginas 222, 393); WO2003/003906 (Reivindicación 10; Página 293); WO2002/64798 (Reivindicación 33; Páginas 93-95); WO2000/14228 (Reivindicación 5; Páginas 133-136); US2003/224454 (Fig. 3); WO2003/025138 (Reivindicación 12; Página 150); NP_003477 familia 7 de transportadores y solutos (transportador de aminoácidos catiónicos, y+system), miembro 5/pid=NP_003477.3 - Homo sapiens; MIM:600182; NM_015923.

(3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis transmembrana de la próstata)

10 Nucleótido

Acceso de GenBank No. NM_012449
 Versión de Genbank No. NM_012449.2 GI:22027487
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 9 de septiembre de 2012 02:57 PM

15

Polipéptido

Acceso de GenBank No. NP_036581
 Versión de Genbank No. NP_036581.1 GI:9558759
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 9 de septiembre de 2012 02:57 PM

20

Referencias cruzadas

25 *Cancer Res.* 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., *et al* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25):14523-14528); WO2004/065577 (Reivindicación 6); WO2004/027049 (Fig. 1L); EP1394274 (Ejemplo 11); WO2004/016225 (Reivindicación 2); WO2003/042661 (Reivindicación 12); US2003/157089 (Ejemplo 5); US2003/185830 (Ejemplo 5); US2003/064397 (Fig. 2); WO2002/89747 (Ejemplo 5; Páginas 618-619); WO2003/022995 (Ejemplo 9; Fig. 13A, Ejemplo 53; Página 173, Ejemplo 2; Fig. 2A); antígeno epitelial de seis transmembrana de la próstata; MIM:604415.

30 **(4) 0772P (CA125, MUC16)**

Nucleótido

Acceso de GenBank No. AF361486
 Versión de Genbank No. AF361486.3 GI:34501466
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 07:56 AM

35

Polipéptido

Acceso de GenBank No. AAK74120
 Versión de Genbank No. AAK74120.3 GI:34501467
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 07:56 AM

40

Referencias cruzadas

45

J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); WO2004/045553 (Reivindicación 14); WO2002/92836 (Reivindicación 6; Fig. 12); WO2002/83866 (Reivindicación 15; Páginas 116-121); US2003/124140 (Ejemplo 16); GI:34501467;

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina)

50

Nucleótido

Acceso de GenBank No. NM_005823
 Versión de Genbank No. NM_005823.5 GI:293651528
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:47 PM

55

Polipéptido

Acceso de GenBank No. NP_005814
 Versión de Genbank No. NP_005814.2 GI:53988378
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:47 PM

60

Referencias cruzadas

65 Yamaguchi, N., *et al Biol. Chem.* 269 (2), 805-808 (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (20):11531-11536 (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1):136-140 (1996), *J. Biol. Chem.* 270 (37):21984-21990 (1995); WO2003/101283

(Reivindicación 14); WO2002/102235 (Reivindicación 13; Páginas 287-288); WO2002/101075 (Reivindicación 4; Páginas 308-309); WO2002/71928 (Páginas 320-321); WO94/10312 (Páginas 52-57); IM:601051.

5 **(6)** *Napi3b* (*NAPI-3B*, *NPTIIb*, *SLC34A2*, familia 34 de transportador y soluto (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente de sodio tipo II)

Nucleótido

10 Acceso de GenBank No. NM_006424
 Versión de Genbank No. NM_006424.2 GI:110611905
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 03:39 PM

Polipéptido

15 Acceso de GenBank No. NP_006415
 Versión de Genbank No. NP_006415.2 GI: 110611906
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 03:39 PM

Referencias cruzadas

20 *J. Biol. Chem.* 277 (22):19665-19672 (2002), *Genomics* 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., *et al* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258 (3):578-582; WO2004/022778 (Reivindicación 2); EP1394274 (Ejemplo 11); WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 326); EP0875569 (Reivindicación 1; Páginas 17-19); WO2001/57188 (Reivindicación 20; Página 329); WO2004/032842 (Ejemplo IV); WO2001/75177 (Reivindicación 24; Páginas 139-140); MIM:604217.

30 **(7)** *Sema 5b* (*FLJ10372*, *KIAA1445*, *Mm.42015*, *SEMA5B*, *SEMAG*, *semaforina 5b Hlog*, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similares a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B)

Nucleótido

35 Acceso de GenBank No. AB040878
 Versión de Genbank No. AB040878.1 GI:7959148
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de agosto de 2006 05:40 PM

Polipéptido

40 Acceso de GenBank No. BAA95969
 65 Versión de Genbank No. BAA95969.1 GI:7959149
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de agosto de 2006 05:40 PM

Referencias cruzadas

45 Nagase T., *et al* (2000) *DNA Res.* 7 (2):143-150; WO2004/000997 (Reivindicación 1); WO2003/003984 (Reivindicación 1); WO2002/06339 (Reivindicación 1; Página 50); WO2001/88133 (Reivindicación 1; Páginas 41-43, 48-58); WO2003/054152 (Reivindicación 20); WO2003/101400 (Reivindicación 11); Acceso: Q9P283; Genew; HGNC: 10737

50 **(8)** *PSCA hlg* (2700050C12Rik, C530008O16Rik, ADNc de RIKEN 2700050C12, ADNc de RIKEN gen 2700050C12)

Nucleótido

55 Acceso de GenBank No. AY358628
 Versión de Genbank No. AY358628.1 GI:37182377
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de diciembre de 2009 04:15 AM

Polipéptido

60 Acceso de GenBank No. AAQ88991
 Versión de Genbank No. AAQ88991.1 GI:37182378
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de diciembre de 2009 04:15 AM

Referencias cruzadas

65 Ross *et al* (2002) *Cancer Res.* 62:2546-2553; US2003/129192 (Reivindicación 2); US2004/044180 (Reivindicación

12); US2004/044179 (Reivindicación 11); US2003/096961 (Reivindicación 11); US2003/232056 (Ejemplo 5); WO2003/105758 16 (Reivindicación 12); US2003/206918 (Ejemplo 5); EP1347046 (Reivindicación 1); WO2003/025148 (Reivindicación 20); GI:37182378.

5 **(9) ETBR (receptor tipo B de endotelina)**

Nucleótido

Acceso de GenBank No. AY275463

10 Versión de Genbank No. AY275463.1 GI:30526094

Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 02:26 AM

Polipéptido

15 Acceso de GenBank No. AAP32295

Versión de Genbank No. AAP32295.1 GI:30526095

Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 02:26 AM

Referencias cruzadas

20 Nakamuta M., *et al Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., *et al Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 248-255, 1991; Arai H., *et al Jpn. Circ. J.* 56, 1303-1307, 1992; Arai H., *et al J. Biol. Chem.* 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., *et al Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 656-663, 1991; Elshorabagy N.A., *et al J. Biol. Chem.* 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., *et al J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., *et al Gene* 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., *et al J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., *et al Biol. Chem.* 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., *et al Am. J. Med. Genet.* 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., *et al Eur. J. Hum. Genet.* 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., *et al Cell* 79, 1257-1266, 1994; Attie T., *et al Hum. Mol. Genet.* 4, 2407- 2409, 1995; Auricchio A., *et al Hum. Mol. Genet.* 5:351-354, 1996; Amiel J., *et al Hum. Mol. Genet.* 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., *et al Nat. Genet.* 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., *et al Hum. Genet.* 103, 145-148, 1998; Fuchs S., *et al Mol. Med.* 7, 115-124, 2001; Pingault V., *et al (2002) Hum. Genet.* 111, 198-206; WO2004/045516 (Reivindicación 1); WO2004/048938 (Ejemplo 2); WO2004/040000 (Reivindicación 151); WO2003/087768 (Reivindicación 1); WO2003/016475 (Reivindicación 1); WO2003/016475 (Reivindicación 1); WO2002/61087 (Fig. 1); WO2003/016494 (Fig. 6); WO2003/025138 (Reivindicación 12; Página 144); WO2001/98351 (Reivindicación 1; Páginas 124-125); EP0522868 (Reivindicación 8; Fig. 2); WO2001/77172 (Reivindicación 1; Páginas 297-299); US2003/109676; US6518404 (Fig. 3); US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); WO2004/001004.

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315)

40 Nucleótido

Acceso de GenBank No. NM_017763

Versión de Genbank No. NM_017763.4 GI:167830482

Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 12:34 AM

45

Polipéptido

Acceso de GenBank No. NP_060233

Versión de Genbank No. NP_060233.3 GI:56711322

50 Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 12:34 AM

Referencias cruzadas

55 WO2003/104275 (Reivindicación 1); WO2004/046342 (Ejemplo 2); WO2003/042661 (Reivindicación 12); WO2003/083074 (Reivindicación 14; Página 61); WO2003/018621 (Reivindicación 1); WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig. 93); WO2001/66689 (Ejemplo 6); ID de locus: 54894.

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis transmembrana)

60

Nucleótido

Acceso de GenBank No. AF455138

65 Versión de Genbank No. AF455138.1 GI:22655487

Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:54 AM

Polipéptido

Acceso de GenBank No. AAN04080
 5 Versión de Genbank No. AAN04080.1 GI:22655488
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:54 AM

Referencias cruzadas

10 Lab. Invest. 82(11): 1573-1582 (2002); WO2003/087306; US2003/064397 (Reivindicación 1; Fig. 1); WO2002/72596
 (Reivindicación 13; Páginas 54-55); WO2001/72962 (Reivindicación 1; Fig. 4B); WO2003/104270 (Reivindicación 11);
 WO2003/104270 (Reivindicación 16); US2004/005598 (Reivindicación 22); WO2003/042661 (Reivindicación 12);
 US2003/060612 (Reivindicación 12; Fig. 10); WO2002/26822 (Reivindicación 23; Fig. 2); WO2002/16429
 (Reivindicación 12; Fig. 10); GI:22655488.

15 **(12)** *TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal 5 catiónico de potencial de receptor transitorio, subfamilia M, miembro 4)*

Nucleótido

20 Acceso de GenBank No. NM_017636
 Versión de Genbank No. NM_017636.3 GI:304766649
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de junio de 2012 11:27 AM

Polipéptido

25 Acceso de GenBank No. NP_060106
 Versión de Genbank No. NP_060106.2 GI:21314671
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de junio de 2012 11:27 AM

30 Referencias cruzadas

Xu, X.Z., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (19): 10692-10697 (2001), *Cell* 109 (3):397-407 (2002), *J. Biol. Chem.*
 278 (33):30813-30820 (2003); US2003/143557 (Reivindicación 4); WO2000/40614 (Reivindicación 14; Páginas 100-
 35 103); WO2002/10382 (Reivindicación 1; Fig. 9A); WO2003/042661 (Reivindicación 12); WO2002/30268
 (Reivindicación 27; Página 391); US2003/219806 (Reivindicación 4); WO2001/62794 (Reivindicación 14; Fig. 1A-D);
 MIM:606936.

40 **(13)** *CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma)*

Nucleótido

45 Acceso de GenBank No. NM_003212
 Versión de Genbank No. NM_003212.3 GI:292494881
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:27 PM

Polipéptido

50 Acceso de GenBank No. NP_8003203
 Versión de Genbank No. NP_8003203.1 GI:4507425
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:27 PM

Referencias cruzadas

55 Ciccodicola, A., et al *EMBO J.* 8 (7):1987-1991 (1989), *Am. J. Hum. Genet.* 49 (3):555-565 (1991); US2003/224411
 (Reivindicación 1); WO2003/083041 (Ejemplo 1); WO2003/034984 (Reivindicación 12); WO2002/88170
 (Reivindicación 2; Páginas 52-53); WO2003/024392 (Reivindicación 2; Fig. 58); WO2002/16413 (Reivindicación 1;
 60 PáginaS 94-95, 105); WO2002/22808 (Reivindicación 2; Fig. 1); US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); US5792616 (Fig.
 2); MIM:187395.

(14) *CD21 (CR2 (Receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor de virus de Epstein Barr) o Hs. 73792)*

Nucleótido

65 Acceso de GenBank No. M26004
 Versión de Genbank No. M26004.1 GI:181939

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Polipéptido

5 Acceso de GenBank No. AAA35786
 Versión de Genbank No. AAA35786.1 GI:181940
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Referencias cruzadas

10 Fujisaku, *et al* (1989) *J. Biol. Chem.* 264 (4):2118-2125; Weis J.J., *et al J. Exp. Med.* 167, 1047-1066, 1988; Moore M., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9194-9198, 1987; Barel M., *et al Mol. Immunol.* 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., *et al* (1993) *J. Immunol.* 150, 5311-5320; WO2004/045520 (Ejemplo 4); US2004/005538 (Ejemplo 1); WO2003/062401 (Reivindicación 9); WO2004/045520 (Ejemplo 4); WO91/02536 (Fig. 9.1-9.9); WO2004/020595 (Reivindicación 1); Acceso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

(15) *CD79b* (*CD79B*, *CD79 β* , *IGb* (*beta asociada a inmunoglobulina*), *B29*)

20 Nucleótido

Acceso de GenBank No. NM_000626
 Versión de Genbank No. NM_000626.2 GI:90193589
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:53 PM

25 Polipéptido

Acceso de GenBank No. NP_000617
 Versión de Genbank No. NP_000617.1 GI:11038674
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:53 PM

Referencias cruzadas

35 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100 (7):4126-4131, *Blood* (2002) 100 (9):3068-3076, Muller *et al* (1992) *Eur. J. Immunol.* 22 (6):1621-1625; WO2004/016225 (Reivindicación 2, Fig. 140); WO2003/087768, US2004/101874 (Reivindicación 1, Página 102); WO2003/062401 (Reivindicación 9); WO2002/78524 (Ejemplo 2); US2002/150573 (Reivindicación 5, Página 15); US5644033; WO2003/048202 (Reivindicación 1, Páginas 306 y 309); WO 99/58658, US6534482 (Reivindicación 13, Fig. 17A/B); WO2000/55351 (Reivindicación 11, Páginas 1145-1146); MIM:147245

40 (16) *FcRH2* (*IFGP4*, *IRTA4*, *SPAP1A* (*Dominio SH2 que contiene proteína de anclaje a fosfatasa 1a 5*), *SPAP1B*, *SPAP1C*)

Nucleótido

45 Acceso de Genbank No. NM_030764
 Versión de Genbank No. NM_030764.3 GI:227430280
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de junio de 2012 12:30 AM

Polipéptido

50 Acceso de Genbank No. NP_110391
 Versión de Genbank No. NP_110391.2 GI:19923629
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de junio de 2012 12:30 AM

55 Referencias cruzadas

60 AY358130); *Genome Res.* 13 (10):2265-2270 (2003), *Immunogenetics* 54 (2):87-95 (2002), *Blood* 99 (8):2662-2669 (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., *et al* (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (3):768-775; WO2004/016225 (Reivindicación 2); WO2003/077836; WO2001/38490 (Reivindicación 5; Fig. 18D-1-18D-2); WO2003/097803 (Reivindicación 12); WO2003/089624 (Reivindicación 25); MIM:606509.

(17) *HER2* (*ErbB2*)

Nucleótido

65 Acceso de Genbank No. M11730

Versión de Genbank No. M11730.1 GI: 183986

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Polipéptido

5

Acceso de Genbank No. AAA75493

Versión de Genbank No. AAA75493.1 GI:306840

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

10 Referencias cruzadas

Coussens L., *et al Science* (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., *et al Nature* 319, 230-234, 1986; Semba K., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., *et al J. Cell Biol.* 165, 869- 880, 2004; Kuhns J.J., *et al J. Biol. Chem.* 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., *et al Nature* 421, 756-760, 2003; Ehsani A., *et al* (1993) *Genomics* 15, 426-429; WO2004/048938 (Ejemplo 2); WO2004/027049 (Fig. 1); WO2004/009622; WO2003/081210; WO2003/089904 (Reivindicación 9); WO2003/016475 (Reivindicación 1); US2003/118592; WO2003/008537 (Reivindicación 1); WO2003/055439 (Reivindicación 29; Fig. 1A-B); WO2003/025228 (Reivindicación 37; Fig. 5C); WO2002/22636 (Ejemplo 13; página 95-107); WO2002/12341 (Reivindicación 68; Fig. 7); WO2002/13847 (Páginas 71-74); WO2002/14503 (Páginas 114-117); WO2001/53463 (Reivindicación 2; Páginas 41-46); WO2001/41787 (Página 15); WO2000/44899 (Reivindicación 52; Fig. 7); WO2000/20579 (Reivindicación 3; Fig. 2); US5869445 (Reivindicación 3; Col 31-38); WO9630514 (Reivindicación 2; Páginas 56-61); EP1439393 (Reivindicación 7); WO2004/043361 (Reivindicación 7); WO2004/022709; WO2001/00244(Ejemplo 3; Fig. 4); Acceso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1

25 ANTICUERPOS

Abbott: US20110177095

Por ejemplo, un anticuerpo que comprende CDRs que tienen en general por lo menos 80% de identidad de secuencias con CDRs que tienen secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 3 (CDR-H1), SEC ID NO: 4 (CDR-H2), SEC ID NO: 5 (CDR-H3), SEC ID NO: 104 y/o SEC ID NO: 6 (CDR-L1), SEC ID NO: 7 (CDR-L2), y SEC ID NO: 8 (CDR-L3), en donde el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de unión anti-HER2 tiene inmunogenicidad reducida en comparación con un anticuerpo que tiene una VH de SEC ID NO: 1 y una VL de SEC ID NO: 2.

Biogen: US20100119511

Por ejemplo, números de acceso de ATCC: PTA-10355, PTA-10356, PTA-10357, PTA-10358

Por ejemplo, una molécula de anticuerpo purificada que se une a HER2 que comprende todas las seis CDRs de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en BIIB71F10 (SEC ID NOs: 11, 13), BIIB69A09 (SEC ID NOs: 15, 17); BIIB67F10 (SEC ID NOs: 19, 21); BIIB67F11 (SEC ID NOs: 23, 25), BIIB66A12 (SEC ID NOs: 27, 29), BIIB66C01 (SEC ID NOs: 31, 33), BIIB65C10 (SEC ID NOs: 35, 37), BIIB65H09 (SEC ID NOs: 39, 41) y BIIB65B03 (SEC ID NOs: 43, 45), o CDRs que son idénticas o que tienen no más de dos alteraciones de dichas CDRs.

Herceptin (Genentech) –US6.054.297; no. de acceso de ATCC CRL-10463 (Genentech)

Pertuzumab (Genentech)

US20110117097

por ejemplo, véanse SEC ID NOs: 15 y 16, SEC ID NOs: 17 y 18, SEC ID NOs: 23 y 24 y los números de acceso de ATCC HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12697.

US20090285837

US20090202546

por ejemplo, números de acceso de ATCC: HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12698.

US20060088523

- por ejemplo, números de acceso de ATCC: HB-12215, HB-12216

- por ejemplo, un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos ligeras variables y pesadas variables en SEC ID NOs: 3 y 4, respectivamente.

- por ejemplo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera seleccionada de SEC ID NOs: 15 y 23 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada de SEC ID NOs: 16 y 24

US20060018899

- por ejemplo, números de acceso de ATCC: (7C2) HB-12215, (7F3) HB-12216, (4D5) CRL-10463, (2C4) HB-12697.

- por ejemplo, un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos en SEC ID NO: 23, o una variante desamidada y/u oxidada del mismo.

US2011/0159014

- 5 - por ejemplo, un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena ligera que comprende las regiones hipervariables de SEC ID NO: 1.
 - Por ejemplo, un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena pesada que comprende las regiones hipervariables de SEC ID NO: 2.

US20090187007

- 10 Glycotope: anticuerpo TrasGEX <http://www.glycotope.com/pipeline>
 Por ejemplo, véase International Joint Cancer Institute and Changhai Hospital Cancer Cent: HMTI-Fc Ab - Gao J., et al *BMB Rep.* 31 oct 2009; 42(10):636-41.

- 15 Symphogen: US20110217305

Union Stem Cell & Gene Engineering, China - Liu HQ., et al *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* Mayo 2010; 26(5):456-8.

- 20 **(18) NCA (CEACAM6)**

Nucleótido

- 25 Acceso de Genbank No. M18728
 Versión de Genbank No. M18728.1 GI:189084
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Polipéptido

- 30 Acceso de Genbank No. AAA59907
 Versión de Genbank No. AAA59907.1 GI:189085
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Referencias cruzadas

- 35 Barnett T., et al *Genomics* 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16899-16903, 2002; WO2004/063709; EP1439393 (Reivindicación 7); WO2004/044178 (Ejemplo 4); WO2004/031238; WO2003/042661 (Reivindicación 12); WO2002/78524 (Ejemplo 2); WO2002/86443 (Reivindicación 27; Página 427); WO2002/60317 (Reivindicación 2);
 40 Acceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728.

(19) MDP (DPEP1)

Nucleótido

- 45 Acceso de Genbank No. BC017023
 Versión de Genbank No. BC017023.1 GI:16877538
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 01:00 PM

Polipéptido

- 50 Acceso de Genbank No. AAH17023
 Versión de Genbank No. AAH17023.1 GI:16877539
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 01:00 PM

Referencias cruzadas

- 60 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26):16899-16903 (2002); WO2003/016475 (Reivindicación 1); WO2002/64798 (Reivindicación 33; Páginas 85-87); JP05003790 (Fig. 6-8); WO99/46284 (Fig. 9); MIM:179780.

(20) IL20R-alfa (IL20Ra, ZCYTOR7)

Nucleótido

- 65 Acceso de Genbank No. AF184971
 Versión de Genbank No. AF184971.1 GI:6013324

Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 10:00 PM

Polipéptido

5 Acceso de Genbank No. AAF01320
 Versión de Genbank No. AAF01320.1 GI:6013325
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 10:00 PM

Referencias cruzadas

10 Clark H.F., *et al Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., *et al Nature* 425, 805-811, 2003; Blumberg H., *et al Cell* 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., *et al J. Immunol.* 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., *et al J. Biol. Chem.* 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., *et al (2003) Biochemistry* 42:12617-12624; Sheikh F., *et al (2004) J. Immunol.* 172, 2006-2010; EP1394274 (Ejemplo 11); US2004/005320 (Ejemplo 5);
 15 WO2003/029262 (Páginas 74-75); WO2003/002717 (Reivindicación 2; Página 63); WO2002/22153 (Páginas 45-47); US2002/042366 (Páginas 20-21); WO2001/46261 (Páginas 57-59); WO2001/46232 (Páginas 63-65); WO98/37193 (Reivindicación 1; Páginas 55-59); Acceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) Brevican (BCAN, BEHAB)

20 Nucleótido

Acceso de Genbank No. AF229053
 Versión de Genbank No. AF229053.1 GI: 10798902
 25 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 12:58 AM

Polipéptido

30 Acceso de Genbank No. AAG23135
 Versión de Genbank No. AAG23135.1 GI:10798903
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 12:58 AM

Referencias cruzadas

35 Gary S.C., *et al Gene* 256, 139-147, 2000; Clark H.F., *et al Genome Res.* 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16899-16903, 2002; US2003/186372 (Reivindicación 11); US2003/186373 (Reivindicación 11); US2003/119131 (Reivindicación 1; Fig. 52); US2003/119122 (Reivindicación 1; Fig. 52); US2003/119126 (Reivindicación 1); US2003/119121 (Reivindicación 1; Fig. 52); US2003/119129 (Reivindicación 1); US2003/119130 (Reivindicación 1); US2003/119128 (Reivindicación 1; Fig. 52); US2003/119125 (Reivindicación 1);
 40 WO2003/016475 (Reivindicación 1); WO2002/02634 (Reivindicación 1)

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5)

45 Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_004442
 Versión de Genbank No. NM_004442.6 GI:111118979
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 8 de septiembre de 2012 04:43 PM

50 Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_004433
 Versión de Genbank No. NP_004433.2 GI:21396504
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 8 de septiembre de 2012 04:43 PM

55 Referencias cruzadas

Chan, J. y Watt, V.M., *Oncogene* 6 (6), 1057-1061 (1991) *Oncogene* 10 (5):897-905 (1995), *Annu. Rev. Neurosci.* 21:309-345 (1998), *Int. Rev. Cytol.* 196:177-244 (2000); WO2003042661 (Reivindicación 12); WO200053216 (Reivindicación 1; Página 41); WO2004065576 (Reivindicación 1); WO2004020583 (Reivindicación 9); WO2003004529 (Páginas 128-132); WO200053216 (Reivindicación 1; Página 42); MIM:600997.

(23) ASLG659 (B7h)

65

Nucleótido

Acceso de Genbank No. AX092328
 Versión de Genbank No. AX092328.1 GI:13444478
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de enero de 2011 07:37 AM

5 Referencias cruzadas

US2004/0101899 (Reivindicación 2); WO2003104399 (Reivindicación 11); WO2004000221 (Fig. 3); US2003/165504 (Reivindicación 1); US2003/124140 (Ejemplo 2); US2003/065143 (Fig. 60); WO2002/102235 (Reivindicación 13; Página 299); US2003/091580 (Ejemplo 2); WO2002/10187 (Reivindicación 6; Fig. 10); WO2001/94641 (Reivindicación 12; Fig. 7b); WO2002/02624 (Reivindicación 13; Fig. 1A-1B); US2002/034749 (Reivindicación 54; Páginas 45-46); WO2002/06317 (Ejemplo 2; Páginas 320-321, Reivindicación 34; Páginas 321-322); WO2002/71928 (Páginas 468-469); WO2002/02587 (Ejemplo 1; Fig. 1); WO2001/40269 (Ejemplo 3; Páginas 190-192); WO2000/36107 (Ejemplo 2; Páginas 205-207); WO2004/053079 (Reivindicación 12); WO2003/004989 (Reivindicación 1); WO2002/71928 (Páginas 233-234, 452-453); documento WO 01/16318.

15 **(24) PSCA (Precursor de antígenos citoblásticos de la próstata)**

Nucleótido

20 Acceso de Genbank No. AJ297436
 Versión de Genbank No. AJ297436.1 GI:9367211
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 11:25 AM

Polipéptido

25 Acceso de Genbank No. CAB97347
 Versión de Genbank No. CAB97347.1 GI:9367212
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 11:25 AM

30 Referencias cruzadas

Reiter R.E., *et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., *et al Oncogene* 19, 1288-1296, 2000; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) 275(3):783-788; WO2004/022709; EP1394274 (Ejemplo 11); US2004/018553 (Reivindicación 17); WO2003/008537 (Reivindicación 1); WO2002/81646 (Reivindicación 1; Página 164); WO2003/003906 (Reivindicación 10; página 288); WO2001/40309 (Ejemplo 1; Fig. 17); US2001/055751 (Ejemplo 1; Fig. 1b); WO2000/32752 (Reivindicación 18; Fig. 1); WO98/51805 (Reivindicación 17; Página 97); WO98/51824 (Reivindicación 10; Página 94); WO98/40403 (Reivindicación 2; Fig. 1B); Acceso: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1

40 **(25) GEDA**

Nucleótido

45 Acceso de Genbank No. AY260763
 Versión de Genbank No. AY260763.1 GI:30102448
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 02:24 AM

Polipéptido

50 Acceso de Genbank No. AAP14954
 Versión de Genbank No. AAP14954.1 GI:30102449
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 02:24 AM

Referencias cruzadas

55 Proteína similar al patrón de fusión del lipoma HMGIC AP14954/pid=AAP14954.1 - Homo sapiens (humano); WO2003/054152 (Reivindicación 20); WO2003/000842 (Reivindicación 1); WO2003/023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); US2003/194704 (Reivindicación 45); GI:30102449.

60 **(26) BAFF-R (receptor del factor activador de células B, receptor 3 de BLyS, BR3)**

Nucleótido

65 Acceso de Genbank No. AF116456
 Versión de Genbank No. AF116456.1 GI:4585274
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 09:44 PM

Polipéptido

- 5 Acceso de Genbank No. AAD25356
 Versión de Genbank No. AAD25356.1 GI:4585275
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 09:44 PM

Referencias cruzadas

- 10 Receptor de BAFF/pid=NP_443177.1 - Homo sapiens: Thompson, J.S., *et al Science* 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO2004/058309; WO2004/011611; WO2003/045422 (Ejemplo; PáginaS 32-33); WO2003/014294 (Reivindicación 35; Fig. 6B); WO2003/035846 (Reivindicación 70; Páginas 615-616); WO2002/94852 (Col 136-137); WO2002/38766 (Reivindicación 3; Página 133); WO2002/24909 (Ejemplo 3; Fig. 3); MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600
- 15 **(27) CD22 (Isoforma del receptor CD22-B de células B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)**

Nucleótido

- 20 Acceso de Genbank No. AK026467
 Versión de Genbank No. AK026467.1 GI:10439337
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de septiembre de 2006 11:24 PM

Polipéptido

- 25 Acceso de Genbank No. BAB15489
 Versión de Genbank No. BAB15489.1 GI:10439338
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de septiembre de 2006 11:24 PM

30 Referencias cruzadas

Wilson *et al* (1991) *J. Exp. Med.* 173:137-146; WO2003/072036 (Reivindicación 1; Fig. 1); IM: 107266; NP_001762.1; NM_001771_1.

- 35 **(27a) CD22 (Molécula CD22)**

Nucleótido

- 40 Acceso de Genbank No. X52785
 Versión de Genbank No. X52785.1 GI:29778
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:09 AM

Polipéptido

- 45 Acceso de Genbank No. CAA36988
 Versión de Genbank No. CAA36988.1 GI:29779
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:09 AM

Referencias cruzadas

- 50 Stamenkovic I. et al., *Nature* 345 (6270), 74-77 (1990)??

Otra información

- 55 Símbolo Oficial: CD22
 Otros Pseudónimos: SIGLEC-2, SIGLEC2
 Otras Designaciones: receptor CD22 de células B; molécula de adhesión a células de linfocitos B; BL-CAM; antígeno CD22; antígeno de superficie de células T Leu-14; lectina 2 similar a Ig de unión a ácido siálico; lectina 2 similar a Ig de unión a ácido siálico

- 60 **ANTICUERPOS**

G5/44 (Inotuzumab): DiJoseph JF., et al *Cancer Immunol Immunother.* Enero 2005; 54(1):11-24.

- 65 Epratuzumab - Goldenberg DM., et al *Expert Rev Anticancer Ther.* 6(10): 1341-53, 2006.

(28) CD79a (CD79A, CD79alfa), alfa asociada a inmunoglobulina, una proteína específica de células B que interacciona covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas 35 de IgM, traduce una señal que participa en la diferenciación de células B, pl: 4.84, MW: 25028 TM: 2 Cromosoma del Gen [P]: 19q13.2).

5

Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_001783

Versión de Genbank No. NM_001783.3 GI:90193587

10 Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:48 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_001774

15 Versión de Genbank No. NP_001774.1 GI:4502685

Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:48 PM

Referencias cruzadas

20 WO2003/088808, US2003/0228319; WO2003/062401 (Reivindicación 9); US2002/150573 (Reivindicación 4, Páginas 13-14); WO99/58658 (Reivindicación 13, Fig. 16); WO92/07574 (Fig. 1); US5644033; Ha, et al (1992) *J. Immunol.* 148(5): 1526-1531; Müller et al (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:1621-1625; Hashimoto et al (1994) *Immunogenetics* 40(4):287-295; Preud'homme et al (1992) *Clin. Exp. Immunol.* 90(1):141-146; Yu et al (1992) *J. Immunol.* 148(2) 633-637; Sakaguchi et al (1988) *EMBO J.* 7(11):3457-3464

25

(29) CXCR5 (Receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a la proteína G que se activa por la quimiocina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y defensa humoral, desempeña una función en la infección por el VIH-2 y quizás desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pl: 8.54 MW: 41959 TM: 7 Cromosoma del Gen [P]: 11q23.3

30

Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_001716

Versión de Genbank No. NM_001716.4 GI:342307092

35 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:49 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_001707

40 Versión de Genbank No. NP_001707.1 GI:4502415

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:49 PM

Referencias cruzadas

45 WO2004/040000; WO2004/015426; US2003/105292 (Ejemplo 2); US6555339 (Ejemplo 2); WO2002/61087 (Fig. 1); WO2001/57188 (Reivindicación 20, Página 269); WO2001/72830 (páginas 12-13); WO2000/22129 (Ejemplo 1, Páginas 152-153, Ejemplo 2, páginas 254-256); WO99/28468 (Reivindicación 1, Página 38); US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); WO94/28931 (Páginas 56-58); WO92/17497 (Reivindicación 7, Fig. 5); Dobner et al (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2795-2799; Barella et al (1995) *Biochem. J.* 309:773-779

50

(30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula de MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 6,56, MW: 30820. TM: 1 Cromosoma del Gen [P]: 6p21.3)

Nucleótido

55

Acceso de Genbank No. NM_002120

Versión de Genbank No. NM_002120.3 GI: 118402587

Fecha de actualización del registro de GenBank: 8 de septiembre de 2012 04:46 PM

Polipéptido

60

Acceso de Genbank No. NP_002111

Versión de Genbank No. NP_002111.1 GI:4504403

Fecha de actualización del registro de GenBank: 8 de septiembre de 2012 04:46 PM

65

Referencias cruzadas

Tonnelle *et al* (1985) *EMBO J.* 4(11):2839-2847; Jonsson *et al* (1989) *Immunogenetics* 29(6):411-413; Beck *et al* (1992) *J. Mol. Biol.* 228:433-441; Strausberg *et al* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899- 16903; Serenius *et al* (1987) *J. Biol. Chem.* 262:8759-8766; Beck *et al* (1996) *J. Mol. Biol.* 255:1-13; Naruse *et al* (2002) *Tissue Antigens* 59:512-519; WO99/58658 (Reivindicación 13, Fig. 15); US6153408 (Col 35-38); US5976551 (col 168-170); US6011146 (col 145-146); Kasahara *et al* (1989) *Immunogenetics* 30(1):66-68; Larhammar *et al* (1985) *J. Biol. Chem.* 260(26):14111-14119

(31) P2X5 (Canal 5 de iones regulado por el ligando del receptor purinérgico P2X, un canal de iones regulado por ATP extracelular, puede estar involucrado en la transmisión sináptica y la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad del detrusor idiopático); 422 aa, pl: 7.63, MW: 47206, TM: 1 Cromosoma del Gen [P]: 17p13.3).

Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_002561
Versión de Genbank No. NM_002561.3 GI:325197202
Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:41 AM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_002552
Versión de Genbank No. NP_002552.2 GI:28416933
Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:41 AM

Referencias cruzadas

Le *et al* (1997) *FEBS Lett.* 418(1-2):195-199; WO2004/047749; WO2003/072035 (Reivindicación 10); Touchman *et al* (2000) *Genome Res.* 10:165-173; WO2002/22660 (Reivindicación 20); WO2003/093444 (Reivindicación 1); WO2003/087768 (Reivindicación 1); WO2003/029277 (Página 82)

(32) CD72 (Antígeno de diferenciación de células B CD72, Lyb-2); 359 aa, pl: 8.66, MW: 40225, TM: 1 5 Cromosoma del gen [P]: 9p13.3).

Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_001782
Versión de Genbank No. NM_001782.2 GI:194018444
Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:43 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_001773
Versión de Genbank No. NP_001773.1 GI:4502683
Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:43 PM

Referencias cruzadas

WO2004042346 (Reivindicación 65); WO2003/026493 (Páginas 51-52, 57-58); WO2000/75655 (páginas 105-106); Von Hoegen *et al* (1990) *J. Immunol.* 144(12):4870-4877; Strausberg *et al* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 99:16899-16903.

(33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación y la apoptosis de células B, la pérdida de función está asociada a la elevada actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematosos sistémico); 661 aa, pl: 6.20, MW: 74147 TM: 1 Cromosoma del Gen [P]: 5q12).

Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_005582
Versión de Genbank No. NM_005582.2 GI:167555126
Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:50 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_005573

Versión de Genbank No. NP_005573.2 GI:167555127

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:50 PM

Referencias cruzadas

5 US2002/193567; WO97/07198 (Reivindicación 11, páginas 39-42); Miura *et al* (1996) *Genomics* 38(3):299-304; Miura *et al* (1998) *Blood* 92:2815-2822; WO2003/083047; WO97/44452 (Reivindicación 8, páginas 57-61); WO2000/12130 (páginas 24-26).

10 **(34)** *FcRH1 (Proteína 1 similar al receptor de Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina que contiene dominios similares a Ig tipo C2 e ITAM, puede tener una función en la diferenciación de células B); 429 aa, pl: 5.28, MW: 46925 TM: 1 Cromosoma del Gen [P]: 1q21-1q22)*

Nucleótido

15 Acceso de Genbank No. NM_052938
Versión de Genbank No. NM_052938.4 GI:226958543
Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:43 PM

20 Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_443170
Versión de Genbank No. NP_443170.1 GI:16418419
Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:43 PM

25 Referencias cruzadas

30 WO2003/077836; WO2001/38490 (Reivindicación 6, Fig. 18E-1-18-E-2); Davis *et al* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98(17):9772-9777; WO2003/089624 (Reivindicación 8); EP1347046 (Reivindicación 1); WO2003/089624 (Reivindicación 7).

35 **(35)** *IRTA2 (2 asociado a la translocalización de receptores de la superfamilia de inmunoglobulina, un inmunorreceptor putativo con posibles funciones en el desarrollo y linfomagénesis de células B; la desregulación del gen por translocalización se produce en algunos tumores malignos de células B); 977 aa, pl: 6.88, MW: 106468, TM: 1 Cromosoma del Gen [P]: 1q21)*

Nucleótido

40 Acceso de Genbank No. AF343662
Versión de Genbank No. AF343662.1 GI:13591709
Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:16 AM

Polipéptido

45 Acceso de Genbank No. AAK31325
Versión de Genbank No. AAK31325.1 GI:13591710
Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:16 AM

Referencias cruzadas

50 AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Ratón:AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1; WO2003/024392 (Reivindicación 2, Fig. 97); Nakayama *et al* (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277(1):124-127; WO2003/077836; WO2001/38490 (reivindicación 3, Fig. 18B-1-18B-2).

55 **(36)** *TENB2 (TMEFF2, tomorregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano de membrana putativo, relacionado con la familia de EGF/herregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa)*

Nucleótido

60 Acceso de Genbank No. AF179274
Versión de Genbank No. AF179274.2 GI:12280939
Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:05 AM

65

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAD55776

Versión de Genbank No. AAD55776.2 GI:12280940

Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:05 AM

5 Referencias cruzadas

Acceso NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; AY358907, CAF85723, CQ782436; WO2004/074320; JP2004113151; WO2003/042661; WO2003/009814; EP1295944 (páginas 69-70); WO2002/30268 (página 329); WO2001/90304; US2004/249130; 10 US2004/022727; WO2004/063355; US2004/197325; US2003/232350; US2004/005563; US2003/124579; *Horie et al* (2000) *Genomics* 67:146-152; *Uchida et al* (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:593-602; *Liang et al* (2000) *Cancer Res.* 60:4907-12; *Glynn-Jones et al* (2001) *Int J Cancer.* Oct 15; 94(2):178-84.

(37) PSMA - FOLH1 (Folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de la próstata) 1)

15

Nucleótido

Acceso de Genbank No. M99487

Versión de Genbank No. M99487.1 GI:190663

20 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAA60209

25 Versión de Genbank No. AAA60209.1 GI:190664

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Referencias cruzadas

30 Israeli R.S. *et al* *Cancer Res.* 53 (2), 227-230 (1993)

Otra información

Símbolo Oficial: FOLH1

35 Otros Pseudónimos: GIG27, FGCP, FOLH, GCP2, GCP11, NAALAD1, NAALAdasa, PSM, PSMA, mGCP

Otras Designaciones: ácido dipeptidasa 1 enlazada a alfa N-acetilado; ácido dipeptidasa I enlazada a alfa N-acetilado; NAALAdasa I; proteína del gen 27 inhibidor del crecimiento celular; folilipoli-gamma-glutamato carboxipeptidasa; glutamato carboxilasa II; glutamato carboxipeptidasa 2; glutamato carboxipeptidasa II; glutamato carboxipeptidasa de membrana; variante F del antígeno de membrana específico de la próstata; pteroilpoli-gamma-glutamato carboxipeptidasa

40

ANTICUERPOS

US 7.666.425:

45 Anticuerpos producidos por Hibridomas que tienen las siguientes referencias de ATCC: No. de acceso de ATCC HB-12101, No. de acceso de ATCC HB-12109, No. de acceso de ATCC HB-12127 y No. de acceso de ATCC HB-12126.

Proscan: un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 8H12, 3E11, 17G1, 29B4, 30C1 y 20F2 (US 7,811,564; Moffett S., *et al* *Hybridoma* (Larchmt). Dic 2007; 26(6):363-72).

50

Cytogen: anticuerpos monoclonales 7E11-C5 (No. de acceso de ATCC HB 10494) y 9H10-A4 (No. de acceso de ATCC HB11430) - US 5.763.202

GlycoMimetics: NUH2 – No. de acceso de ATCC HB 9762 (US 7.135.301)

55

Human Genome Science: HPRAJ70 – No. de acceso de ATCC 97131 (US 6.824.993); secuencia de aminoácidos codificada por el clon de ADNc (HPRAJ70) depositado como el Depósito No. 97131 de la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC").

60 Medarex: Anticuerpos anti-PSMA que carecen de residuos de fucosilo - US 7.875.278

Los anticuerpos anti-PSMA de ratón incluyen los anticuerpos 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, y monoclonales. Los hibridomas que secretan 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6 o 4C8B9 se han depositado públicamente y se describen en la Patente norteamericana No. 6.159.508. Los hibridomas relevantes se han depositado públicamente y se describen en la Patente norteamericana No. 6.107.090. Además, los anticuerpos anti-

65

PSMA humanizados, que incluyen una versión humanizada de J591, se describen con más detalle en la Publicación PCT WO 02/098897.

5 Otros anticuerpos anti-PSMA humanos de ratón se han descrito en la técnica, tales como mAb 107-1A4 (Wang, S. et al (2001) Int. J. Cancer 92:871-876) y mAb 2C9 (Kato, K. et al (2003) Int. J. Urol. 10:439-444).

10 Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-PSMA humanos incluyen los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3, aislados y caracterizados estructuralmente como se ha descrito originalmente en las Publicaciones PCT WO 01/09192 y WO 03/064606 y en la Solicitud Provisional norteamericana No. de Serie 60/654.125, titulada "Human Monoclonal Antibodies to Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)", presentada el 18 de febrero de 2005. Las secuencias de aminoácidos de V_H de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en las SEC ID NOs: 1-9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_L de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en las SEC ID NOs: 10-18, respectivamente.

15 Otros anticuerpos anti-PSMA humanos incluyen los anticuerpos divulgados en la Publicación PCT WO 03/034903 y la Solicitud norteamericana No. 2004/0033229.

20 NW Biotherapeutics: Una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo que consiste en 3F5.4G6 que tiene número de acceso de ATCC HB12060, 3D7-1.I. que tiene número de acceso de ATCC HB12309, 4E10-1.14 que tiene número de acceso de ATCC HB12310, 3E11 (ATCC HB12488), 4D8 (ATCC HB12487), 3E6 (ATCC HB12486), 3C9 (ATCC HB12484), 2C7 (ATCC HB12490), 1G3 (ATCC HB12489), 3C4 (ATCC HB12494), 3C6 (ATCC HB12491), 4D4 (ATCC HB12493), 1G9 (ATCC HB12495), 5C8B9 (ATCC HB12492) y 3G6 (ATCC HB12485) – véase US 6.150.508

25 PSMA Development Company/Progenics/Cytogen - Seattle Genetics: mAb 3,9, producido por el hibridoma depositado bajo el No. de acceso de ATCC PTA-3258 o mAb 10,3, producido por el hibridoma depositado bajo el No. de acceso de ATCC PTA-3347 - US 7.850.971

PSMA Development Company - Composiciones de anticuerpos de PSMA (US 20080286284, Tabla 1)

30 Esta solicitud es una divisional de la solicitud de patente norteamericana No. de serie 10/395.894, presentada el 21 de marzo de 2003 (US 7.850.971)

35 Hospital Universitario de Friburgo, Alemania - mAbs 3/A12, 3/E7, y 3/F11 (Wolf P., et al *Prostate*. 2010 Apr 1;70(5):562-9).

(38) SST (Receptor de Somatostatina; obsérvese que hay 5 subtipos)

(38.1) SSTR2 (Receptor 2 de somatostatina)

40 Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_001050

Versión de Genbank No. NMR_001050.2 GI:44890054

Fecha de actualización del registro de GenBank: 19 de agosto de 2012 01:37 PM

45

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_001041

Versión de Genbank No. NP_001041.1 GI:4557859

Fecha de actualización del registro de GenBank: 19 de agosto de 2012 01:37 PM

50

Referencias cruzadas

55 Yamada Y., et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (1), 251-255 (1992); Susini C., et al Ann Oncol. 2006 Dec;17(12):1733-42

Otra información

Símbolo Oficial: SSTR2

60 Otras Designaciones: SRIF-1; SS2R; receptor de somatostatina tipo 2

(38.2) SSTR5 (Receptor 5 de somatostatina)

Nucleótido

65

Acceso de Genbank No. D16827

Versión de Genbank No. D16827.1 GI:487683
Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de agosto de 2006 12:45 PM

Polipéptido

5 Acceso de Genbank No. BAA04107
Versión de Genbank No. BAA04107.1 GI:487684
Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de agosto de 2006 12:45 PM

10 Referencias cruzadas

Yamada, Y., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195 (2), 844-852 (1993)

Otra información

15 Símbolo Oficial: SSTR5
Otros Pseudónimos: SS-5-R
Otras Designaciones: Receptor de somatostatina subtipo 5; receptor de somatostatina tipo 5

20 (38.3) SSTR1
(38.4) SSTR3
(38.5) SSTR4

AvB6 - Ambas subunidades (39+40)

25 **(39) ITGAV** (*Integrina, alfa V*;

Nucleótido

30 Acceso de Genbank No. M14648 J02826 M18365
Versión de Genbank No. M14648.1 GI:340306
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:56 AM

Polipéptido

35 Acceso de Genbank No. AAA36808
Versión de Genbank No. AAA36808.1 GI:340307
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:56 AM

40 Referencias cruzadas

Suzuki S., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (22), 8614-8618 (1986)

Otra información

45 Símbolo Oficial: ITGAV
Otros Pseudónimos: CD51, MSK8, VNRA, VTNR
Otras Designaciones: antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal L230; integrina alfa-V; integrina alfaVbeta3; integrina, alfa V (receptor de vitronectina, polipéptido alfa, antígeno CD51); subunidad alfa del receptor de vitronectina

50 **(40) ITGB6** (*Integrina, beta 6*)

Nucleótido

55 Acceso de Genbank No. NM_000888
Versión de Genbank No. NM_000888.3 GI:9966771
Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:46 AM

Polipéptido

60 Acceso de Genbank No. NP_000879
Versión de Genbank No. NP_000879.2 GI:9625002
Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:46 AM

65

Referencias cruzadas

Sheppard D.J., et al *Biol. Chem.* 265 (20), 11502-11507 (1990)

Otra información

5 Símbolo Oficial: ITGB6
Otras Designaciones: integrina beta-6

ANTICUERPOS

10 Biogen: US 7,943,742 - Los clones de hibridoma 6.3G9 y 6.8G6 se depositaron en la ATCC, números de acceso de ATCC PTA-3649 y -3645, respectivamente.

15 Biogen: US7,465,449 - En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las mismas secuencias de polipéptidos de cadenas pesadas y ligeras que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.1A8, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2B10, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5, o 7.1C5.

Centocor (J&J): US7.550.142; US7.163.681

20 Por ejemplo, en US 7,550,142 - un anticuerpo que tiene regiones variables de cadena pesada humanas y de cadena ligera humanas que comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEC ID NO: 7 y la SEC ID NO: 8.

Seattle Genetics: 15H3 (Ryan MC., et al *Cancer Res* April 15, 2012; 72 (Suplemento 8): 4630)

(41) CEACAM5 (Molécula 5 de adhesión a células relacionada con el antígeno carcinoembrionario)

25 Nucleótido

Acceso de Genbank No. M17303

Versión de Genbank No. M17303.1 GI:178676

30 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAB59513

Versión de Genbank No. AAB59513.1 GI:178677

35 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Referencias cruzadas

40 Beauchemin N., et al *Mol. Cell. Biol.* 7 (9), 3221-3230 (1987)

Otra información

Símbolo Oficial: CEACAM5

Otros Pseudónimos: CD66e, CEA

45 Otras Designaciones: antígeno 100 de meconio

ANTICUERPOS

50 AstraZeneca-MedImmune: US 20100330103; US20080057063;

US20020142359

55 - por ejemplo, un anticuerpo que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) con las siguientes secuencias: cadena pesada; CDR1 - DNYMH, CDR2 - WIDPENGDT E YAPKFRG, CDR3 - LIYAGYLAMD Y; y cadena ligera CDR1 - SASSSVTYMH, CDR2 - STSNLAS, CDR3 - QQRSTYPLT.

- Hibridoma 806.077 depositado como el depósito no. 96022936 de la Colección Europea de Cultivos celulares (ECACC).

60 Research Corporation Technologies, Inc.: US5.047.507

Bayer Corporation: US6.013.772

BioAlliance: US7.982.017; US7.674.605

65 • US 7.674.605

- un anticuerpo que comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, y la secuencia de la región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.

5 - un anticuerpo que comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 5, y la secuencia de la región variable de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 6.

10 Celltech Therapeutics Limited: US5.877.293

The Dow Chemical Company: US5.472.693; US6.417.337; US6.333.405

15 US5.472.693 - por ejemplo, ATCC No. CRL-11215

US6.417.337 - por ejemplo, ATCC CRL-12208

US6.333.405 - por ejemplo, ATCC CRL-12208

20 Immunomedics, Inc: US7.534.431; US7.230.084; US7.300.644; US6.730.300;

US20110189085

25 - un anticuerpo que tiene las CDRs de la región variable de cadena ligera comprende: CDR1 comprende KASQDVGTSVA (SEC ID NO: 20); CDR2 comprende WTSTRHT (SEC ID NO: 21); y CDR3 comprende QQYSLYRS (SEC ID NO: 22); y las CDRs de la región variable de cadena pesada de dicho anticuerpo anti-CEA comprenden: CDR1 comprende TYWMS (SEC ID NO: 23); CDR2 comprende EIHPDSSTINYAPSLKD (SEC ID NO: 24); y CDR3 comprende LYFGFPWFAY (SEC ID NO: 25).

30 US20100221175; US20090092598; US20070202044; US20110064653;
US20090185974; US20080069775.

(42) MET (proto-oncogén met; receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)

35 Nucleótido

Acceso de Genbank No. M35073

Versión de Genbank No. M35073.1 GI:187553

Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 11:12 AM

40

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAA59589

Versión de Genbank No. AAA59589.1 GI:553531

45 Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 11:12 AM

Referencias cruzadas

Dean M., et al *Nature* 318 (6044), 385-388 (1985)

50

Otra información

Símbolo Oficial: MET

Otros Pseudónimos: AUTS9, HGFR, RCCP2, c-Met

55 Otras Designaciones: receptor de HGF; receptor de HGF/SF; receptor de SF; receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; tirosina cinasa del proto-oncogén met; proto-oncogén c-Met; factor de dispersión del receptor; proteína tirosina-cinasa Met

ANTICUERPOS

60

Abgenix/Pfizer: US20100040629

por ejemplo, el anticuerpo producido por el hibridoma 13.3.2 que tiene el número de acceso de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) PTA-5026; el anticuerpo producido por el hibridoma 9.1.2 que tiene el número de acceso de ATCC PTA-5027; el anticuerpo producido por el hibridoma 8.70.2 que tiene número de acceso de ATCC PTA-5028; o el anticuerpo producido por el hibridoma 6.90.3 que tiene el número de acceso de ATCC PTA-5029.

65

Amgen/Pfizer: US20050054019

por ejemplo, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NO: 2 en donde X2 es glutamato y X4 es serina y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 4 en donde X8 es alanina, sin las secuencias señal; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NO: 6 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 8, sin las secuencias señal; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NO: y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 12, sin las secuencias señal; o un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID NO: 14 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO: 16, sin las secuencias señal.

Agouron Pharmaceuticals (Ahora Pfizer): US20060035907

Eli Lilly: US20100129369

Genentech: US5,686,292; US20100028337; US20100016241; US20070129301; US20070098707; US20070092520, US20060270594; US20060134104; US20060035278; US20050233960; US20050037431

US 5.686.292 - por ejemplo, ATCC HB-11894 y ATCC HB-11895
US 20100016241 - por ejemplo, ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6)

Centro Médico de la Defensa Nacional, Taiwán: Lu RM., et al *Biomaterials*. 2011 Apr;32(12):3265-74.

Novartis: US20090175860

- por ejemplo, un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada 4687, en donde las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena pesada 4687 son los residuos 26-35, 50-65, y 98-102, respectivamente, de SEC ID NO: 58; y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera 5097, en donde las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de la cadena ligera 5097 son los residuos 24-39, 55-61, y 94-100 de SEC ID NO: 37.

Pharmacia Corporation: US20040166544

Pierre Fabre: US20110239316, US20110097262, US20100115639

Samsung: US 20110129481 - por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido a partir de una célula de hibridoma que tiene el número de acceso KCLRF-BP-00219 o el número de acceso de KCLRF-BP-00223.

Samsung: US 20110104176 - por ejemplo, un anticuerpo producido por una célula de hibridoma que tiene el número de acceso: KCLRF-BP-00220.

Escuela médica de la Universidad de Turín: DN-30 Pacchiana G., et al *J Biol Chem*. 2010 Nov 12;285(46):36149-57

Van Andel Research Institute: Jiao Y., et al *Mol Biotechnol*. 2005 Sep;31(1):41-54.

(43) MUC1 (Mucina 1, asociada a la superficie celular)

Nucleótido

Acceso de Genbank No. J05581
Versión de Genbank No. J05581.1 GI:188869
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAA59876
Versión de Genbank No. AAA59876.1 GI: 188870
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Referencias cruzadas

Gendler S.J., et al *J. Biol. Chem*. 265 (25), 15286-15293 (1990)

Otra información

Símbolo Oficial: MUC1

Otros Pseudónimos: RP11-263K19.2, CD227, EMA, H23AG, KL-6, MAM6, MUC-1, MUC-1/SEC, MUC-1/X, MUC1/ZD, PEM, PENT, PUM

Otras Designaciones: antígeno DF3; antígeno H23; antígeno DF3 asociado a carcinoma de mama; mucina asociada a carcinoma; episialina; krebbs von den Lungen-6; mucina 1, transmembrana; mucina-1; mucina urinaria reactiva con cacahuete; mucina epitelial polimórfica; mucina epitelial asociada a tumor; antígeno de la membrana epitelial asociado a tumor; mucina asociada a tumor

ANTICUERPOS

AltaRex- Quest Pharma Tech: US 6.716.966 - por ejemplo, un anticuerpo para Alt-1 producido por el hibridoma ATCC No. PTA-975.

AltaRex- Quest Pharma Tech: US7.147.850

CRT: 5E5 - Sørensen AL., et al *Glycobiology* vol. 16 no. 2 p.p. 96-107, 2006; HMFG2 - Burchell J., et al *Cancer Res.*, 47, 5476-5482 (1987); ver WO2015/159076

Glycotope GT-MAB: GT-MAB 2.5-GEX (Sitio web: <http://www.glycotope.com/pipeline/pankomab-gex>)

Immunogen: US7.202.346

- por ejemplo, anticuerpo MJ-170: línea celular de hibridoma MJ-170 no. de acceso de ATCC PTA-5286; anticuerpo monoclonal MJ-171: línea celular de hibridoma MJ-171 no. de acceso de ATCC PTA-5287; anticuerpo monoclonal MJ-172: línea celular de hibridoma MJ-172 no. de acceso de ATCC PTA-5288; o anticuerpo monoclonal MJ-173: línea celular de hibridoma MJ-173 no. de acceso de ATCC PTA-5302

Immunomedics: US 6,653,104

Ramot Tel Aviv Uni: US7.897.351

Regents Uni. CA: US 7,183,388; US20040005647; US20030077676.

Roche GlycArt: US8.021.856

Centro Nacional Ruso de Investigaciones Oncológicas: Imuteran-Ivanov PK., et al *Biotechnol J.* 2007 Jul;2(7):863-70

Universidad Técnica de Braunschweig: (IIB6, HT186-B7, HT186-D11, HT186-G2, HT200-3A-C1, HT220-M-D1, HT220-M-G8) - Thie H., et al *PLoS One.* 2011 Jan 14; 6(1):e15921

(44) CA9 (Anhidrasa carbónica IX)Nucleótido

Acceso de Genbank No. X66839

Versión de Genbank No. X66839.1 GI:1000701

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:15 AM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. CAA47315

Versión de Genbank No. CAA47315.1 GI:1000702

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:15 AM

Referencias cruzadas

Pastorek J., et al *Oncogene* 9 (10), 2877-2888 (1994)

Otra información

Símbolo Oficial: CA9

Otros Pseudónimos: CAIX, MN

Otras Designaciones: CA-IX; P54/58N; antígeno G250 asociado a RCC; proteína G250 asociada a RCC; carbonato

deshidratasa IX; anhidrasa carbónica 9; deshidratasa carbónica; antígeno MN de membrana; pMW1; antígeno G250 asociado a carcinoma de células renales

ANTICUERPOS

- 5 Abgenix/Amgen: US20040018198
- Affibody: Moléculas de Affibody anti-CAIX
- 10 (<http://www.affibody.com/en/Product-Portfolio/Pipeline/>)
- Bayer: US7.462.696
- 15 Bayer/Morfosys: mAb 3ee9 - Petrus HM., et al *Mol Cancer Ther.* 2012 Feb; 11(2):340-9
- Escuela Médica de Harvard: Anticuerpos G10, G36, G37, G39, G45, G57, G106, G119, G6, G27, G40 y G125. Xu C., et al *PLoS One.* 2010 Mar 10;5(3):e9625
- 20 Instituto de Virología, Academia Eslovaca de Ciencias (Bayer) - US5.955.075
- por ejemplo, M75 – No. de acceso de ATCC HB 11128 o MN12 – No. de acceso de ATCC HB 11647
- Instituto de Virología, Academia Eslovaca de Ciencias: US7.816.493
- 25 - por ejemplo, el anticuerpo monoclonal M75 que es secretado del hibridoma VU-M75, que se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo bajo No. de ATCC HB 11128; o el anticuerpo monoclonal V/10 secretado del hibridoma V/10-VU, que se depositó en la Autoridad Depositaria Internacional de la Colección Coordinada Belga de Microorganismos (BCCM) en el Laboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP) en la Universeit Gent en Gante, Bélgica, bajo el No. de acceso LMBP 6009CB.
- 30 Instituto de Virología, Academia Eslovaca de Ciencias - US20080177046; US20080176310; US20080176258; US20050031623
- Novartis: US20090252738
- 35 Wilex: US7.691.375 - por ejemplo, el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma DSM ASC 2526.
- Wilex: US20110123537; Rencarex: Kennett RH., et al *Curr Opin Mol Ther.* 2003 Feb;5(1):70-5
- 40 Xencor: US20090162382

(45) EGFRVIII (Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante de transcrito 3,

Nucleótido

- 45 Acceso de Genbank No. NM_201283
 Versión de Genbank No. NM_201283.1 GI:41327733
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

Polipéptido

- 50 Acceso de Genbank No. NP_958440
 Versión de Genbank No. NP_958440.1 GI:41327734
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

Referencias cruzadas

Batra SK., et al *Cell Growth Differ* 1995;6:1251-1259.

60 **ANTICUERPOS:**

- US7.628.986 y US7.736.644 (Amgen)
 Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 142 y variantes y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 144 y variantes.
- 65

US20100111979 (Amgen)

Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende:

- 5 CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos para la región CDR1 de anticuerpos 13.1.2 (SEC ID NO: 138), 131 (SEC ID NO: 2), 170 (SEC ID NO: 4), 150 (SEC ID NO: 5), 095 (SEC ID NO: 7), 250 (SEC ID NO: 9), 139 (SEC ID NO: 10), 211 (SEC ID NO: 12), 124 (SEC ID NO: 13), 318 (SEC ID NO: 15), 342 (SEC ID NO: 16), y 333 (SEC ID NO: 17);
- 10 CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos para la región CDR2 de anticuerpos 13.1.2 (SEC ID NO: 138), 131 (SEC ID NO: 2), 170 (SEC ID NO: 4), 150 (SEC ID NO: 5), 095 (SEC ID NO: 7), 250 (SEC ID NO: 9), 139 (SEC ID NO: 10), 211 (SEC ID NO: 12), 124 (SEC ID NO: 13), 318 (SEC ID NO: 15), 342 (SEC ID NO: 16), y 333 (SEC ID NO: 17); y
- 15 CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos para la región CDR3 de anticuerpos 13.1.2 (SEC ID NO: 138), 131 (SEC ID NO: 2), 170 (SEC ID NO: 4), 150 (SEC ID NO: 5), 095 (SEC ID NO: 7), 250 (SEC ID NO: 9), 139 (SEC ID NO: 10), 211 (SEC ID NO: 12), 124 (SEC ID NO: 13), 318 (SEC ID NO: 15), 342 (SEC ID NO: 16) y 333 (SEC ID NO: 17).

US20090240038 (Amgen)

- 20 Por ejemplo, un anticuerpo que tiene por lo menos uno de los polipéptidos de cadena pesada o ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 142, SEC ID NO: 144, y cualquier combinación de las mismas.

US20090175887 (Amgen)

- 25 Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo 13.1.2 (SEC ID NO: 138), 131 (SEC ID NO: 2), 170 (SEC ID NO: 4), 150 (SEC ID NO: 5), 095 (SEC ID NO: 7), 250 (SEC ID NO: 9), 139 (SEC ID NO: 10), 211 (SEC ID NO: 12), 124 (SEC ID NO: 13), 318 (SEC ID NO: 15), 342 (SEC ID NO: 16), y 333 (SEC ID NO: 17).

30 US20090156790 (Amgen)

- Por ejemplo, un anticuerpo que tiene el polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera, en donde por lo menos uno de los polipéptidos de cadena pesada o ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 142, SEC ID NO: 144, y cualquier combinación de las mismas.

35 US20090155282, US20050059087 y US20050053608 (Amgen)

- Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de cadena pesada del anticuerpo seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de anticuerpo 13.1.2 (SEC ID NO: 138), 131 (SEC ID NO: 2), 170 (SEC ID NO: 4), 150 (SEC ID NO: 5), 095 (SEC ID NO: 7), 250 (SEC ID NO: 9), 139 (SEC ID NO: 10), 211 (SEC ID NO: 12), 124 (SEC ID NO: 13), 318 (SEC ID NO: 15), 342 (SEC ID NO: 16) y 333 (SEC ID NO: 17).

40 MR1-1 (US7.129.332; Duke)

- Por ejemplo, un anticuerpo de variante que tiene la secuencia de SEC ID NO. 18 con las sustituciones S98P-T99Y en CDR3 VH y F92W en CDR3 VL.

45 L8A4, H10, Y10 (Wikstrand CJ., et al *Cancer Res.* 1995 Jul 15;55(14):3140-8; Duke)

US20090311803 (Universidad de Harvard)

- 50 Por ejemplo, SEC ID NO: 9 para la región variable de cadena pesada del anticuerpo, y SEC ID NO: 3 para las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera

US20070274991 (EMD72000, también conocido como matuzumab; Universidad de Harvard)

Por ejemplo, SEC ID NOs: 3 y 9 para la cadena ligera y cadena pesada, respectivamente

55 US6.129.915 (Schering)

Por ejemplo, SEC ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

mAb CH12 - Wang H., et al *FASEB J.* 2012 Jan;26(1):73-80 (Instituto del Cáncer de Shanghai).

60 RABDMVIII - Gupta P., et al *BMC Biotechnol.* 2010 Oct 7; 10:72 (Centro Médico de la Universidad de Stanford).

mAb Ua30 - Ohman L., et al *Tumour Biol.* 2002 Mar-Apr;23(2):61-9 (Universidad de Uppsala).

Han DG., et al *Nan Fang Yi Ke Da Xue Bao.* 2010 Jan;30(1):25-9 (Universidad de Xi'an Jiaotong).

65

(46) CD33 (Molécula CD33)

Nucleótido

- Acceso de Genbank No. M_23197
 5 Versión de Genbank No. NM_23197.1 GI: 180097
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Polipéptido

- 10 Acceso de Genbank No. AAA51948
 Versión de Genbank No. AAA51948.1 GI: 188098
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Referencias cruzadas

- 15 Simmons D., et al *J. Immunol.* 141 (8), 2797-2800 (1988)

Otra información

- 20 Símbolo Oficial: CD33
 Otros Pseudónimos: SIGLEC-3, SIGLEC3, p67
 Otras Designaciones: antígeno CD33 (gp67); gp67; antígeno de superficie CD33 de células mieloides; lectina 3 similar a Ig de unión al ácido siálico; lectina similar a Ig de unión al ácido siálico

25 **ANTICUERPOS**

- H195 (Lintuzumab) - Raza A., et al *Leuk Lymphoma.* 2009 Aug;50(8):1336-44; US6,759,045 (Seattle Genetics/Immunomedics)
- 30 mAb OKT9: Sutherland, D.R. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(7): 4515-4519 1981, Schneider.C., et al *J Biol Chem* 257, 8516-8522 (1982)
- mAb E6: Hoogenboom, H.R., et al *J Immunol* 144, 3211-3217 (1990)
- 35 US6.590.088 (Human Genome Sciences)
 Por ejemplo, SEC ID NOs: 1 y 2 y no. de acceso de ATCC 97521
- US7.557.189 (Immunogen)
 Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende tres CDRs que tienen las secuencias de aminoácidos de SEC ID NOs: 1-3 y una región variable de cadena ligera que comprende tres CDRs que tienen las secuencias de aminoácidos de SEC ID NOs: 4-6.
- 40

(47) CD19 (Molécula CD19)

45 Nucleótido

- Acceso de Genbank No. NM_001178098
 Versión de Genbank No. NM_001178098.1 GI:296010920
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de septiembre de 2012 12:43 AM

50

Polipéptido

- Acceso de Genbank No. NP_001171569
 Versión de Genbank No. NP_001171569.1 GI:296010921
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de septiembre de 2012 12:43 AM

55

Referencias cruzadas

- 60 Tedder TF., et al *J. Immunol.* 143 (2): 712-7 (1989)

Otra información

- Símbolo Oficial: CD19
 Otros Pseudónimos: B4, CVID3
 65 Otras Designaciones: antígeno CD19 de linfocitos B; antígeno de superficie B4 de linfocitos B; antígeno de superficie Leu-12 de células T; antígeno CD19 de diferenciación

ANTICUERPOS

- 5 Immunogen: HuB4 - Al-Katib AM., et al *Clin Cancer Res.* 2009 Jun 15;15(12):4038-45.
- 4G7: Kügler M., et al *Protein Eng Des Sel.* 2009 Mar;22(3):135-47
Por ejemplo, las secuencias en la Fig. 3 de Knappik, A. et al *J Mol Biol* 2000 Feb;296(1):57-86
- 10 AstraZeneca/MedImmune: MEDI-551 - Herbst R., et al *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Oct;335(1):213-22
- Glenmark Pharmaceuticals: GBR-401 - Hou S., et al *Mol Cancer Ther* November 2011 (Congreso Resumen Suplemento) C164
- 15 US7.109.304 (Immunomedics)
Por ejemplo, un anticuerpo que comprende la secuencia de hA19Vk (SEC ID NO: 7) y la secuencia de hA19VH (SEC ID NO: 10)
- US7.902.338 (Immunomedics)
Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de CDR de la región determinante de la complementariedad de cadena ligera CDR1 de SEC ID NO: 16 (KASQSVVDYDGD SYLN); CDR2 de SEC ID NO: 17 (DASNLV S); y CDR3 de SEC ID NO: 18 (QQSTEDPWT) y las secuencias de CDR de cadena pesada CDR1 de SEC ID NO: 19 (SYWMN); CDR2 de SEC ID NO: 20 (QIWPGDGD TNYNGKFKG) y CDR3 de SEC ID NO: 21 (RETTTVGRYYAMDY) y también comprende secuencias de la región estructural (FR) y región constante de anticuerpo humano con uno o más residuos de aminoácidos de la región estructural sustituidos desde las secuencias de la región estructural correspondientes del anticuerpo murino parental, y en donde dichos residuos de FR sustituidos comprenden la sustitución de serina por fenilalanina en el residuo de Kabat 91 de la región variable de cadena pesada.
- 20 Medarex: MDX-1342 - Cardarelli PM., et al *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Feb;59(2):257-65.
- 30 MorphoSys/Xencor: MOR-208/XmAb-5574 - Zalevsky J., et al *Blood.* 2009 Apr 16;113(16):3735-43
- US7.968.687 (Seattle Genetics)
Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 9 y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 24.
- 35 4G7 chim - Lang P., et al *Blood.* 2004 May 15;103(10):3982-5 (Universidad de Tübingen)
Por ejemplo, la Fig. 6 y la SEC ID NO: 80 de US20120082664
- 40 Escuela de Medicina de la Universidad de Zhejiang: 2E8 - Zhang J., et al *J Drug Target.* 2010 Nov;18(9):675-8
- (48) IL2RA (Receptor de interleucina 2, alfa); Secuencia de Referencia de NCBI: NM_000417.2);**
- 45 Nucleótido
- Acceso de Genbank No. NM_000417
Versión de Genbank No. NM_000417.2 GI:269973860
Fecha de actualización del registro de GenBank: 9 de septiembre de 2012 04:59 PM
- 50 Polipéptido
- Acceso de Genbank No. NP_000408
Versión de Genbank No. NP_000408.1 GI:4557667
Fecha de actualización del registro de GenBank: 9 de septiembre de 2012 04:59 PM
- 55 Referencias cruzadas
- Kuziel W.A., et al *J. Invest. Dermatol.* 94 (SUPL 6), 27S-32S (1990)
- 60 Otra información
- Símbolo Oficial: IL2RA
Otros Pseudónimos: RP11-536K7.1, CD25, IDDM10, IL2R, TCGFR
- 65 Otras Designaciones: subunidad alfa del receptor de FIL-2; IL-2-RA; subunidad alfa de IL-2R; IL2-RA; antígeno TAC; subunidad alfa del receptor de interleucina-2; p55

ANTICUERPOS

5 US6.383.487 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect])

US6.521.230 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect])

Por ejemplo, un anticuerpo que tiene un sitio de unión a antígeno comprende por lo menos un dominio que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos en SEC ID NO: 7, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos en SEC ID NO: 8, y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos en SEC ID NO: 9; o dichas CDR1, CDR2 y CDR3 tomadas en secuencia como un todo comprenden una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a SEC ID NOs: 7, 8 y 9 tomadas en secuencia como un todo.

Daclizumab - Rech AJ., et al *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep;1174:99-106 (Roche)

15 **(49) AXL** (*tirosina cinasa del receptor de AXL*)

Nucleótido

Acceso de Genbank No. M76125

20 Versión de Genbank No. M76125.1 GI:292869

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:53 AM

Polipéptido

25 Acceso de Genbank No. AAA61243

Versión de Genbank No. AAA61243.1 GI:29870

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:53 AM

Referencias cruzadas

30 O'Bryan J.P., et al *Mol. Cell. Biol.* 11 (10), 5016-5031 (1991); Bergsagel P.L., et al *J. Immunol.* 148 (2), 590-596 (1992)

Otra información

35 Símbolo Oficial: AXL

Otros Pseudónimos: JTK11, UFO

Otras Designaciones: oncogén AXL; secuencia/gen transformante de AXL; oncogén AXL; receptor UFO de proteína tirosina-cinasa

40 **ANTICUERPOS**

YW327.6S2 - Ye X., et al *Oncogene.* 2010 Sep 23;29(38):5254-64. (Genentech)

BergenBio:BGB324(<http://www.bergenbio.com/BGB324>)

45 **(50) CD30 - TNFRSF8** (*Superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 8*)

Nucleótido

50 Acceso de Genbank No. M83554

Versión de Genbank No. M83554.1 GI: 180095

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:53 AM

Polipéptido

55 Acceso de Genbank No. AAA51947

Versión de Genbank No. AAA51947.1 GI: 180096

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:53 AM

60 Referencias cruzadas

Durkop H., et al *Cell* 68 (3), 421-427 (1992)

Otra información

65 Símbolo Oficial: TNFRSF8

Otros Pseudónimos: CD30, D1S166E, Ki-1

Otras Designaciones: receptor de CD30L; antígeno Ki-1; receptor de CD30 de citocina; antígeno CD30 de activación de linfocitos; superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 8

- 5 **(51) BCMA (Antígeno de maduración de células B) - TNFRSF17 (Superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral, miembro 17)**

Nucleótido

- 10 Acceso de Genbank No. Z29574
 Versión de Genbank No. Z29574.1 GI: 471244
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:40 AM

Polipéptido

- 15 Acceso de Genbank No. CAA82690
 Versión de Genbank No. CAA82690.1 GI:471245
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:40 AM

20 Referencias cruzadas

Laabi Y. et al *Nucleic Acids Res.* 22 (7), 1147-1154 (1994)

Otra información

- 25 Símbolo Oficial: TNFRSF17
 Otros Pseudónimos: BCM, BCMA, CD269
 Otras Designaciones: antígeno de maduración de células B; factor de maduración de células B; proteína de maduración de células B; superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 17

- 30 **(52) Ags de CT - CTA (Antígenos testiculares de cáncer)**

Referencias cruzadas

- 35 Fratta E., et al *Mol Oncol.* 2011 Apr;5(2):164-82; Lim SH., et al *Am J Blood Res.* 2012;2(1):29-35.

(53) CD174 (Lewis Y) - FUT3 (fucosiltransferasa 3 (galactósido 3(4)-L-fucosiltransferasa, grupo sanguíneo de Lewis)

Nucleótido

- 40 Acceso de Genbank No. NM000149
 Versión de Genbank No. NM000149.3 GI:148277008
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 04:49 PM

45 Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_000140
 Versión de Genbank No. NP_000140.1 GI:4503809
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 04:49 PM

50 Referencias cruzadas

Kukowska-Latallo, J.F., et al *Genes Dev.* 4 (8), 1288-1303 (1990)

55 Otra información

Símbolo Oficial: FUT3
 Otros Pseudónimos: CD174, FT3B, FucT-III, LE, Les
 Otras Designaciones: FT de Lewis; alfa-(1,3/1,4)-fucosiltransferasa; grupo sanguíneo Lewis alfa-4- fucosiltransferasa; fucosiltransferasa III; galactósido 3(4)-L-fucosiltransferasa

- 60 **(54) CLEC14A (familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro A; Acceso de Genbank No. NM175060)**

Nucleótido

- 65 Acceso de Genbank No. NM175060

Versión de Genbank No. NM175060.2 GI:371123930
Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de abril de 2012 03:34 PM

Polipéptido

5 Acceso de Genbank No. NP_778230
Versión de Genbank No. NP_778230.1 GI:28269707
Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de abril de 2012 03:34 PM

10 Otra información

Símbolo Oficial: CLEC14A
Otros Pseudónimos: UNQ236/PR0269, C14orf27, CEG1, EGFR-5
Otras Designaciones: familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro A; proteína que contiene dominio similar a CIECT y EGF; receptor 5 del factor de crecimiento epidérmico

15 **(55) GRP78 - HSPA5 (proteína 5 de 70 kDa de choque térmico (proteína regulada por glucosa, 78 kDa)**

Nucleótido

20 Acceso de Genbank No. NM005347
Versión de Genbank No. NM005347.4 GI:305855105
Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:42 PM

25 Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_005338
Versión de Genbank No. NP_005338.1 GI:16507237
Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:42 PM

30

Referencias cruzadas

Ting J., et al *DNA* 7 (4), 275-286 (1988)

35 Otra información

Símbolo Oficial: HSPA5
Otros Pseudónimos: BIP, GRP78, MIF2
Otras Designaciones: proteína de 78 kDa regulada por glucosa; proteína de unión grp78 al Ca(2+) del lumen del retículo endoplásmico; proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina

40 **(56) CD70 (Molécula CD70) L08096**

Nucleótido

45 Acceso de Genbank No. L08096
Versión de Genbank No. L08096.1 GI:307127
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2012 08:54 AM

50 Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAA36175
Versión de Genbank No. AAA36175.1 GI:307128
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2012 08:54 AM

55

Referencias cruzadas

Goodwin R.G., et al *Cell* 73 (3), 447-456 (1993)

60 Otra información

Símbolo Oficial: CD70
Otros Pseudónimos: CD27L, CD27LG, TNFSF7
Otras designaciones: ligando CD27; CD27-L; antígeno CD70; antígeno Ki-24; antígeno de superficie CD70; superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 7; superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral, miembro 7

65

ANTICUERPOS

MDX-1411 contra CD70 (Medarex)

h1F6 (Oflazoglu, E., et al, Clin Cancer Res. 2008 Oct 1;14(19):6171-80; Seattle Genetics)

Por ejemplo, véase US20060083736 SEC ID NOs: 1, 2, 11 y 12 y la Fig. 1.

(57) Antígenos específicos de células madre. Por ejemplo:

- 5T4 (véase la entrada (63) más adelante)

- CD25 (véase la entrada (48) anteriormente)

- CD32

- Polipéptido

- Acceso de Genbank No. ABK42161

- Versión de Genbank No. ABK42161.1 GI:117616286

- Fecha de actualización del registro de GenBank: 25 de julio 5 de 2007 03:00 PM

- LGR5/GPR49

- Nucleótido

- Acceso de Genbank No. NM_003667

- Versión de Genbank No. NM_003667.2 GI:24475886

- Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 03:38 PM

- Polipéptido

- Acceso de Genbank No. NP_003658

- Versión de Genbank No. NP_003658.1 GI:4504379

- Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 03:38 PM

- Prominina/CD133

- Nucleótido

- Acceso de Genbank No. NM_006017

- Versión de Genbank No. NM_006017.2 GI:224994187

- Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

- Polipéptido

- Acceso de Genbank No. NP_006008

- Versión de Genbank No. NP_006008.1 GI:5174387

- Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

(58) ASG-5

Referencias cruzadas

(Smith L.M., et al AACR 2010 Annual Meeting (resumen #2590); Gudas J.M., et al AACR 2010 Annual Meeting

(resumen #4393)

ANTICUERPOS

5 Anticuerpo anti-AGS-5: M6.131 (Smith, L.M., et al *AACR 2010 Annual Meeting* (resumen #2590)

(59) ENPP3 (Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 3)

Nucleótido

10

Acceso de Genbank No. AF005632
 Versión de Genbank No. AF005632.2 GI:4432589
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 09:41 PM

15 Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAC51813
 Versión de Genbank No. AAC51813.1 GI:2465540
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 09:41 PM

20

Referencias cruzadas

Jin-Hua P., et al *Genomics* 45 (2), 412-415 (1997)

25 Otra información

Símbolo Oficial: ENPP3
 Otros Pseudónimos: RP5-988G15.3, B10, CD203c, NPP3, PD-IBETA, PDNP3
 Otras Designaciones: E-NPP 3; dJ1005H11.3 (fosfodiesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 3); dJ914N13.3 (fosfodiesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 3); miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; gp130RB13-6; fosfodiesterasa I beta; fosfodiesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 3; fosfodiesterasa-I beta

30

(60) PRR4 (4 rica en prolina (lacrimal))

35 Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_007244
 Versión de Genbank No. NM_007244.2 GI:154448885
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 28 de junio de 2012 12:39 PM

40

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_009175
 Versión de Genbank No. NP_009175.2 GI:154448886
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 28 de junio de 2012 12:39 PM

45

Referencias cruzadas

Dickinson D.P., et al *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36 (10), 2020-2031 (1995)

50

Otra información

Símbolo Oficial: PRR4
 Otros Pseudónimos: LPRP, PROL4
 Otras Designaciones: proteína rica en prolina lacrimal; proteína 4 rica en prolina asociada a carcinoma nasofaríngeo; polipéptido 4 rico en prolina; proteína 4 rica en prolina

55

(61) GCC - GUCY2C (guanilato ciclase 2C (receptor de enterotoxina estable al calor))

60 Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_004963
 Versión de Genbank No. NM_004963.3 GI:222080082
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:50 PM

65

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_004954
 Versión de Genbank No. NP_004954.2 GI:222080083
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:50 PM

5

Referencias cruzadas

De Sauvage F.J., et al *J. Biol. Chem.* 266 (27), 17912-17918 (1991); Singh S., et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 (3), 1455-1463 (1991)

10

Otra información

Símbolo Oficial: GUCY2C
 Otros Pseudónimos: DIAR6, GUC2C, MUCIL, STAR
 Otras Designaciones: GC-C; receptor de STA; guanilil ciclasa C; hSTAR; receptor de enterotoxina estable al calor; guanilato ciclasa intestinal

15

(62) Liv-1 - SLC39A6 (familia 39 de transportadores y solutos (transportador de zinc), miembro 6)

20

Nucleótido

Acceso de Genbank No. U41060
 Versión de Genbank No. U41060.2 GI:12711792
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de noviembre de 2009 04:35 PM

25

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAA96258
 Versión de Genbank No. AAA96258.2 GI:12711793
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de noviembre de 2009 04:35 PM

30

Referencias cruzadas

Taylor KM., et al *Biochim Biophys Acta.* 2003 Apr 1;1611(1-2):16-30

35

Otra información

Símbolo Oficial: SLC39A6
 Otros Pseudónimos: LIV-1
 Otras Designaciones: proteína LIV-1, regulada por estrógeno; ZIP-6; proteína LIV-1 regulada por estrógeno; familia 39 de transportadores y solutos (transportador de ion metálico), miembro 6; familia de transportadores y solutos 39 miembro 6; transportador de zinc ZIP6; proteína 6 similar a zrt- e lrt

40

(63) 5T4, Glicoproteína de trofoblastos, TPBG - TPBG (glicoproteína de trofoblastos)

45

Nucleótido

Acceso de Genbank No. AJ012159
 Versión de Genbank No. AJ012159.1 GI:3805946
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 10:27 AM

50

Polipéptido

Acceso de Genbank No. CAA09930
 Versión de Genbank No. CAA09930.1 GI:3805947
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 10:27 AM

55

Referencias cruzadas

King K.W., et al *Biochim. Biophys. Acta* 1445 (3), 257-270 (1999)

60

Otra información

- Símbolo Oficial: TPBG
- Otros Pseudónimos: 5T4, 5T4AG, M6P1
- Otras Designaciones: antígeno oncofetal 5T4; glicoproteína de trofoblastos oncofetales 5T4; glicoproteína de

65

oncotrofblastos 5T4
 • Ver WO2015/155345

(64) CD56 - NCMA1 (Molécula 1 de adhesión a células neurales)

5

Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_000615
 Versión de Genbank No. NM_000615.6 GI:336285433
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:32 PM

10

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_000606
 Versión de Genbank No. NP_000606.3 GI:94420689
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:32 PM

15

Referencias cruzadas

20 Dickson, G., et al, *Cell* 50 (7), 1119-1130 (1987)

Otra información

Símbolo Oficial: NCAM1
 Otros Pseudónimos: CD56, MSK39, NCAM
 Otras Designaciones: antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 5.1H11; molécula de adhesión a células neurales, NCAM

25

ANTICUERPOS

Immunogen: HuN901 (Smith SV., et al *Curr Opin Mol Ther.* 2005 Aug;7(4):394-401)
 Por ejemplo, véase humanizado de anticuerpo N901 murino. Véase la Fig. 1b y 1e de Roguska, M.A., et al *Proc Natl Acad Sci USA* Feb 1994;91:969-973.

30

(65) CanAg (Antígeno asociado a tumor CA242)

Referencias cruzadas

Haglund C., et al *Br J Cancer* 60:845-851, 1989; Baeckstrom D., et al *J Biol Chem* 266:21537-21547, 1991

40

ANTICUERPOS

huC242 (Tolcher AW et al., *J Clin Oncol.* 2003 Jan 15;21(2):211-22; Immunogen)
 Por ejemplo, véase US20080138898A1 SEC ID NO: 1 y 2

45

(66) FOLR1 (Receptor 1 de Folato)

Nucleótido

Acceso de Genbank No. J05013
 Versión de Genbank No. J05013.1 GI:182417
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

50

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAA35823
 Versión de Genbank No. AAA35823.1 GI:182418
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

55

Referencias cruzadas

Elwood P.C., et al *J. Biol. Chem.* 264 (25), 14893-14901 (1989)

60

Otra información

Símbolo Oficial: FOLR1

65

Otros Pseudónimos: FBP, FOLR

Otras Designaciones: FR-alfa; células KB FBP; proteína de unión a folato adulta; proteína de unión a folato; receptor alfa de folato; receptor de folato, adulto; antígeno MOV18 asociado a tumor de ovario

5 **ANTICUERPOS**

M9346A - Whiteman KR., et al *Cancer Res* April 15, 2012; 72 (Suplemento 8): 4628 (Immunogen)

(67) **GPNMB** (*Glicoproteína (transmembrana) nmb*)

10

Nucleótido

Acceso de Genbank No. X76534

Versión de Genbank No. X76534.1 GI:666042

15 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:10 AM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. CAA54044

20 Versión de Genbank No. CAA54044.1 GI:666043

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:10 AM

Referencias cruzadas

25 Weterman M.A., et al *Int. J. Cancer* 60 (1), 73-81 (1995)

Otra información

Símbolo Oficial: GPNMB

30 Otros Pseudónimos: UNQ1725/PRO9925, HGFIN, NMB

Otras Designaciones: glicoproteína NMB; proteína similar a glicoproteína nmb; osteoactivina; glicoproteína transmembrana HGFIN; glicoproteína transmembrana NMB

ANTICUERPOS

35

Celldex Therapeutics: CR011 (Tse KF., et al *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 15;12(4):1373-82)
Por ejemplo, véase EP1827492B1 SEC ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 y 35

(68) **TIM-1 - HAVCR1** (*Receptor 1 celular del virus de la hepatitis A*)

40

Nucleótido

Acceso de Genbank No. AF043724

Versión de Genbank No. AF043724.1 GI:2827453

45 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 06:24 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAC39862

50 Versión de Genbank No. AAC39862.1 GI:2827454

Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 06:24 PM

Referencias cruzadas

55 Feigelstock D., et al *J. Virol.* 72 (8), 6621-6628 (1998)

Otra información

Símbolo Oficial: HAVCR1

60 Otros Pseudónimos: HAVCR, HAVCR-1, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1

Otras Designaciones: proteína 1 del dominio de inmunoglobulina y dominio de mucina de células T; proteína 1 de la membrana de células T; molécula 1 de lesión renal

(69) **RG-1/Mindina** (*diana de tumor de la próstata - Mindina/RG-1*)

65

Referencias cruzadas

Parry R., et al *Cancer Res.* 2005 Sep 15;65(18):8397-405

(70) B7-H4 - VTCN1 (*Inhibidor 1 de la activación de células T que contienen el dominio del conjunto V*)

5

Nucleótido

Acceso de Genbank No. BX648021

Versión de Genbank No. BX648021.1 GI:34367180

10 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 08:40 AM

Referencias cruzadas

Sica GL., et al *Immunity.* 2003 Jun;18(6):849-61

15

Otra información

Símbolo Oficial: VTCN1

Otros Pseudónimos: RP11-229A19.4, B7-H4, B7H4, B7S1, B7X, B7h.5, PRO1291, VCTN1

20

Otras Designaciones: miembro de la familia B7, H4; miembro 1 de la superfamilia B7; molécula coestimulante B7x de células T; molécula coestimulante B7x de células-T; inhibidor 1 de la activación de células T que contienen el dominio del conjunto V; proteína B7-H4 inmunocoestimulante

(71) PTK7 (*Proteína tirosina cinasa 7 PTK7*)

25

Nucleótido

Acceso de Genbank No. AF447176

Versión de Genbank No. AF447176.1 GI:17432420

30 Fecha de actualización del registro de GenBank: 28 de noviembre de 2008 01:51 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAL39062

Versión de Genbank No. AAL39062.1 GI: 17432421

35 Fecha de actualización del registro de GenBank: 28 de noviembre de 2008 01:51 PM

Referencias cruzadas

Park S.K., et al *J. Biochem.* 119 (2), 235-239 (1996)

40

Otra información

Símbolo Oficial: PTK7

Otros Pseudónimos: CCK-4, CCK4

45

Otras Designaciones: cinasa 4 de carcinoma de colon; proteína tirosina-cinasa 7 inactiva; receptor 7 de pseudotirosina cinasa; 7 similar a la proteína tirosina-cinasa

(72) CD37 (*Molécula CD37*)

50

Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_001040031

Versión de Genbank No. NM_001040031.1 GI:91807109

55 Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de julio de 2012 02:08 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_001035120

Versión de Genbank No. NP_001035120.1 GI:91807110

60 Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de julio de 2012 02:08 PM

Referencias cruzadas

Schwartz-Albiez R., et al *J. Immunol.* 140 (3), 905-914 (1988)

65

Otra información

Símbolo Oficial: CD37

Otros Pseudónimos: GP52-40, TSPAN26

- 5 Otras Designaciones: antígeno CD37; antígeno 37 de diferenciación celular; antígeno CD37 de leucocitos; antígeno CD37 de superficie de leucocitos; tetraspanina-26; tspan-26

ANTICUERPOS

- 10 Boehringer Ingelheim: mAb 37.1 (Heider KH., et al *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4159-68)

Trubion: CD37-SMIP (G28-1 scFv-Ig) (Zhao X. et al *Blood*. 2007;110: 2569-2577)

Por ejemplo, véase US20110171208A1 SEC ID NO: 253

- 15 Immunogen: K7153A (Deckert J. et al *Cancer Res* April 15, 2012; 72 (Suplemento 8): 4625)

(73) CD138 - SDC1 (sindecano 1)

Nucleótido

20

Acceso de Genbank No. AJ551176

Versión de Genbank No. AJ551176.1 GI:29243141

Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 12:09 PM

25 Polipéptido

Acceso de Genbank No. CAD80245

Versión de Genbank No. CAD80245.1 GI:29243142

Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 12:09 PM

30

Referencias cruzadas

O'Connell FP., et al *Am J Clin Pathol*. 2004 Feb;121 (2):254-63

35 Otra información

Símbolo Oficial: SDC1

Otros Pseudónimos: CD138, SDC, SYND1, sindecano

- 40 Otras Designaciones: antígeno CD138; receptor del factor de crecimiento de fibroblastos de proteoglicanos de sulfato de heparano; proteoglicano de sindecano 1; sindecano-1

ANTICUERPOS

- 45 Biotest: MAb quimerizado (nBT062) - (Jagannath S., et al Poster ASH #3060, 2010; Solicitud de Patente WIPO WO/2010/128087)

Por ejemplo, véase US20090232810 SEC ID NO: 1 y 2

Immunogen: B-B4 (Tassone P., et al *Blood* 104_3688-3696)

- 50 Por ejemplo, véase US20090175863A1 SEC ID NO: 1 y 2

(74) CD74 (Molécula CD74, complejo mayor de histocompatibilidad, cadena invariante de clase II)

Nucleótido

55 Acceso de Genbank No. NM_004355

Versión de Genbank No. NM_004355.1 GI:343403784

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:30 PM

60 Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_004346

Versión de Genbank No. NP_004346.1 GI:10835071

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:30 PM

65

Referencias cruzadas

Kudo, J. et al *Nucleic Acids Res.* 13 (24), 8827-8841 (1985)

Otra información

5 Símbolo Oficial: CD74

Otros Pseudónimos: DHLAG, HLADG, II, Ia-GAMMA

Otras Designaciones: antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo mayor de histocompatibilidad, asociado al antígeno de clase II); cadena gamma del antígeno de histocompatibilidad de clase II de HLA; cadena invariante asociada a antígenos de HLA-DR; HLA-DR-gamma; cadena invariante asociada a Ia; cadena gamma de HLA-DR del MHC; cadena gamma de antígenos de clase II; p33

ANTICUERPOS

15 Immunomedics: hLL1 (Milatuzumab,) - Berkova Z. et al *Expert Opin Investig Drugs.* 2010 Jan;19(1):141-9
Por ejemplo, véase US20040115193 SEC ID NOs: 19, 20, 21, 22, 23 y 24

Genmab: HuMax-CD74 (véase el sitio web)

(75) Claudinas - CLs (Claudinas)

Referencias cruzadas

Offner S., et al *Cancer Immunol Immunother.* 2005 May; 54(5):431-45, Suzuki H., et al *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jul;1258:65-70)

25 En humanos, se han descrito 24 miembros de la familia - véase la referencia bibliográfica.

(76) EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)

Nucleótido

30 Acceso de Genbank No. NM_005228

Versión de Genbank No. NM_005228.3 GI:41927737

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

Polipéptido

35 Acceso de Genbank No. NP_005219

Versión de Genbank No. NP_005219.2 GI:29725609

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

Referencias cruzadas

40 Dhomen NS., et al *Crit Rev Oncog.* 2012;17(1):31-50

Otra información

45 Símbolo Oficial: EGFR

Otros Pseudónimos: ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA

Otras Designaciones: homólogo del oncogén viral de la leucemia eritroblástica aviar (v-erb-b); proteína 40 inhibidora del crecimiento celular; proteína 61 inductora de la proliferación celular; proto-oncogén c-ErbB-1; proteína tirosina-cinasa de receptor erbB-1

ANTICUERPOS

55 BMS: Cetuximab (Erbix) - Broadbridge VT., et al *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012 May;12(5):555-65.
Por ejemplo, véase US6217866 - depósito ATTC No. 9764.

Amgen: Panitumumab (Vectibix) - Argiles G., et al *Future Oncol.* 2012 Apr;8(4):373-89
Por ejemplo, véase US6235883 SEC ID NOs: 23-38.

60 Genmab: Zalutumumab - Rivera F., et al *Expert Opin Biol Ther.* 2009 May;9(5):667-74.

YM Biosciences: Nimotuzumab - Ramakrishnan MS., et al *MAbs.* 2009 Jan-Feb;1(1):41-8.
Por ejemplo, véase US5891996 SEC ID NOs: 27-34.

(77) Her3 (ErbB3) - ERBB3 (homólogo 3 del oncogén viral de la leucemia eritroblástica v-erb-b2 (aviar))

Nucleótido

5 Acceso de Genbank No. M34309
 Versión de Genbank No. M34309.1 GI:183990
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 PM

Polipéptido

10 Acceso de Genbank No. AAA35979
 Versión de Genbank No. AAA35979.1 GI:306841
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 PM

Referencias cruzadas

15 Plowman, G. D., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (13), 4905-4909 (1990)

Otra información

20 Símbolo Oficial: ERBB3
 Otros Pseudónimos: ErbB-3, HER3, LCCS2, MDA-BF-1, c-erbB-3, c-erbB3, erbB3-S, p180-ErbB3, p45-sErbB3, p85-sErbB3
 Otras Designaciones: proteína c-ErbB-3 similar a proto-oncogén; proteína tirosina-cinasa erbB-3 de receptor; receptor HER3 de la superficie celular tipo tirosina cinasa

25 **ANTICUERPOS**

Merimack Pharma: MM-121 (Schoeberl B., et al *Cancer Res.* 2010 Mar 15;70(6):2485-2494)
 Por ejemplo, véase US2011028129 SEC ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

30 **(78) RON - MST1R (Receptor 1 estimulante de macrófagos (tirosina cinasa relacionada con c-met))**

Nucleótido

35 Acceso de Genbank No. X70040
 Versión de Genbank No. X70040.1 GI:36109
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:17 PM

Polipéptido

40 Acceso de Genbank No. CCA49634
 Versión de Genbank No. CCA49634.1 GI:36110
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:17 PM

Referencias cruzadas

Ronsin C., et al *Oncogene* 8 (5), 1195-1202 (1993)

Otra información

50 Símbolo Oficial: MST1R
 Otros Pseudónimos: CD136, CDw136, PTK8, RON

55 Otras Designaciones: receptor de MSP; variante de MST1R RON30; variante de MST1R RON62; proteína tirosina cinasa 8 PTK8; variante de RON E2E3; tirosina cinasa relacionada con c-met; receptor de la proteína estimulante de macrófagos; p185-Ron; variante 1 de RON soluble; variante 2 de RON soluble; variante 3 de RON soluble; variante 4 de RON soluble

60 **(79) EPHA2 (Receptor A2 de EPH)**

Nucleótido

65 Acceso de Genbank No. BC037166
 Versión de Genbank No. BC037166.2 GI:33879863
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 01:59 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAH37166

Versión de Genbank No. AAH37166.1 GI:22713539

5 Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 01:59 PM

Referencias cruzadas

10 Strausberg R.L., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26), 16899-16903 (2002)

Otra información

Símbolo Oficial: EPHA2

Otros Pseudónimos: ARCC2, CTPA, CTPP1, ECK

15 Otras Designaciones: receptor 2 de efrina tipo A; proteína tirosina cinasa de receptor de células epiteliales; variante 1 de EPHA2 soluble; receptor ECK de la proteína tirosina-cinasa

ANTICUERPOS

20 Medimmune: 1C1 (Lee JW., et al *Clin Cancer Res.* 2010 May 1;16(9):2562-2570)
Por ejemplo, véase US20090304721A1 Fig. 7 y 8.

(80) CD20 - MS4A1 (4 dominios que atraviesan la membrana, subfamilia A, miembro 1)

25 Nucleótido

Acceso de Genbank No. M27394

Versión de Genbank No. M27394.1 GI:179307

30 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de noviembre de 2009 11:16 AM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAA35581

Versión de Genbank No. AAA35581.1 GI:179308

35 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de noviembre de 2009 11:16 AM

Referencias cruzadas

40 Tedder T.F., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1), 208-212 (1988)

Otra información

Símbolo Oficial: MS4A1

Otros Pseudónimos: B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7

45 Otras Designaciones: antígeno CD20 de linfocitos B; antígeno B1 de la superficie celular de linfocitos B; antígeno CD20; receptor de CD20; antígeno Leu-16 de superficie de leucocitos

ANTICUERPOS

50 Genentech/Roche: Rituximab - Abdulla NE., et al *BioDrugs.* 2012 Apr 1;26(2):71-82.
Por ejemplo, véase US5736137, depósito ATCC No. HB-69119.

GSK/Genmab: Ofatumumab - Nightingale G., et al *Ann Pharmacother.* 2011 Oct;45(10):1248-55.
Por ejemplo, véase US20090169550A1 SEC ID NOs: 2, 4 y 5.

55 Immunomedics: Veltuzumab - Goldenberg DM., et al *Leuk Lymphoma.* 2010 May;51(5):747-55.
Por ejemplo, véase US7919273B2 SEC ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

(81) Tenascina C - TNC (Tenascina C)

60 Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_002160

Versión de Genbank No. NM_002160.3 GI:340745336

65 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:33 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_002151

Versión de Genbank No. NP_002151.2 GI:153946395

5 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:33 PM

Referencias cruzadas

10 Nies D.E., et al *J. Biol. Chem.* 266 (5), 2818-2823 (1991); Siri A., et al *Nucleic Acids Res.* 19 (3), 525-531 (1991)

Otra información

Símbolo Oficial: TNC

Otros Pseudónimos: 150-225, GMEM, GP, HXB, JI, TN, TN-C

15 Otras Designaciones: GP 150-225; citotactina; antígeno de la matriz extracelular asociado a glioma; hexabraquiona (tenascina); antígeno miotendinoso; neuronectina; tenascina; isoforma 14/AD1/16 de tenascina-C

ANTICUERPOS

20 Philogen: G11 (von Lukowicz T., et al *J Nucl Med.* 2007 Apr;48(4):582-7) y F16 (Pedretti M. et al *Lung Cancer.* 2009 Apr;64(1):28-33)

Por ejemplo, véase US7968685 SEC ID NOs: 29, 35, 45 y 47.

(82) FAP (Proteína de activación de fibroblastos, alfa)

25

Nucleótido

Acceso de Genbank No. U09278

Versión de Genbank No. U09278.1 GI:1888315

30 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 09:22 AM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAB49652

35 Versión de Genbank No. AAB49652.1 GI:1888316

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 09:22 AM

Referencias cruzadas

40 Scanlan, M.J., et al *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (12), 5657-5661 (1994)

Otra información

Símbolo Oficial: FAP

45 Otros Pseudónimos: DPPIV, FAPA

Otras Designaciones: gelatinasa unida a membrana de melanoma de 170 kDa; serina proteasa de membrana integral; seprasa

(83) DKK-1 (Homólogo de Dickkopf 1 (*Xenopus laevis*))

50

Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_012242

Versión de Genbank No. NM_012242.2 GI:61676924

55 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:48 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_036374

60 Versión de Genbank No. NP_036374.1 GI:7110719

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:48 PM

Referencias cruzadas

65 Fedi P. et al *J. Biol. Chem.* 274 (27), 19465-19472 (1999)

Otra información

Símbolo Oficial: DKK1

Otros Pseudónimos: UNQ492/PRO1008, DKK-1, SK

- 5 Otras Designaciones: proteína 1 relacionada con dickkopf; similar a dickkopf 1; proteína 1 similar a dickkopf; proteína 1 relacionada con dickkopf; hDkk-1

ANTICUERPOS

- 10 Novartis: BHQ880 (Fulciniti M., et al *Blood*. 2009 Jul 9;114(2):371-379)
Por ejemplo, véase US20120052070A1 SEC ID NOs: 100 y 108.

(84) CD52 (Molécula CD52)

- 15 Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_001803

Versión de Genbank No. NM_001803.2 GI:68342029

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:48 PM

20

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_001794

Versión de Genbank No. NP_001794.2 GI:68342030

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:48 PM

25

Referencias cruzadas

Xia M.Q., et al *Eur. J. Immunol.* 21 (7), 1677-1684 (1991)

30

Otra información

Símbolo Oficial: CD52

Otros Pseudónimos: CDW52

- 35 Otras Designaciones: antígeno CAMPATH-1; antígeno CD52 (antígeno CAMPATH-1); antígeno CDW52 (antígeno CAMPATH-1); antígeno 1 de la patología de cambridge; proteína E5 secretora epididimal; he5; proteína 5 específica de epididimis humana

ANTICUERPOS

40

Alemtuzumab (Campath) - Skoetz N., et al *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Feb 15;2:CD008078.
Por ejemplo, véase el acceso a DrugBank No. DB00087 (BIOD00109, BTD00109)

(85) CS1 - SLAMF7 (Miembro 7 de la familia de SLAM)

45

Nucleótido

Acceso de Genbank No. NM_021181

Versión de Genbank No. NM_021181.3 GI:1993571

Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de junio de 2012 11:24 AM

50

Polipéptido

Acceso de Genbank No. NP_067004

Versión de Genbank No. NP_067004.3 GI:19923572

Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de junio de 2012 11:24 AM

55

Referencias cruzadas

Boles K.S., et al *Immunogenetics* 52 (3-4), 302-307 (2001)

60

Otra información

Símbolo Oficial: SLAMF7

Otros Pseudónimos: UNQ576/PRO1138, 19A, CD319, CRACC, CS1

Otras Designaciones: proteína 19A24; subconjunto 1 de CD2; células citotóxicas activadoras del receptor similar a

65

CD2; células citotóxicas activadoras del receptor similar a CD2; proteína FOAP-12 de la membrana; proteína similar a LY9 novedoso (antígeno 9 de linfocitos); proteína 19A

ANTICUERPOS

5 BMS: elotuzumab/HuLuc63 (Benson DM., et al *J Clin Oncol.* 2012 Jun 1;30(16):2013-2015)
Por ejemplo, véase US20110206701 SEC ID NOs: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16.

(86) Endoglina - ENG (Endoglina)

10 Nucleótido

Acceso de Genbank No. AF035753

Versión de Genbank No. AF035753.1 GI:3452260

15 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 06:36 PM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAC32802

20 Versión de Genbank No. AAC32802.1 GI:3452261

Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 06:36 PM

Referencias cruzadas

25 Rius C., et al *Blood* 92 (12), 4677-4690 (1998)
Símbolo Oficial: ENG

Otra información

30 Otros Pseudónimos: RP11-228B15.2, CD105, END, HHT1, ORW, ORW1
Otras Designaciones: antígeno CD105

(87) Anexina A1 - ANXA1 (Anexina A1)

35 Nucleótido

Acceso de Genbank No. X05908

Versión de Genbank No. X05908.1 GI:34387

40 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:02 AM

Polipéptido

Acceso de Genbank No. CCA29338

Versión de Genbank No. CCA29338.1 GI:34388

45 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:02 AM

Referencias cruzadas

50 Wallner B.P., et al *Nature* 320 (6057), 77-81 (1986)

Otra información

Símbolo Oficial: ANXA1

Otros Pseudónimos: RP11-71A24.1, ANX1, LPC1

55 Otras Designaciones: anexina I (lipocortina I); anexina-1; calpactina II; calpactina-2; cromobindina-9; lipocortina I; p35; proteína inhibidora de fosfolipasa A2

(88) V-CAM (CD106) - VCAM1 (Molécula 1 de adhesión a células vasculares)

60 Nucleótido

Acceso de Genbank No. M60335

Versión de Genbank No. M60335.1 GI:340193

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:56 AM

65

Polipéptido

Acceso de Genbank No. AAA61269

Versión de Genbank No. AAA61269.1 GI:340194

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:56 AM

5

Referencias cruzadas

Hession C., et al *J. Biol. Chem.* 266 (11), 6682-6685 (1991)

10 Otra información

Símbolo Oficial VCAM1

Otros Pseudónimos: CD106, INCAM-100

Otras Designaciones: antígeno CD106; proteína 1 de adhesión a células vasculares

15

Secuencias de Anticuerpos

Anti-Integrina $\alpha\beta6$

RHAB6.2

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGFAFTDSYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVA
GPYPFDYWGQGTLVTVSS

RHCB6.2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFIDSYMHWRQAPGQRLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRVTITTDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGTPTAVPNLRGDLQVLAQKV
AGPYPFDYWGQGTLVTVSS

RHF

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWRQAPGQRLEWMGWIDPENGD
TEYAPKFQGRVTFITTDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPPTGPYYFDYWGQGTLV
TVSS

20

RHFB6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFNFIDSYMHWRQAPGQRLEWMGWIDPENGD
TEYAPKFQGRVTFITTDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCNEGTPPTAVPNLRGDLQVLAQK
VAGPYYFDYWGQGTLVTVSS

RHAY100bP

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGFAFTDSYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTGPYPFDYWGQGLTVV
SS

RKF

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIK

RKFL36L50

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWLQQKPGQAPRLLIYLTSNLASGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIK

RKC

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIK

Anti-CD33

CD33 Hum195 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYNMHWRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGT
GYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDFAVYYCARGRPAMDYWGQGLTVTVSS

CD33 Hum195 VK

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQGS
5 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFAFYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK

Anti-CD19

VH acondicionada superficialmente de CD19 B4

10 QVQLVQPGAEEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTSNWMHWKQRPGQGLEWIGEIDPSDSYT
NYNQNFKGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYYAMDYWGQGTSV
TVSS

VK acondicionada superficialmente de CD19 B4

15 EIVLTQSPAIMSASPGERVMTMCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPRRWIYDTSKLAGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISSMEPEDAATYYCHQRGSYTFGGGTKLEIK

Anti-Her2

Cadena de VH de Herceptina

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWWRQAPGKGLEWARIYPTNGYTR
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVT
VSS

Cadena de VL de Herceptina

5 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFGSRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

Anti-CD25

10 VK de Simulect (también conocido como Basiliximab)

QIVSTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSRSYMQWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAGVPA
RFGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYTFGGGKLEIK

VH de Simulect

15 QLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTRYWMHWIKRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSY
NQKFEGKAKLTAVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYYCSRDYGYDFDFWGQGTTLTVSS

Anti-PSMA

20 VH '1 desinmunizado

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLEWIGNINPNNGGTTY
NQKFEDKATLTVDKSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTLLTVSS

25 VK '1 desinmunizado

DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGPSPKLLIYWASTRHTGIPS
RFGSGSGTDFLTISLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIK

VH1 '5 desinmunizado

30 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWWRQAPGKGLEWAEIRSQSNN
FATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTGVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VH2 '5 desinmunizado

35 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFTFSNYWMNWWRQAPGKGLEWAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VH3 '5 desinmunizado

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFTFSNYWMNWWRQAPGKGLEWAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VH4 '5 desinmunizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VK1 '5 desinmunizado

5 NIVMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFTGSGSATDFTLTISLQTEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEMK

VK2 '5 desinmunizado

10 NIVMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK3 '5 desinmunizado

15 NIQMTQFPSAMSASVGDRVTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK4 '5 desinmunizado

20 NIQMTQFPSAMSASVGDRVTITCKASENVGTYVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK DI '5 desinmunizado

20 NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENVGTYVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGVP
DRFSGSGSGTDFILTISVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK

VH DI '5 desinmunizado

25 EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHA '5 humanizado

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHB '5 humanizado

35 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHC '5 humanizado

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHD '5 humanizado

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWWRQASGKGLEWVGEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHE '5 humanizado

5 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWWRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRFTISRDDSKNTVYLMNSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHF '5 humanizado

10 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWWRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHG '5 humanizado

15 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWWRQASGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNLSLRTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RKA '5 humanizado

20 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKB '5 humanizado

25 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKC '5 humanizado

30 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKD '5 humanizado

35 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKE '5 humanizado

40 NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPD
RFTGSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKF '5 humanizado

45 NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKG '5 humanizado

50 NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPD
RFTGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

El anticuerpo parental también puede ser una proteína de fusión que comprende una secuencia de péptidos de unión

a albúmina (ABP) (Dennis *et al* (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" *J Biol Chem.* 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Los anticuerpos de la invención incluyen proteínas de fusión con secuencias de ABP enseñadas por: (i) Dennis *et al* (2002) *J Biol Chem.* 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 2004/0001827 en [0076]; y (iii) documento WO 01/45746 en las páginas 12-13.

En una modalidad, el anticuerpo se ha producido para dirigirse específicamente al antígeno relacionado con el tumor $\alpha_v\beta_6$.

El agente de unión a célula se puede marcar, por ejemplo, para ayudar en la detección o la purificación del agente ya sea antes de la incorporación como un conjugado, o como parte del conjugado. La marca puede ser una marca de biotina. En otra modalidad, el agente de unión a célula se puede marcar con un radioisótopo.

Conexión de la unidad de enlazador con la unidad de ligando

La unidad de ligando se conecta con la unidad de enlazador a través de una unidad de disulfuro.

En una modalidad, la conexión entre la unión de ligando y el enlazador de fármaco se forma entre un grupo tiol de un residuo de cisteína de la unión de ligando y un grupo de maleimida de la unidad de enlazador de fármaco.

Los residuos de cisteína de la unidad de ligando pueden estar disponibles para la reacción con el grupo funcional de la unidad de enlazador para formar una conexión. En otras modalidades, por ejemplo, cuando la unidad de ligando es un anticuerpo, los grupos tiol del anticuerpo pueden participar en los enlaces de disulfuro intercatenarios. Estos enlaces intercatenarios pueden convertirse en grupos tiol libres mediante, por ejemplo, el tratamiento del anticuerpo con DTT antes de la reacción con el grupo funcional de la unidad de enlazador.

En algunas modalidades, el residuo de cisteína se introduce en la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Las posiciones para la inserción de cisteína mediante la sustitución en la cadena pesada o ligera del anticuerpo incluyen las descritas en la solicitud estadounidense publicada n.º 2007-0092940 y la publicación de patente internacional W02008070593.

Métodos de tratamiento

Los compuestos de la presente invención pueden usarse en un método de terapia. También se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de conjugado de la fórmula II para su uso en un método de tratamiento. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para ser beneficiosa para un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real que se administra y la tasa y el transcurso de tiempo de la administración dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se trata. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones relativas a la dosis, es parte de las responsabilidades de los médicos y otros profesionales de la salud.

Un conjugado puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos, ya sea de forma simultánea o secuencial, conforme a la afección a tratar. Ejemplos de tratamientos y terapias incluyen, de modo no taxativo, quimioterapia (la administración de agentes activos que incluyen, por ejemplo, fármacos; cirugía; y radioterapia).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención y para utilizar de acuerdo con la presente invención pueden comprender, además del ingrediente activo, es decir, un conjugado de fórmula I, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, solución amortiguadora, estabilizante u otros materiales conocidos para los expertos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, la que puede ser oral o mediante inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral se pueden encontrar en forma de comprimido, cápsula, en polvo o líquida. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido o un adyuvante. En general, las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden un vehículo líquido, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tal como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un vehículo sólido, tal como gelatina.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea o la inyección en el sitio de afección, el ingrediente activo se encontrará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos y con pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica serán capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. De ser necesario, pueden incluirse conservantes, estabilizantes, soluciones amortiguadoras, antioxidantes y/u otros aditivos.

Los conjugados pueden usarse para tratar la enfermedad proliferativa y enfermedad autoinmunitaria. La expresión

"enfermedad proliferativa" hace referencia a una proliferación celular no deseada o descontrolada de células anormales o excesivas que es indeseable, tal como, crecimiento hiperplásico o neoplásico, ya sea in vitro o in vivo.

5 Ejemplos de afecciones proliferativas incluyen, de modo no taxativo, la proliferación celular benigna, premaligna y maligna que incluye, de modo no taxativo, neoplasias y tumores (por ejemplo, histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer pulmonar microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer intestinal, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma ovárico, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer cerebral, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma), leucemias, psoriasis, enfermedades óseas, trastornos fibroproliferativos (por ejemplo, de tejidos conectivos) y aterosclerosis. Otros cánceres de interés incluyen, de forma no taxativa, hematológico; neoplasias malignas tales como leucemias y linfomas, tales como linfoma no Hodgkin y subtipos tales como DLBCL, zona marginal, zona del manto y folicular, linfoma de Hodgkin, AML y otros cánceres que se originan en linfocitos B o T.

15 Los ejemplos de enfermedad autoinmunitaria incluyen los siguientes: artritis reumatoide, enfermedades desmielizantes autoinmunitarias (por ejemplo, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), artritis sorriática, oftalmopatía endócrina, uveorretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad de Graves, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmunitario, enfermedad intestinal inflamatoria (por ejemplo, enfermedad de Crohn), anafilaxis, reacción alérgica, síndrome de Sjogren, diabetes melitus tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, falla endócrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveitis autoinmunitaria, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de tiroides autoinmunitaria, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, aterosclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, péñfigo vulgar, péñfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia areata, penfigoide, escleroderma, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmunitaria masculina y femenina, espondilitis anquilosante, colitis ulcerativa, enfermedad mixta del tejido conectivo, poliarteritis nodosa, vasculitis necrotizante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmunitaria, pulmón del cuidador de aves, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nodoso, pioderma gangrenoso, reacción de transfusión, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, equistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eczema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomiелitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmitis, eritema elevatum et diutinu, soriasis, eritroblastosis fetal, faciitis esoinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía IgA, púrpura Henoch-Schonlein, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo al trasplante, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulemia de Waldenstrom, síndrome de Evan y falla gonadal autoinmunitaria.

40 En algunas modalidades, la enfermedad autoinmunitaria es un trastorno de linfocitos B (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes tipo I), Th1-linfocitos (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, soriasis, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis o enfermedad de injerto contra huésped) o Th2-linfocitos (por ejemplo, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópico, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica o enfermedad de injerto contra huésped crónica). Generalmente, los trastornos que implican células dendríticas implican trastornos de Th1-linfocitos o Th2-linfocitos. En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario es un trastorno inmunológico mediado por linfocitos T.

50 En algunas modalidades, la cantidad del conjugado administrada varía de alrededor de 0,01 a alrededor de 10 mg/kg por dosis. En algunas modalidades, la cantidad del conjugado administrada varía de alrededor de 0,01 a alrededor de 5 mg/kg por dosis. En algunas modalidades, la cantidad del conjugado administrada varía de alrededor de 0,05 a alrededor de 5 mg/kg por dosis. En algunas modalidades, la cantidad del conjugado administrada varía de alrededor de 0,1 a alrededor de 5 mg/kg por dosis. En algunas modalidades, la cantidad del conjugado administrada varía de alrededor de 0,1 a alrededor de 4 mg/kg por dosis. En algunas modalidades, la cantidad del conjugado administrada varía de alrededor de 0,05 a alrededor de 3 mg/kg por dosis. En algunas modalidades, la cantidad del conjugado administrada varía de alrededor de 0,1 a alrededor de 3 mg/kg por dosis. En algunas modalidades, la cantidad del conjugado administrada varía de alrededor de 0,1 a alrededor de 2 mg/kg por dosis.

60 *Carga de fármaco*

65 La carga de fármaco (p) es el número promedio de fármacos de PBD por agente de unión a célula, por ejemplo, anticuerpo. Si los compuestos de la invención están unidos a cisteínas, la carga de fármaco puede variar de 1 a 8 fármacos (D) por agente de unión a célula, es decir, en donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 porciones de fármaco están covalentemente unidas al agente de unión a célula. Las composiciones de conjugados incluyen colecciones de agentes de unión a célula, por ejemplo, anticuerpos, conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 8. Si los compuestos de la invención están unidos a lisinas, la carga de fármaco puede variar de 1 a 80 fármacos (D) por agente

de unión a célula, aunque se puede preferir un límite superior de 40, 20, 10 u 8. Las composiciones de conjugados incluyen colecciones de agentes de unión a célula, por ejemplo, anticuerpos, conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 80, 1 a 40, 1 a 20, 1 a 10 o 1 a 8.

5 El número promedio de fármacos por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación se puede caracterizar mediante medios convencionales tales como UV, HPLC de fase inversa, HIC, espectroscopía de masas, ensayo de ELISA, y electroforesis. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. Mediante ELISA, se puede determinar el valor promediado de p en una preparación particular de ADC (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Sin embargo, la
10 distribución de valores de p (fármaco) no es discernible mediante la unión anticuerpo-antígeno y la limitación de la detección de ELISA. Además, el ensayo de ELISA para la detección de conjugados de anticuerpo-fármaco no determina si las porciones de fármaco están unidas al anticuerpo, tal como los fragmentos de cadena pesada o cadena ligera, o los residuos de aminoácidos particulares. En algunos casos, se puede lograr la separación, la purificación y la caracterización de ADC homogéneos en donde p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco por medios
15 tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. Tales técnicas también son aplicables a otros tipos de conjugados.

Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener solamente uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solamente uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir un enlazador. Una
20 carga de fármaco mayor, por ejemplo, $p > 5$, puede producir agregación, insolubilidad, toxicidad, o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco.

Normalmente, menos del máximo teórico de las porciones de fármaco están conjugadas con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos residuos de lisina que no reaccionan con el enlazador de fármaco. Solamente los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador que es reactivo con amina. Además, solamente los grupos tiol de cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador que es reactivo con tiol. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos, si hay, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que se puedan enlazar a una porción de fármaco. La mayoría de los residuos de tiol de cisteína en los anticuerpos de los compuestos existen como puentes de disulfuro y se deben reducir con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP, bajo condiciones reductoras parciales o totales. La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de diversas maneras diferentes, que incluyen: (i) limitar el exceso molar del enlazador de fármaco con respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo de reacción de la conjugación o temperatura, y (iii) condiciones reductoras parciales o reductoras limitantes para la modificación del tiol de cisteína.
25

35 Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitolo). Cada puente de cisteína formará de esta manera, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) lo que resulta en la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos se pueden introducir en el anticuerpo (o fragmento del mismo) manipulando uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos). El documento US 7521541 enseña a manipular anticuerpos mediante la introducción de aminoácidos de cisteína reactivos.
40

45 Los aminoácidos de cisteína se pueden manipular en sitios reactivos en un anticuerpo y que no forman enlaces disulfuro entre cadenas o intermoleculares (Junutula et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; documentos US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Los tioles de cisteína manipulados pueden reaccionar con reactivos enlazadores o los reactivos de fármaco-enlazador de la presente invención que tienen grupos electrófilos reactivos con tiol tales como maleimida o alfa-haloamidas para formar ADC con anticuerpos manipulados por cisteína y las porciones de fármacos de PBD. De esta manera, la localización de la porción de fármaco se puede diseñar, controlar y conocer. La carga de fármaco se puede controlar, ya que los grupos tiol de cisteína manipulados normalmente reaccionan con reactivos enlazadores reactivos con tiol o reactivos de fármaco-enlazador con alto rendimiento. La manipulación de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido de cisteína mediante sustitución en un único sitio en la cadena pesada o ligera da dos nuevas cisteínas en el anticuerpo simétrico. Una carga de fármaco próxima a 2 se puede lograr con casi homogeneidad del producto de conjugación ADC.
50
55

Si más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un intermediario de fármaco-enlazador, o reactivo enlazador seguido de reactivo de porción de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de porciones de fármaco unidas a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc. Los métodos de cromatografía líquida tales como fase inversa polimérica (PLRP) e interacción hidrofoba (HIC) pueden separar compuestos en la mezcla mediante el valor de carga del fármaco. Las preparaciones de ADC con un único valor de carga de fármaco (p) se pueden aislar, sin embargo, estos ADCs de valor de carga único pueden todavía ser mezclas heterogéneas debido a que las porciones de fármaco se pueden unir, por medio del enlazador, en diferentes
60
65 sitios en el anticuerpo.

De esta manera, las composiciones de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención incluyen mezclas de compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco en donde el anticuerpo tiene una o más porciones de fármaco de PBD y en donde las porciones de fármaco se pueden unir al anticuerpo en diversos residuos de aminoácidos.

- 5 En una modalidad, el número promedio de grupos de pirrolobenzodiazepina diméricos por agente de unión a célula está en el intervalo 1 a 20. En algunas modalidades, el intervalo se selecciona de 1 a 8, 2 a 8, 2 a 6, 2 a 4, y 4 a 8.

En algunas modalidades, hay un grupo de pirrolobenzodiazepina dimérico por agente de unión a célula.

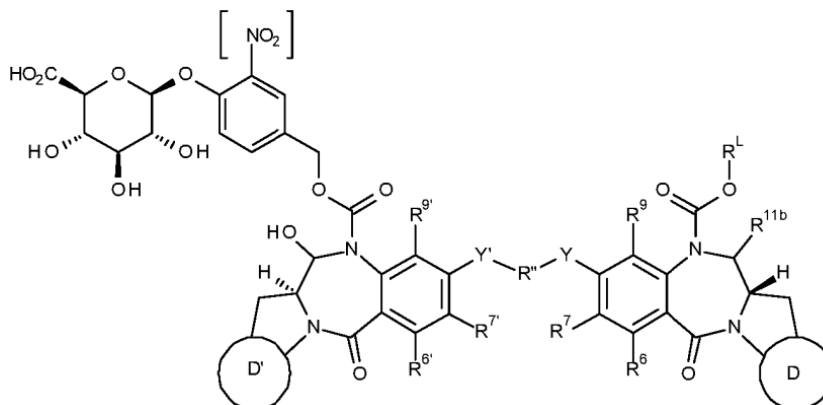
10 Vías de síntesis generales

La síntesis de compuestos de PBD se trata en detalle en las siguientes referencias:

- 15 a) WO 00/12508 (páginas 14 a 30);
 b) WO 2005/023814 (páginas 3 a 10);
 c) WO 2004/043963 (páginas 28 a 29); y
 d) WO 2005/085251 (páginas 30 a 39).

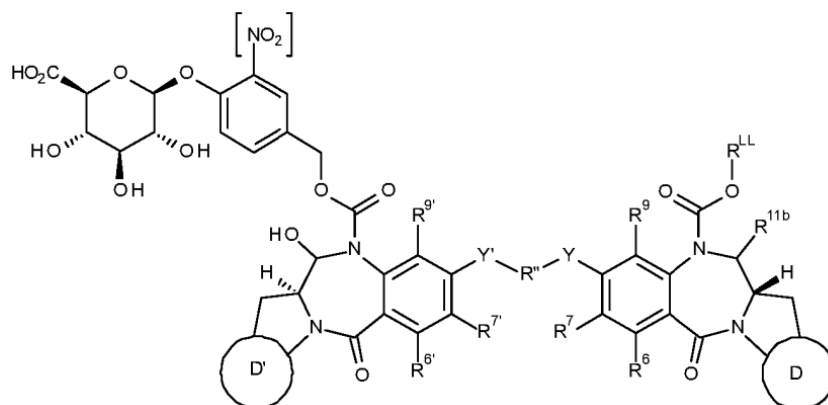
20 *Vía de síntesis*

Los compuestos de la presente invención de fórmula I:



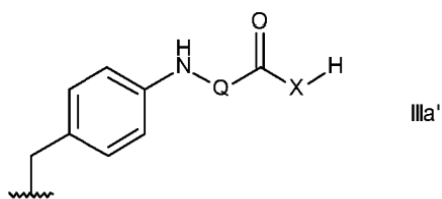
I

- 25 pueden sintetizarse a partir de un compuesto de Fórmula II:



Fórmula 2

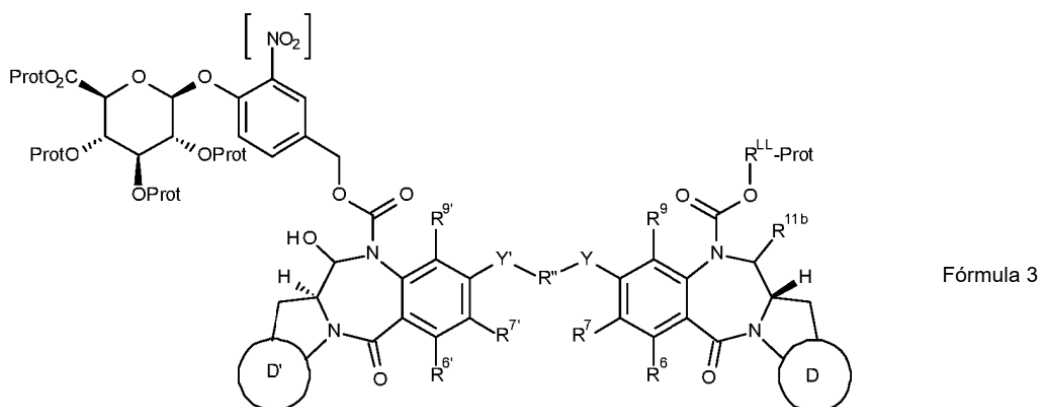
- 30 donde R², R⁶, R⁷, R⁹, R^{6'}, R^{7'}, R^{9'}, R^{11b}, R¹², Y, Y' y R'' se definen para los compuestos de fórmula I, y R^{LL} es un precursor de R^L - este método es particularmente aplicable a los compuestos de fórmula I donde R^L es de fórmula IIIa. Para estos compuestos, R^{LL} será normalmente una parte de R^L, tal como un grupo de fórmula IIIa':



En dicho caso, la reacción implica agregar el grupo G^L. El grupo G^L usado en la invención es como se define en la presente reivindicación 1.

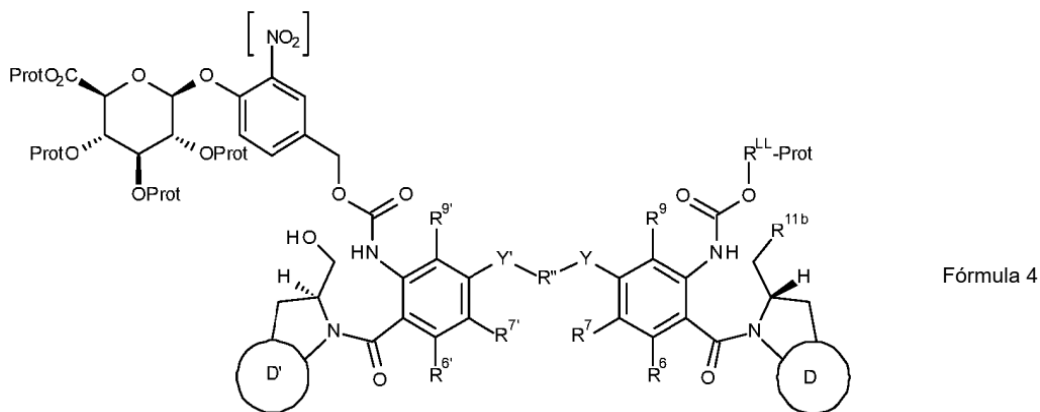
5

Los compuestos de Fórmula 2 pueden realizarse mediante la desprotección de los compuestos de Fórmula 3:



10 donde R², R⁶, R⁷, R⁹, R^{6'}, R^{7'}, R^{9'}, R^{11b}, R¹², Y, Y' y R'' se definen para los compuestos de fórmula I, y R^{LL-Prot} es una versión protegida de R^{LL} y la Prot representan un grupo de protección carboxi/hidroxi.

Los compuestos de fórmula 3 pueden fabricarse mediante cierre de anillo de los compuestos de Fórmula 4:

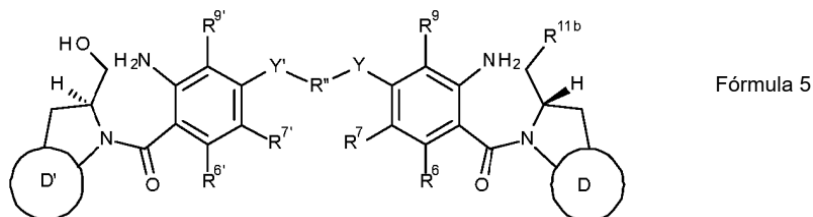


15

donde el cierre de anillo se lleva a cabo mediante oxidación, por ejemplo, Swern.

20

Los compuestos de fórmula 4 pueden prepararse a partir de los compuestos de fórmula 5:



25

mediante adición en etapas de los dos grupos protectores amino. La adición en etapas puede lograrse mediante protección simple de un grupo amino (por ejemplo, mediante Fmoc), seguido de la instalación de un grupo protector deseado en el otro grupo amino. Luego de esto, puede retirarse el grupo protector simple y luego instalarse otro grupo

protector amino deseado.

Los compuestos de fórmula I, donde R^L es de fórmula IIIb, divulgados únicamente para información, pueden sintetizarse en una forma similar, aunque el grupo R^L completo puede instalarse comenzando desde un compuesto de Fórmula 5, en lugar de con el uso de un precursor protegido.

Los compuestos de Fórmula 5 pueden sintetizarse mediante métodos conocidos, como los descritos en WO 2011/130598.

10 Síntesis de conjugados de fármacos

Los conjugados pueden prepararse como se describió previamente. Los anticuerpos pueden conjugarse en el compuesto de enlazador de fármaco como se describe en Doronina et ál., Nature Biotechnology, 2003, 21, 778-784). Brevemente, los anticuerpos (4-5 mg/ml) en PBS con borato de sodio 50 mM a pH 7,4 se reducen con clorhidrato de tris(carboxietil)fosfina (TCEP) a 37 °C. La evolución de la reacción, que reduce los disulfuros intercatenarios), se monitorea mediante la reacción con 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) y se le permite continuar hasta que se alcanza el nivel deseado de tioles/mAb. El anticuerpo reducido se enfría luego hasta 0 °C y alquila con 1,5 equivalentes de un fármaco-enlazador de maleimida por tiol de anticuerpo. Luego de 1 hora, la reacción se inactiva mediante la adición de 5 equivalentes de N-acetil cisteína. El fármaco-enlazador inactivado se retira mediante filtración en gel sobre una columna PD-10. Luego, el ADC se filtra de forma estéril a través de un filtro de jeringa de 0,22 μ m. La concentración de proteína puede determinarse mediante análisis espectral a 280 nm y 329 nm, respectivamente, con la corrección para la contribución de la absorbancia del fármaco a 280 nm. La cromatografía de exclusión por tamaño puede usarse para determinar la extensión del agregado de anticuerpo y puede usarse RP-HPLC para determinar los niveles del fármaco-enlazador inactivado con NAC restantes.

25 Preferencias adicionales

Las siguientes preferencias se pueden aplicar a todos los aspectos de la invención tal como se describió anteriormente o se pueden relacionar a un único aspecto. Las preferencias se pueden combinar entre sí en cualquier combinación.

En algunas modalidades, se encuentra el grupo NO_2 . En otras modalidades, el NO_2 está ausente.

En algunas modalidades, R^6 , R^7 , R^9 e Y' se seleccionan de los mismos grupos que R^6 , R^7 , R^9 e Y , respectivamente. En algunas de estas modalidades, R^6 , R^7 , R^9 e Y' son los mismos grupos que R^6 , R^7 , R^9 e Y , respectivamente.

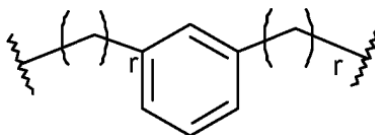
En algunas modalidades, R^{12} es igual que R_2 .

Enlace dimérico

40 En algunas modalidades Y e Y' son ambos O.

En algunas modalidades, R'' es un grupo alquilo C_{3-7} sin ningún sustituyente. En algunas de estas modalidades, R'' es un alquileo C_3 , C_5 o C_7 . En particular, R'' puede ser un alquileo C_3 o C_5 .

45 En otras modalidades, R'' es un grupo de la fórmula:



50 donde r es 1 o 2,

R^6 a R^9

En algunas modalidades, R^9 es H.

55 En algunas modalidades, R^6 se selecciona de H, OH, OR, SH, NH_2 , nitro y halo, y puede seleccionarse de H o halo. En algunas de estas modalidades, R^6 es H.

60 En algunas modalidades, R^7 se selecciona de H, OH, OR, SH, SR, NH_2 , NHR, NRR' y halo. En algunas de estas modalidades, R^7 se selecciona de H, OH y OR, donde R se selecciona de los grupos alquilo C_{1-7} , heterociclilo C_{3-10} y arilo C_{5-10} opcionalmente sustituidos. R puede ser, más preferentemente, un grupo alquilo C_{1-4} que se puede encontrar sustituido o no. Un grupo arilo C_{5-6} (por ejemplo, fenilo) es un sustituyente de interés. OMe y OCH_2Ph son sustituyentes particularmente preferidos en las posiciones 7. Dimetilamino (es decir, $-NMe_2$), $-(OC_2H_4)_qOMe$, en el que q es de 0 a

2, heterociclos C_6 que contienen nitrógeno, los que incluyen morfolino, piperidinilo y N-metil-piperazinilo, son otros sustituyentes de interés particular.

Estas modalidades y preferencias aplican a R^9 , R^6 y R^7 , respectivamente.

5 D y D'

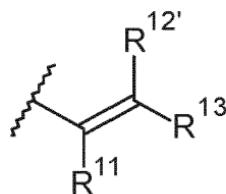
En algunas modalidades, D y D' son $D1$ y $D'1$ respectivamente.

10 En algunas modalidades, D y D' son $D2$ y $D'2$, respectivamente.

R^2

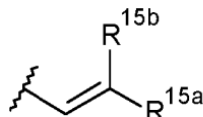
Cuando existe un enlace doble presente entre $C2'$ y $C3'$, R^2 se selecciona de:

- 15 (a) un grupo arilo C_{5-10} opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que comprende: halo, nitro, ciano, éter, alquilo C_{1-7} , heterociclilo C_{3-7} y bis-oxi-alquileo C_{1-3} ;
 (b) alquilo C_{1-5} alifático saturado;
 (c) cicloalquilo C_{3-6} saturado;
 20 (d)



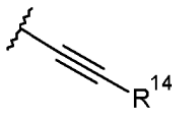
donde cada uno de R^{11} , R^{12} y R^{13} se selecciona de forma independiente de H, alquilo C_{1-3} saturado, alqueno C_{2-3} , alquino C_{2-3} y ciclopropilo, donde la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R^2 es menos de 5;

25 (e)



donde uno de R^{15a} y R^{15b} es H y el otro se selecciona de: fenilo, el que se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo o metoxi, piridilo y tiofenilo, y

30 (f)



35 donde R^{14} se selecciona de: H; alquilo C_{1-3} saturado, alqueno C_{2-3} , alquino C_{2-3} , ciclopropilo; fenilo, dicho fenilo se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo.

40 Cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} , puede ser un grupo arilo C_{5-7} . Un grupo arilo C_{5-7} puede ser un grupo fenilo o un grupo heteroarilo C_{5-7} , por ejemplo, furanilo, tiofenilo y piridilo. En algunas modalidades, R^2 es preferentemente fenilo. En otras modalidades, R^2 es preferentemente tiofenilo, por ejemplo, tiofen-2-ilo y tiofen-3-ilo.

45 Cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} , puede ser un grupo arilo C_{8-10} , por ejemplo, un grupo quinolinilo o isoquinolinilo. El grupo quinolinilo o isoquinolinilo puede estar unido al núcleo de PBD a través de cualquier posición disponible del anillo. Por ejemplo, el quinolinilo puede ser quinolin-2-ilo, quinolin-3-ilo, quinolin-4-ilo, quinolin-5-ilo, quinolin-6-ilo, quinolin-7-ilo y quinolin-8-ilo. De estos, se pueden preferir quinolin-3-ilo y quinolin-6-ilo. El isoquinolinilo puede ser isoquinolin-1-ilo, isoquinolin-3-ilo, isoquinolin-4-ilo, isoquinolin-5-ilo, isoquinolin-6-ilo, isoquinolin-7-ilo y isoquinolin-8-ilo. De estos, se pueden preferir isoquinolin-3-ilo e isoquinolin-6-ilo.

50 Cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} , puede tener cualquier cantidad de grupos sustituyentes. Preferentemente, tiene de 1 a 3 grupos sustituyentes, con preferencia de 1 y 2, y se prefieren incluso más grupos con un único sustituyente. Los sustituyentes se pueden encontrar en cualquier posición.

En los casos en los que R^2 es un grupo arilo C_{5-7} , un sustituyente único se encuentra preferentemente en un átomo de anillo que no se encuentra adyacente al enlace al resto del compuesto, es decir, es preferentemente β o γ respecto al enlace al resto del compuesto. Por consiguiente, en el caso en el que el grupo arilo C_{5-7} es fenilo, el sustituyente se encuentra preferentemente en posiciones meta o para y más preferentemente, en posición para.

5 En el caso en el que R^2 es un grupo arilo C_{8-10} , por ejemplo, quinolinilo o isoquinolinilo, puede presentar cualquier cantidad de sustituyentes en cualquier posición de los anillos de quinolina o isoquinolina. En algunas modalidades, presenta uno, dos o tres sustituyentes, los que se pueden encontrar ya sea en los anillos próximos como distales, o en ambos (si hubiera más de un sustituyente).

10 *Sustituyentes R^2 , cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10}*

Si un sustituyente en R^2 cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} es halo, es preferentemente F o Cl, y más preferentemente, Cl.

15 Si un sustituyente en R^2 cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} es éter, en algunas modalidades puede ser un grupo alcoxi, por ejemplo, un grupo alcoxi C_{1-7} (por ejemplo, metoxi, etoxi) o en algunas modalidades puede ser un grupo ariloxi C_{5-7} (por ejemplo, fenoxi, piridiloxi, furaniloxi). El grupo alcoxi se puede encontrar adicionalmente sustituido, por ejemplo, con un grupo amino (por ejemplo, dimetilamino).

20 Si un sustituyente en R^2 cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} es alquilo C_{1-7} , puede ser preferentemente un grupo alquilo C_{1-4} (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo).

25 Si un sustituyente en R^2 cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} es heterociclilo C_{3-7} , en algunas modalidades puede ser un grupo heterociclilo C_6 que contiene nitrógeno, por ejemplo, morfolino, tiomorfolino, piperidinilo, piperazinilo. Dichos grupos se pueden enlazar al resto del resto de PBD a través del átomo de nitrógeno. Tales grupos se pueden sustituir adicionalmente, por ejemplo, con grupos alquilo C_{1-4} . Si el grupo heterociclilo C_6 que contiene nitrógeno es piperazinilo, dicho sustituyente adicional se puede encontrar en el segundo átomo anular de nitrógeno.

30 Si un sustituyente en R^2 cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} es bis-oxi-alquileo C_{1-3} , preferentemente es bis-oxi-metileno o bis-oxi-etileno.

Si un sustituyente en R^2 cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} es éster, preferentemente es éster metílico o éster etílico.

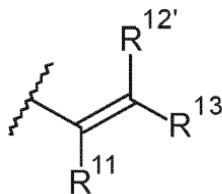
35 Los sustituyentes particularmente preferidos cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} incluyen metoxi, etoxi, flúor, cloro, ciano, bis-oxi-metileno, metil-piperazinilo, morfolino y metil-tiofenilo. Otros sustituyentes particularmente preferidos para R^2 son dimetilaminopropiloxi y carboxi.

40 Los grupos R^2 sustituidos particularmente preferidos cuando R^2 es un grupo arilo C_{5-10} incluyen, de modo no taxativo, 4-metoxi-fenilo, 3-metoxifenilo, 4-etoxi-fenilo, 3-etoxi-fenilo, 4-fluoro-fenilo, 4-cloro-fenilo, 3,4-bisoximetilen-fenilo, 4-metil-tiofenilo, 4-cianofenilo, 4-fenoxifenilo, quinolin-3-ilo y quinolin-6-ilo, isoquinolin-3-ilo e isoquinolin-6-ilo, 2-tienilo, 2-furanilo, metoxinaftilo y naftilo. Otro grupo R^2 sustituido posible es 4-nitrofenilo. Los grupos R^2 de interés particular incluyen 4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilo y 3,4-bisoximetilen-fenilo.

45 Cuando R^2 es alquilo alifático C_{1-5} saturado, puede ser metilo, etilo, propilo, butilo o pentilo. En algunas modalidades, puede ser metilo, etilo o propilo (n-pentilo o isopropilo). En algunas de estas modalidades, puede ser metilo. En otras modalidades, puede ser butilo o pentilo, los que pueden ser lineales o ramificados.

50 Cuando R^2 es cicloalquilo C_{3-6} saturado, puede ser ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. En algunas modalidades, puede ser ciclopropilo.

Cuando R^2 es



55 cada uno de R^{11} , $R^{12'}$ y R^{13} se selecciona de forma independiente de H, alquilo C_{1-3} saturado, alqueno C_{2-3} , alquino C_{2-3} y ciclopropilo, en los que la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R^2 es menos de 5. En algunas modalidades, la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R^2 es no más de 4 o no más de 3.

En algunas modalidades, uno de R^{11} , $R^{12'}$ y R^{13} es H, y los otros dos grupos se seleccionan de H, alquilo C_{1-3} saturado, alqueno C_{2-3} , alquino C_{2-3} y ciclopropilo.

5 En otras modalidades, dos de R^{11} , $R^{12'}$ y R^{13} son H, y el otro grupo se selecciona de H, alquilo C_{1-3} saturado, alqueno C_{2-3} , alquino C_{2-3} y ciclopropilo.

En algunas modalidades, los grupos que no son H se seleccionan de metilo y etilo. En algunas de dichas modalidades, los grupos que no son H son metilo.

10 En algunas modalidades, R^{11} es H.

En algunas modalidades, $R^{12'}$ es H.

En algunas modalidades, R^{13} es H.

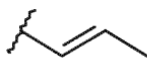
15

En algunas modalidades, R^{11} y $R^{12'}$ son H.

En algunas modalidades, R^{11} y R^{13} son H.

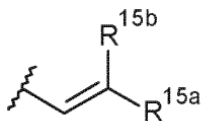
20 En algunas modalidades, $R^{12'}$ y R^{13} son H.

Un grupo R^2 de interés particular es:



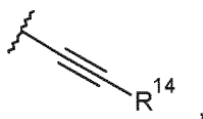
25

Cuando R^2 es



30 uno de R^{15a} y R^{15b} es H y el otro se selecciona de: fenilo, el que se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo. En algunas modalidades, el grupo que no es H es fenilo opcionalmente sustituido. Si el sustituyente opcional de fenilo es halo, preferentemente es flúor. En algunas modalidades, el grupo fenilo no se encuentra sustituido.

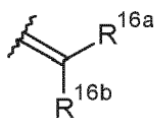
35 Cuando R^2 es



40 R^{14} se selecciona de: H; alquilo C_{1-3} saturado, alqueno C_{2-3} , alquino C_{2-3} , ciclopropilo; fenilo, dicho fenilo se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo. Si el sustituyente opcional de fenilo es halo, preferentemente es flúor. En algunas modalidades, el grupo fenilo no se encuentra sustituido. En algunas modalidades, R^{14} se selecciona de H, metilo, etilo, etenilo y etinilo. En algunas de dichas modalidades, R^{14} se selecciona de H y metilo.

45 Cuando existe un enlace simple entre C2 y C3,

R^2 es H o

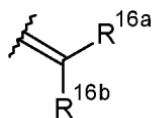


50

donde R^{16a} y R^{16b} se seleccionan independientemente de H, F, alquilo C^{1-4} saturado, alqueno C_{2-3} , cuyos grupos alquilo y alqueno están opcionalmente sustituidos por un grupo que se selecciona de alquilamido C_{1-4} y alquiléster C_{1-4} ; o, cuando uno de R^{16a} y R^{16b} es H, el otro se selecciona de nitrilo y un alquiléster C_{1-4} ;

En algunas modalidades, R² es H.

En algunas modalidades, R² es



5

En algunas modalidades, se prefiere que tanto R^{16a} como R^{16b} sean H.

En otras modalidades, se prefiere que tanto R^{16a} como R^{16b} sean metilo.

10

En modalidades adicionales, se prefiere que uno de R^{16a} y R^{16b} sea H, y el otro se seleccione de alquilo C₁₋₄ saturado, alquenilo C₂₋₃, cuyos grupos alquilo y alquenilo están opcionalmente sustituidos. En dichas modalidades adicionales, se puede preferir adicionalmente que el grupo que no sea H se seleccione de metilo y etilo.

15 R¹²

Cuando existe un enlace doble presente entre C2' y C3', R¹² se selecciona de:

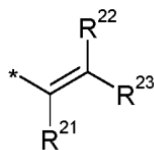
20 (a) un grupo arilo C₅₋₁₀ opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que comprende: halo, nitro, ciano, éter, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₇ y bis-oxi-alquileo C₁₋₃;

(b) alquilo C₁₋₅ alifático saturado;

25

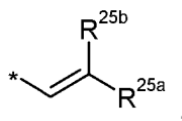
(c) un cicloalquilo C₃₋₆ saturado;

(d)



30 donde cada uno de R²¹, R²² y R²³ se selecciona de forma independiente de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alquenilo C₂₋₃, alquinilo C₂₋₃ y ciclopropilo, donde la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R¹² es menos de 5;

(e)

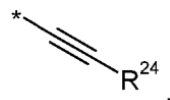


35

de R^{25a} y R^{25b} es H y el otro se selecciona de: fenilo, el que se encuentra opcionalmente sustituido seleccionado de halo, metilo o metoxi, piridilo y tiofenilo, y

40

(f)



45 donde R²⁴ se selecciona de: H; alquilo C₁₋₃ saturado, alquenilo C₂₋₃, alquinilo C₂₋₃, ciclopropilo; fenilo, dicho fenilo se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo.

Cuando R¹² es un grupo arilo C₅₋₁₀, puede ser un grupo arilo C₅₋₇. Un grupo arilo C₅₋₇ puede ser un grupo fenilo o un grupo heteroarilo C₅₋₇, por ejemplo, furanilo, tiofenilo y piridilo. En algunas modalidades, R¹² es preferentemente fenilo. En otras modalidades, R¹² es preferentemente tiofenilo, por ejemplo, tiofen-2-ilo y tiofen-3-ilo.

50

Cuando R¹² es un grupo arilo C₅₋₁₀, puede ser un grupo arilo C₈₋₁₀, por ejemplo, un grupo quiniolinilo o isoquinolinilo. El grupo quiniolinilo o isoquinolinilo puede estar unido al núcleo de PBD a través de cualquier posición disponible del

anillo. Por ejemplo, el quinolinilo puede ser quinolin-2-ilo, quinolin-3-ilo, quinolin-4-ilo, quinolin-5-ilo, quinolin-6-ilo, quinolin-7-ilo y quinolin-8-ilo. De estos, se pueden preferir quinolin-3-ilo y quinolin-6-ilo. El isoquinolinilo puede ser isoquinolin-1-ilo, isoquinolin-3-ilo, isoquinolin-4-ilo, isoquinolin-5-ilo, isoquinolin-6-ilo, isoquinolin-7-ilo y isoquinolin-8-ilo. De estos, se pueden preferir isoquinolin-3-ilo e isoquinolin-6-ilo.

5 Cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10} , puede tener cualquier cantidad de grupos sustituyentes. Preferentemente, tiene de 1 a 3 grupos sustituyentes, con preferencia de 1 y 2, y se prefieren incluso más grupos con un único sustituyente. Los sustituyentes se pueden encontrar en cualquier posición.

10 En los casos en los que R^{12} es un grupo arilo C_{5-7} , un sustituyente único se encuentra preferentemente en un átomo de anillo que no se encuentra adyacente al enlace al resto del compuesto, es decir, es preferentemente β o γ respecto al enlace al resto del compuesto. Por consiguiente, en el caso en el que el grupo arilo C_{5-7} es fenilo, el sustituyente se encuentra preferentemente en posiciones meta o para y más preferentemente, en posición para.

15 En el caso en el que R^{12} es un grupo arilo C_{8-10} , por ejemplo, quinolinilo o isoquinolinilo, puede presentar cualquier cantidad de sustituyentes en cualquier posición de los anillos de quinolina o isoquinolina. En algunas modalidades, presenta uno, dos o tres sustituyentes, los que se pueden encontrar ya sea en los anillos próximos como distales, o en ambos (si hubiera más de un sustituyente).

20 *Sustituyentes R^{12} , cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10}*

Si un sustituyente en R^{12} cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10} es halo, es preferentemente F o Cl, y más preferentemente, Cl.

25 Si un sustituyente en R^{12} cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10} es éter, en algunas modalidades puede ser un grupo alcoxi, por ejemplo, un grupo alcoxi C_{1-7} (por ejemplo, metoxi, etoxi) o en algunas modalidades puede ser un grupo ariloxi C_{5-7} (por ejemplo, fenoxi, piridiloxi, furaniloxi). El grupo alcoxi se puede encontrar adicionalmente sustituido, por ejemplo, con un grupo amino (por ejemplo, dimetilamino).

30 Si un sustituyente en R^{12} cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10} es alquilo C_{1-7} , puede ser preferentemente un grupo alquilo C_{1-4} (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo).

35 Si un sustituyente en R^{12} cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10} es heterociclilo C_{3-7} , en algunas modalidades puede ser un grupo heterociclilo C_6 que contiene nitrógeno, por ejemplo, morfolino, tiomorfolino, piperidinilo, piperazinilo. Dichos grupos se pueden enlazar al resto del resto de PBD a través del átomo de nitrógeno. Tales grupos se pueden sustituir adicionalmente, por ejemplo, con grupos alquilo C_{1-4} . Si el grupo heterociclilo C_6 que contiene nitrógeno es piperazinilo, dicho sustituyente adicional se puede encontrar en el segundo átomo anular de nitrógeno.

40 Si un sustituyente en R^{12} cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10} es bis-oxi-alquileo C_{1-3} , preferentemente es bis-oxi-metileno o bis-oxi-etileno.

Si un sustituyente en R^{12} cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10} es éster, preferentemente es éster metílico o éster etílico.

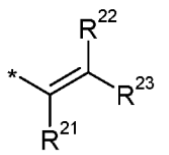
45 Los sustituyentes particularmente preferidos cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10} incluyen metoxi, etoxi, flúor, cloro, ciano, bis-oxi-metileno, metil-piperazinilo, morfolino y metil-tiofenilo. Otros sustituyentes particularmente preferidos para R^{12} son dimetilaminopropiloxi y carboxi.

50 Los grupos R^{12} sustituidos particularmente preferidos cuando R^{12} es un grupo arilo C_{5-10} incluyen, de modo no taxativo, 4-metoxi-fenilo, 3-metoxifenilo, 4-etoxi-fenilo, 3-etoxi-fenilo, 4-fluoro-fenilo, 4-cloro-fenilo, 3,4-bisoximetilen-fenilo, 4-metiltiofenilo, 4-cianofenilo, 4-fenoxifenilo, quinolin-3-ilo y quinolin-6-ilo, isoquinolin-3-ilo e isoquinolin-6-ilo, 2-tienilo, 2-furanilo, metoxinaftilo y naftilo. Otro grupo R^{12} sustituido posible es 4-nitrofenilo. Los grupos R^{12} de interés particular incluyen 4-(4-metilpiperazin-1-il)fenilo y 3,4-bisoximetilen-fenilo.

55 Cuando R^{12} es alquilo alifático C_{1-5} saturado, puede ser metilo, etilo, propilo, butilo o pentilo. En algunas modalidades, puede ser metilo, etilo o propilo (n-pentilo o isopropilo). En algunas de estas modalidades, puede ser metilo. En otras modalidades, puede ser butilo o pentilo, los que pueden ser lineales o ramificados.

60 Cuando R^{12} es cicloalquilo C_{3-6} saturado, puede ser ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. En algunas modalidades, puede ser ciclopropilo.

Cuando R¹² es



5 cada uno de R²¹, R²² y R²³ se selecciona de forma independiente de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo, en los que la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R¹² es menos de 5. En algunas modalidades, la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R¹² es no más de 4 o no más de 3.

En algunas modalidades, uno de R²¹, R²² y R²³ es H, y los otros dos grupos se seleccionan de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo.

10 En otras modalidades, dos de R²¹, R²² y R²³ son H, y el otro grupo se selecciona de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo.

15 En algunas modalidades, los grupos que no son H se seleccionan de metilo y etilo. En algunas de dichas modalidades, los grupos que no son H son metilo.

En algunas modalidades, R²¹ es H.

En algunas modalidades, R²² es H.

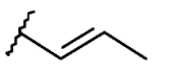
20 En algunas modalidades, R²³ es H.

En algunas modalidades, R²¹ y R²² son H.

25 En algunas modalidades, R²¹ y R²³ son H.

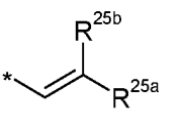
En algunas modalidades, R²² y R²³ son H.

Un grupo R¹² de interés particular es:



30

Cuando R¹² es

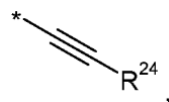


35

uno de R^{25a} y R^{25b} es H y el otro se selecciona de: fenilo, dicho fenilo se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo o metoxi, piridilo y tiofenilo. En algunas modalidades, el grupo que no es H es fenilo opcionalmente sustituido. Si el sustituyente opcional de fenilo es halo, preferentemente es flúor. En algunas modalidades, el grupo fenilo no se encuentra sustituido.

40

Cuando R¹² es

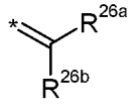


45

R²⁴ se selecciona de: H; alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃, ciclopropilo; fenilo, dicho fenilo se encuentra opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo. Si el sustituyente opcional de fenilo es halo, preferentemente es flúor. En algunas modalidades, el grupo fenilo no se encuentra sustituido. En algunas modalidades, R²⁴ se selecciona de H, metilo, etilo, etenilo y etinilo. En algunas de dichas modalidades, R²⁴ se selecciona de H y metilo.

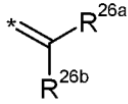
50

Cuando existe un enlace simple entre C2' y C3', R¹² es H o



5 donde R^{26a} y R^{26b} se seleccionan independientemente de H, F, alquilo C_{1-4} saturado, alqueno C_{2-3} , cuyos grupos alquilo y alqueno están opcionalmente sustituidos por un grupo que se selecciona de alquilamido C_{1-4} y alquiléster C_{1-4} ; o, cuando uno de R^{26a} y R^{26b} es H, el otro se selecciona de nitrilo y un alquiléster C_{1-4} ;

En algunas modalidades, R^{12} es H.
En algunas modalidades, R^{12} es



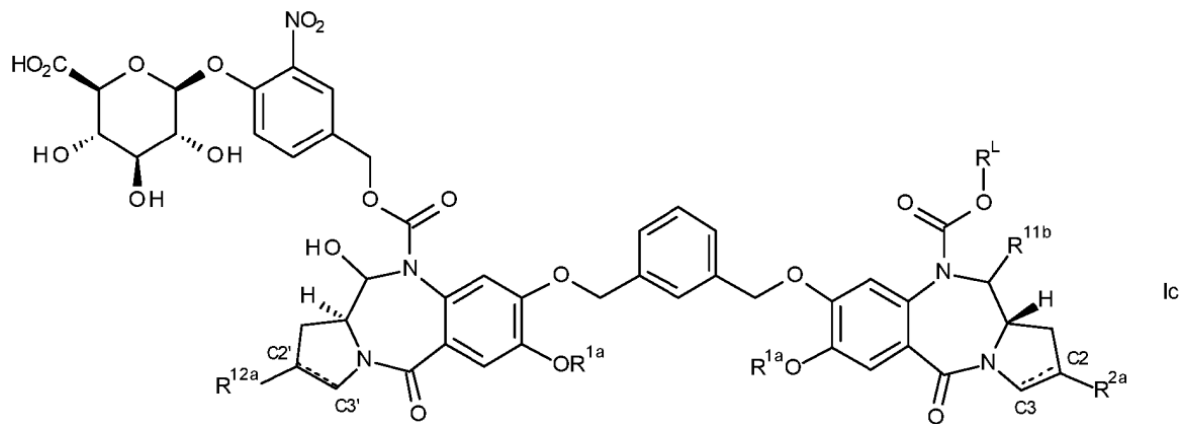
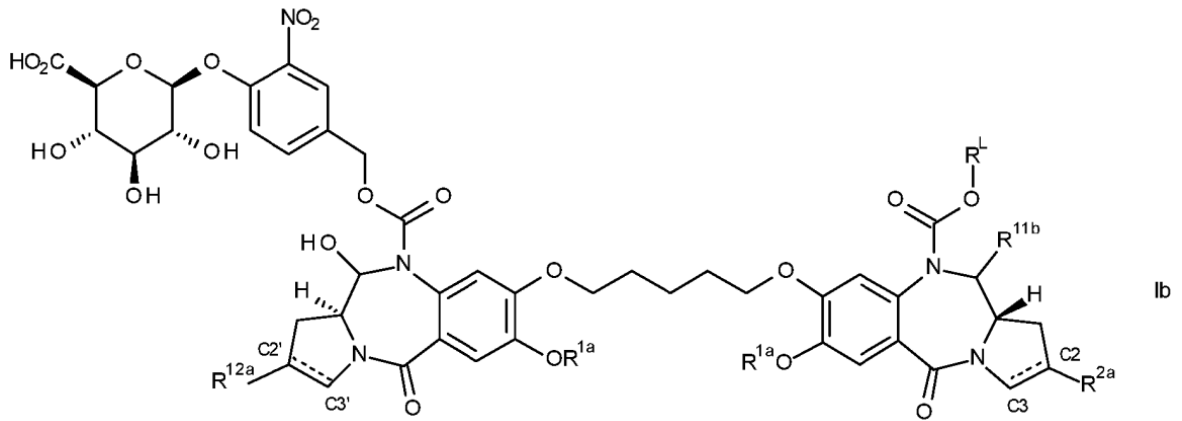
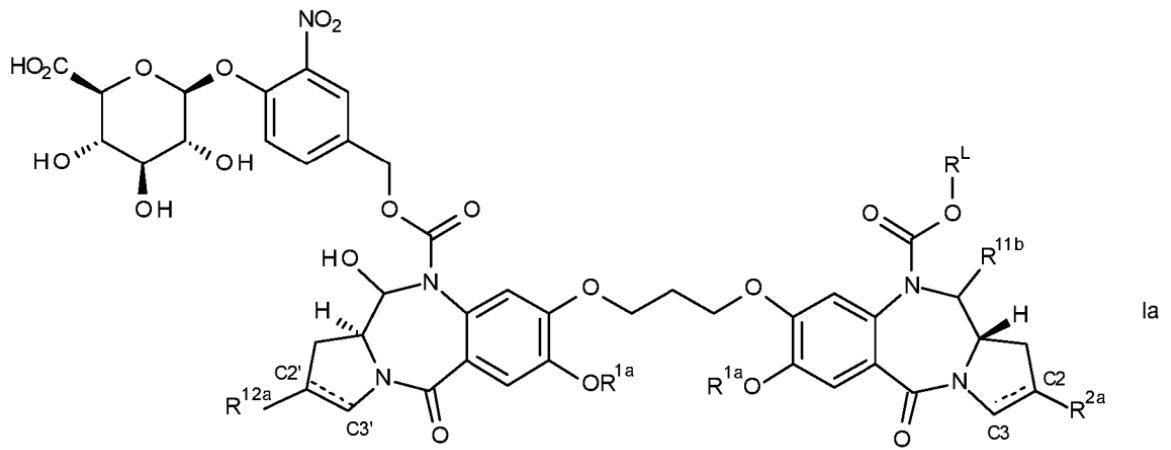
10 En algunas modalidades, se prefiere que tanto R^{26a} como R^{26b} sean H.
En otras modalidades, se prefiere que tanto R^{26a} como R^{26b} sean metilo.
15 En modalidades adicionales, se prefiere que uno de R^{26a} y R^{26b} sea H y el otro se seleccione de alquilo C_{1-4} saturado y alqueno C_{2-3} , con los grupos alquilo y alqueno opcionalmente sustituidos. En dichas modalidades adicionales, se puede preferir adicionalmente que el grupo que no sea H se seleccione de metilo y etilo.

20 R^{11b}

En algunas modalidades, R^{11b} es OH.

25 En algunas modalidades, R^{11b} OR^A, donde R^A es alquilo C_{1-4} . En algunas de estas modalidades, R^A es metilo.

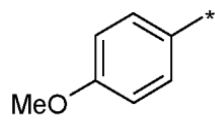
En algunas modalidades del primer aspecto de la presente invención son de fórmula Ia-1, Ia-2 o Ia-3:



donde R^{2a} y R^{12a} donde son iguales y se seleccionan de:

5

(a)



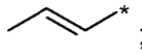
10

(b)

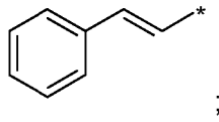


(c)

5 (d)

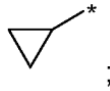


(e)



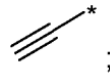
10

(f)



15

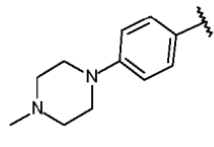
(g)



20

y

(h)



25

R^{1a} se selecciona de metilo y bencilo;
R^L y R^{1b} son como se definen anteriormente.

30

En algunas modalidades de la presente invención de R² y R¹² comprenden no más de 3 átomos de carbono.

Por lo tanto en algunas modalidades donde existe un enlace doble entre C2 y C3, R² puede seleccionarse de:

(i) Metilo;

35

(ii) Etilo;

(iii) Propilo;

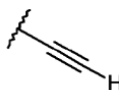
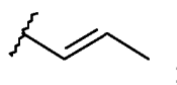
40

(iv) Ciclopropilo;

(v)

45

(vi)



y

(vi)

5

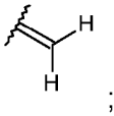


Por lo tanto en algunas modalidades donde no existe un enlace doble entre C2 y C3, R² puede seleccionarse de:

10

(i) H;

(ii)



15

(iii)



20

y

(iv)



25

Por lo tanto en algunas modalidades donde existe un enlace doble entre C2' y C3', R¹² puede seleccionarse de:

(i) Metilo;

30

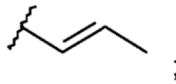
(ii) Etilo;

(iii) Propilo;

(iv) Ciclopropilo;

35

(v)



40

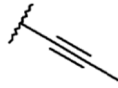
(vi)



45

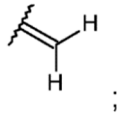
y

(vi)



Por lo tanto en algunas modalidades donde no existe un enlace doble entre C2' y C3', R¹² puede seleccionarse de:

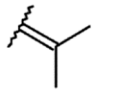
- 5 (i) H;
(ii)



- 10 (iii)



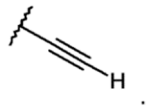
- 15 y
(iv)



20 En algunas de estas modalidades tanto R² como R¹² comprenden no más de 2 átomos de carbono.

Por lo tanto en algunas modalidades donde existe un enlace doble entre C2 y C3, R² puede seleccionarse de:

- 25 (i) Metilo;
(ii) Etilo; y
(vi)

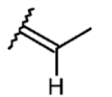


30 Por lo tanto en algunas modalidades donde no existe un enlace doble entre C2 y C3, R² puede seleccionarse de:

- 35 (i) H;
(ii)



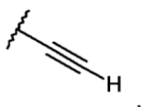
- y
40 (iii)



45 Por lo tanto en algunas modalidades donde existe un enlace doble entre C2' y C3', R¹² puede seleccionarse de:

- (i) Metilo;
- (ii) Etilo; y
- (vi)

5

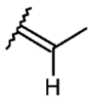


Por lo tanto en algunas modalidades donde no existe un enlace doble entre C2' y C3', R¹² puede seleccionarse de:

- 10 (i) H;
- (ii)



- 15 y
- (iii)



20 En más de estas modalidades tanto R² como R¹² comprenden no más de 1 átomos de carbono.

Por lo tanto en algunas modalidades donde existe un enlace doble entre C2 y C3, R² puede ser metilo. Por lo tanto en algunas modalidades donde no existe un enlace doble entre C2 y C3, R² puede seleccionarse de:

- 25 (i) H; y
- (ii)



30 Por lo tanto en algunas modalidades donde existe un enlace doble entre C2 y C3, R¹² puede ser metilo. Por lo tanto en algunas modalidades donde no existe un enlace doble entre C2' y C3', R¹² puede seleccionarse de:

- (i) H; y
- (ii)



35

40 Sin desear limitarse a una teoría en particular, donde el sustituyente en la posición C2 de los dímeros de PBD son pequeños, se cree que el uso de la unidad de terminación de glucurónido en estos enlazadores de fármaco es particularmente ventajoso, ya que aumenta significativamente la hidrofiliidad del enlazador de fármaco, lo que hace que los enlazadores de fármaco se conjuguen más fácilmente en una unidad de ligando.

Estas modalidades y preferencias también aplican al segundo aspecto de la invención.

Enlazador (R^L)

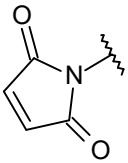
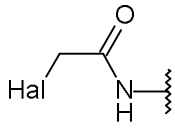
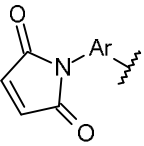
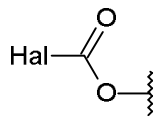
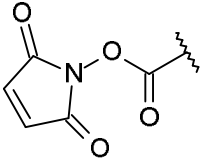
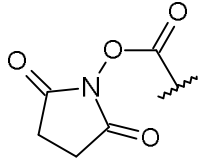
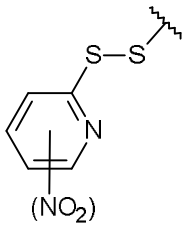
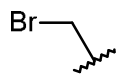
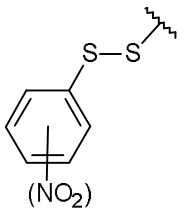

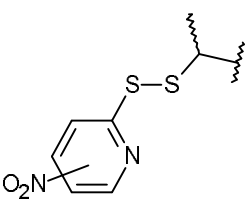

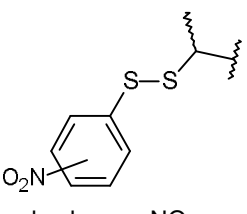
45

En la presente invención, R^L es un grupo de fórmula IIIa.

En la presente invención, R^L es un grupo de fórmula IIIa'.

50 G^L

G^L se selecciona de

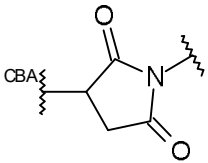
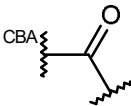
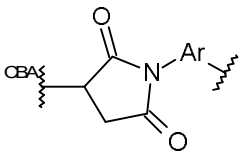
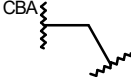
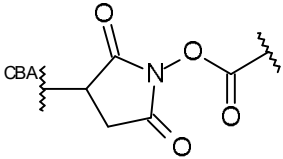
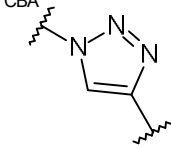
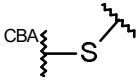
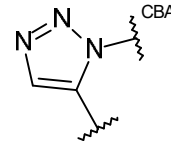
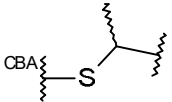
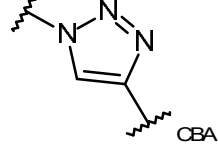
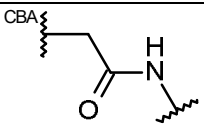
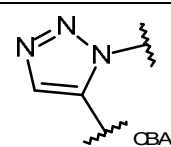
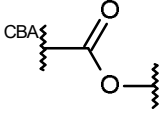
(G ^{L1-1})		(G ^{L4})	 donde Hal = I, Br, Cl
(G ^{L1-2})		(G ^{L5})	
(G ^{L2})		(G ^{L6})	
(G ^{L3-1})	 donde el grupo NO ₂ es opcional	(G ^{L7})	
(G ^{L3-2})	 donde el grupo NO ₂ es opcional	(G ^{L8})	
(G ^{L3-3})	 donde el grupo NO ₂ es opcional	(G ^{L9})	
(G ^{L3-4})	 donde el grupo NO ₂ es opcional		

donde Ar representa un grupo arileno C₅₋₆, por ejemplo, fenileno.

5 En algunas modalidades, G^L se selecciona de G^{L1-1} y G^{L1-2}. En algunas de estas modalidades, G^L es G^{L1-1}.

G^{LL}

G^{LL} se selecciona de:

(G ^{LL1-1})		(G ^{LL6})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL7})	
(G ^{LL2})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL4})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL5})			

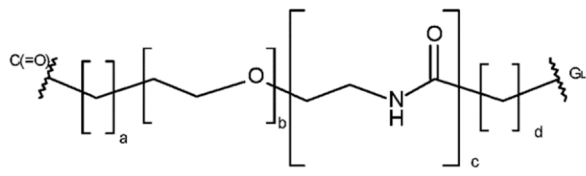
donde Ar representa un grupo arileno C₅₋₆, por ejemplo, fenileno.

En algunas modalidades, G^{LL} se selecciona de G^{LL1-1} y G^{LL1-2}. En algunas de estas modalidades, G^{LL} es G^{LL1-1}.

5

X

X es:



10

donde a = 0 a 5, b = 0 a 16, c = 0 o 1, d = 0 a 5.

a puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas modalidades, a es 0 a 3. En algunas de estas modalidades, a es 0 o 1. En modalidades adicionales, a es 0.

15

b puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En algunas modalidades, b es 0 a 12. En algunas de estas modalidades, b es 0 a 8 y puede ser 0, 2, 4 o 8.

c puede ser 0 o 1.

d puede ser 0, 1, 2, 3, 4 o 5. En algunas modalidades, d es 0 a 3. En algunas de estas modalidades, d es 1 o 2. En modalidades adicionales, d es 2.

- 5 En algunas modalidades de X, a es 0, c es 1 y d es 2 y b puede ser de 0 a 8. En algunas de estas modalidades, b es 0, 4 o 8.

Q^x

- 10 En una modalidad, Q^x es un residuo de aminoácidos. El aminoácido puede ser un aminoácido natural o un aminoácido no natural.

En una modalidad, Q^x se selecciona de: Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg y Trp, donde Cit es citrulina.

- 15 En una modalidad, Q^x comprende un residuo de dipéptido. Los aminoácidos en el dipéptido puede ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas modalidades, el dipéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el enlazador es un enlace lábil de catepsina, el dipéptido es el sitio de acción para la escisión mediada por catepsina. Entonces, el dipéptido es un sitio de reconocimiento para catepsina.

- 20 En una modalidad, Q^x se selecciona de:

- 25 $CO-Phe-Lys-NH$,
 $CO-Val-Ala-NH$,
 $CO-Val-Lys-NH$,
 $CO-Ala-Lys-NH$,
 $CO-Val-Cit-NH$,
 $CO-Phe-Cit-NH$,
 $CO-Leu-Cit-NH$,
 $CO-Ile-Cit-NH$,
 30 $CO-Phe-Arg-NH$, y
 $CO-Trp-Cit-NH$;

donde Cit es citrulina.

- 35 Preferentemente, Q^x se selecciona de:

- 40 $CO-Phe-Lys-NH$,
 $CO-Val-Ala-NH$,
 $CO-Val-Lys-NH$,
 $CO-Ala-Lys-NH$,
 $CO-Val-Cit-NH$;

Más preferentemente, Q^x se selecciona de $CO-Phe-Lys-NH$, $CO-Val-Cit-NH$ y $CO-Val-Ala-NH$.

- 45 Otras combinaciones de dipéptido de interés incluyen:

- 50 $CO-Gly-Gly-NH$,
 $CO-Pro-Pro-NH$, y
 $CO-Val-Glu-NH$.

Es posible utilizar otras combinaciones de dipéptido, que incluyen las descritas por Dubowchik et ál., Bioconjugate Chemistry, 2002, 13,855-869.

- 55 En algunas modalidades, Q^x es un residuo de tripéptido. Los aminoácidos en el tripéptido pueden ser cualquier combinación de aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En algunas modalidades, el tripéptido comprende aminoácidos naturales. Cuando el enlazador es un enlace lábil de catepsina, el tripéptido es el sitio de acción para la escisión mediada por catepsina. Entonces, el tripéptido es un sitio de reconocimiento para catepsina.

- 60 En una modalidad, se protege químicamente la cadena lateral de aminoácidos cuando sea apropiado. El grupo protector de cadena lateral puede ser un grupo como se trata a continuación. Las secuencias de aminoácidos protegidas pueden escindirse mediante enzimas. Por ejemplo, una secuencia de dipéptido que comprende un residuo Lys protegido con cadena lateral Boc se puede escindir mediante catepsina.

- 65 Los grupos protectores para las cadenas laterales de aminoácidos son conocidos en la técnica y se describen en el catálogo Novabiochem, y como se describe anteriormente.

En el presente documento se divulga que R^L es de fórmula IIIb.
 En el presente documento se divulga que R^{LL} es de fórmula IIIb'.

5 En el presente documento se divulga que R^{L1} y R^{L2} se seleccionan independientemente de H y metilo, o junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo ciclopropileno o iciclobutileno.

En el presente documento se divulga que tanto R^{L1} y R^{L2} son H.

10 En el presente documento se divulga que R^{L1} es H y R^{L2} es metilo.

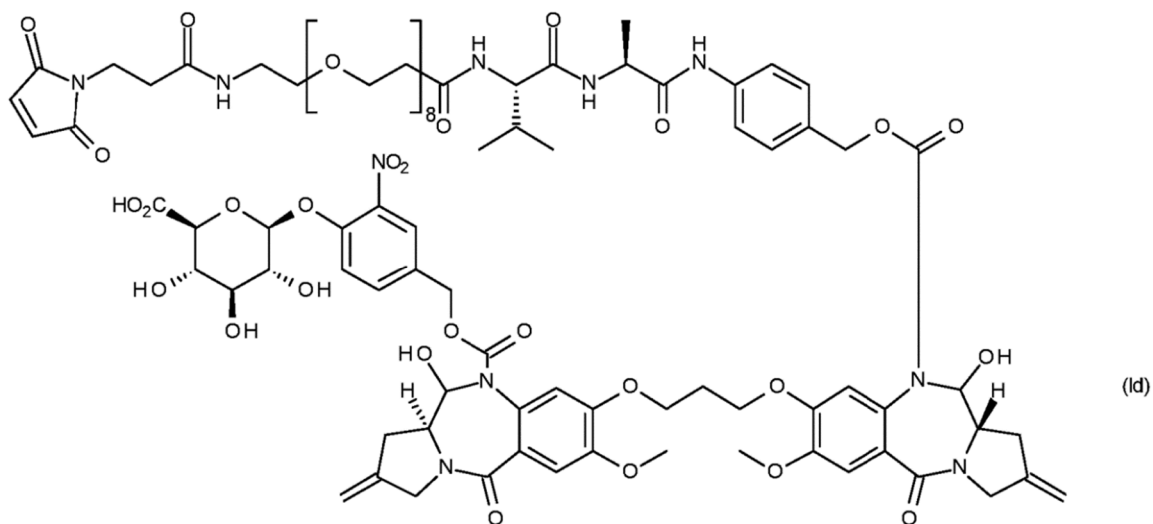
En el presente documento se divulga que tanto R^{L1} y R^{L2} son metilo.

15 En el presente documento se divulga que R^{L1} y R^{L2} junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo ciclopropileno.

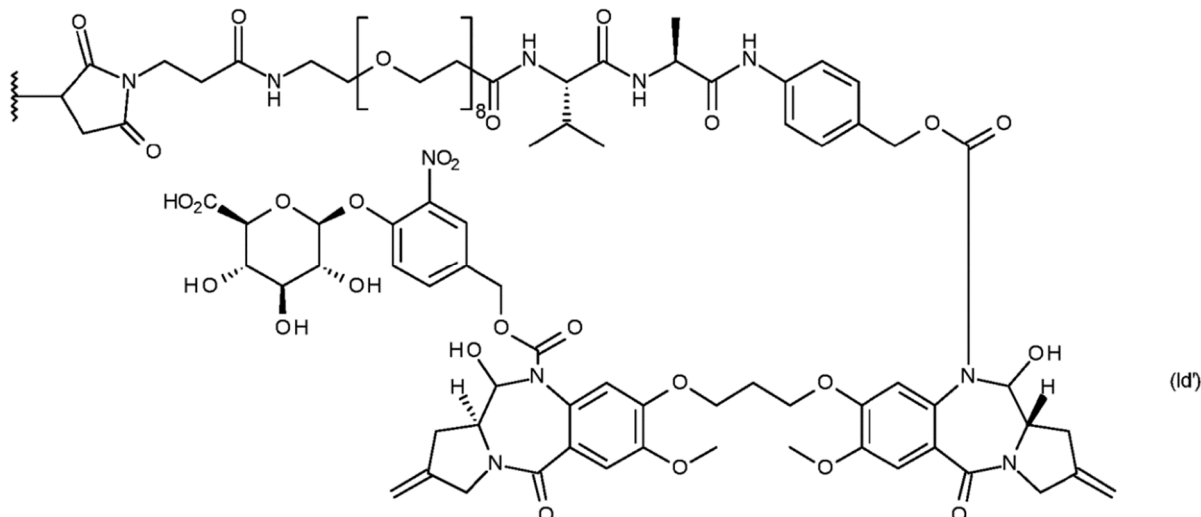
En el presente documento se divulga que R^{L1} y R^{L2} junto con el átomo de carbono al que están unidos forman un grupo ciclobutileno.

20 En el grupo IIIb, en el presente documento se divulga que e es 0. En el presente documento se divulga que e es 1 y el grupo nitro puede estar en cualquier posición disponible del anillo. En el presente documento se divulga que se encuentra en la posición orto. En el presente documento se divulga que se encuentra en la posición para.

En una modalidad particular, el primer aspecto de la invención comprende un compuesto de fórmula Id:



En una modalidad particular, el segundo aspecto de la invención, el enlazador de fármaco (D^L) es de fórmula (Id'):



Antecedentes adicionales

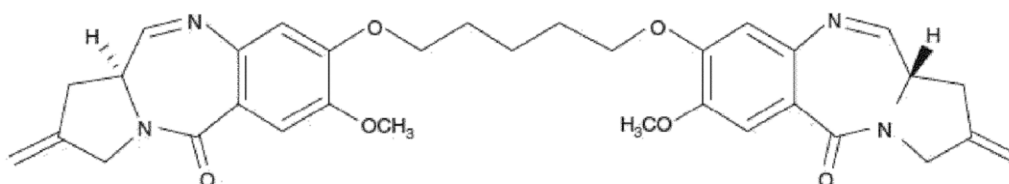
5 En un estudio de impacto presentado en el Marco de Excelencia de Investigación de 2014 (REF, por sus siglas en inglés) en el Reino Unido por University College London (disponible en <http://impact.ref.ac.uk/casestudies2/refservice.svc/GetCaseStudyPDF/35393>), se comentó que:

"Se ha desarrollado la siguiente generación de dímeros de PBD, que son más potentes que SG2000, inclusive SG2057 y SG2202. Exhiben una actividad picomolar/subpicomolar contra varias líneas celulares tumorales humanas y demuestran una actividad curativa en los modelos de xenoinjertos tumorales humanos" lo que hace referencia a:
 10 Hartley JA, et ál., DNA interstrand cross-linking and in vivo antitumor activity of the extended pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine dimer SG2057. Invest New Drugs. 30 de junio 2012; (3):950-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10637-011-9647-z> (en adelante "Hartley et ál (2012)") y:

"La capacidad para generar dichas moléculas citotóxicas que exhiban una potencia excelente sugiere un papel potencial en estrategias que apuntan al direccionamiento y liberación de agentes ampliamente citotóxicos en un sitio del tumor. Un ejemplo es el componente de "carga útil" de un conjugado de fármaco de anticuerpo (ADC, por sus siglas en inglés). Los dímeros de PBD totalmente sintéticos son idealmente adecuados para el rol de la carga útil en un enfoque de ADC".
 15

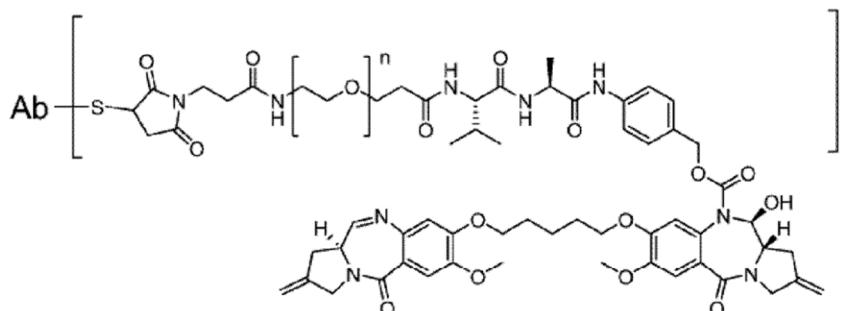
El ensayo de Hartley et ál (2012) comenta en su resumen que "SG2057 es, por lo tanto, un agente antitumoral ampliamente activo, con una actividad in vitro más potente y una actividad in vivo superior a SG2000, lo que garantiza un desarrollo adicional".
 20

El SG2057 tiene una estructura:



25 SG2057

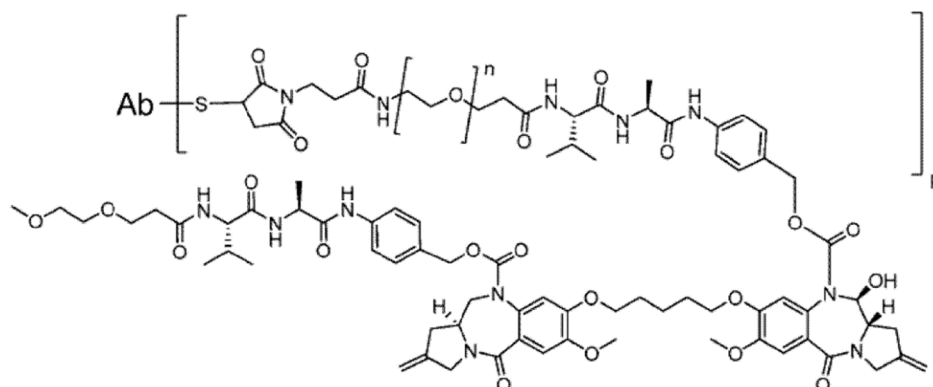
Los conjugados de fármaco de anticuerpo que utilizan SG2057 como una carga útil fueron descritos primero en WO 2011/130598. Por ejemplo, la reivindicación 54 de la presente solicitud incluye la fórmula:



30 donde n es de 1 a 24, más preferentemente 4 a 8. Los siguientes enlazadores de fármaco se ejemplifican: n=4, 15c; n=8, 15d; n=24, 15e.

35

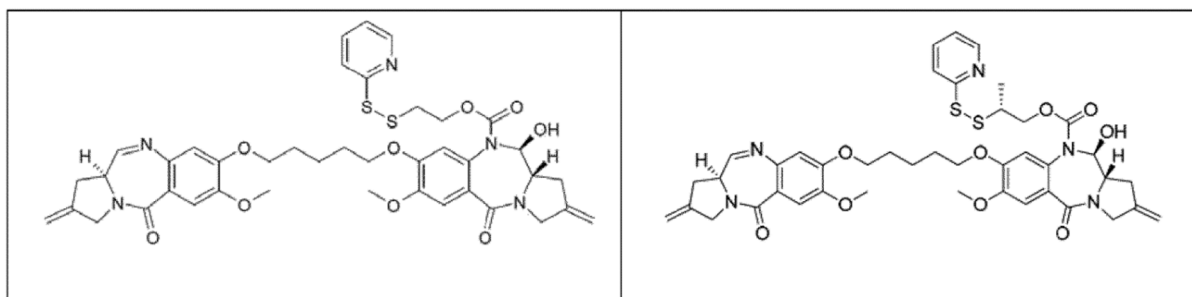
La reivindicación 54 de la presente solicitud también incluye la fórmula:



donde n es de 1 a 24, más preferentemente 4 a 8. Los siguientes enlazadores del fármaco se ejemplifican: n=8, 58; n=24, 61.

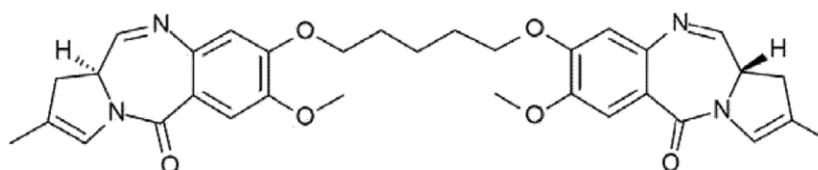
5 WO 2011/130598 también se describen conjugados anticuerpo-fármaco que incluyen estos enlazadores de fármaco, por ejemplo, 110 (antiSteap1-15d), ejemplo 114 (tastuzumab-15d) y ejemplo 115 (tastuzumab-58).

10 WO 2013/055987 describe los enlazadores del fármaco 14 y 22:



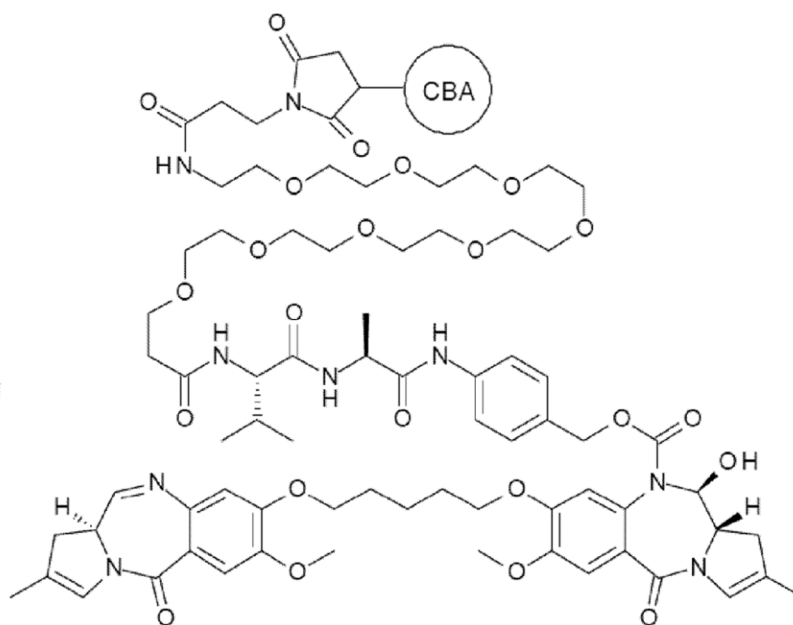
y su uso en los conjugados anticuerpo-fármaco.

15 Más recientemente, la carga útil:



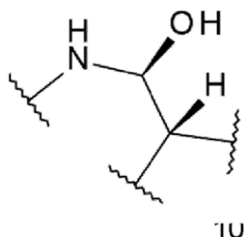
fue utilizada en los enlazadores de fármaco y conjugados anticuerpo-fármaco. WO 2014/057074 describe:

20

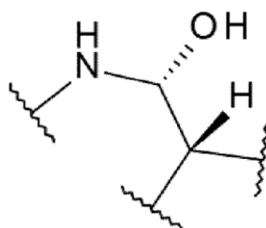


5 Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que aunque SG2000 es al menos 10 veces menos citotóxico que SG2057 (CWE Hartley et ál 2012), los conjugados anticuerpo-fármaco particulares parecen mostrar al menos una actividad comparable. Estos conjugados mostraron ser sorprendentemente bien tolerados en estudios de toxicidad en varias especies. Esto produce que los conjugados exhiban índices terapéuticos altos y, por lo tanto, son candidatos clínicos prometedores.

10 En algunas modalidades de la presente invención, el sustituyente C11 puede encontrarse en la siguiente disposición estereoquímica con respecto a los grupos cercanos:



15 En otras modalidades, el sustituyente C11 puede encontrarse en la siguiente disposición estereoquímica con respecto a los grupos cercanos:



20 Los compuestos de particular interés incluyen los de los ejemplos.

Ejemplos

25 Se llevó a cabo cromatografía ultrarrápida mediante el uso de un Biotage Isolera 1™ usando una elución de gradiente que se inicia de 88 % de hexano/EtOAc o 99,9 % de DCM/MeOH hasta que todos los componentes activos ante UV (detección en 214 y 254 nm) sean eluidos de la columna. El gradiente se mantuvo manualmente cuando se observó la elución sustancial del material activo ante UV. Las fracciones se evaluaron para determinar la pureza mediante el uso de una cromatografía en capa fina (TLC) utilizando gel de sílice Merck Kieselgel 60 F254, con indicador fluorescente sobre placas de aluminio. La visualización de TLC se logró con luz UV o vapor de yodo a menos que se indique lo contrario. Los solventes de extracción y cromatografía se adquirieron y se utilizaron sin purificación adicional de VWR, Reino Unido. Todos los productos químicos finos se adquirieron de Sigma-Aldrich o TCI Europe a menos

30

que se establezca lo contrario. Los reactivos pegilados se obtuvieron de Quanta biodesign US mediante Stratech UK.

Se obtuvieron los espectros de ^1H y ^{13}C NMR en un espectrómetro Bruker Avance® 400. Las constantes de acoplamiento se proporcionan en hertz (Hz). Los cambios químicos fueron registrados en partes por millón (ppm) posteriormente al tetrametilsilano. Se describen las multiplicidades de espín como s (singlete), bs (singlete amplio), d (doblete), t (triplete), y m (multiplete).

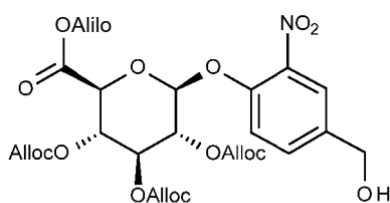
Las condiciones analíticas de LC/MS (para el monitoreo de la reacción y la determinación de la pureza) fueron de la siguiente manera: Se llevó a cabo una espectrometría de masa en electroespray en modo positivo mediante el uso de un Shimadzu Nexera®/Prominence® LCMS-2020. Las fases móviles utilizadas fueron el solvente A (H_2O con 0,1 % de ácido fórmico) y el solvente B (CH_3CN con 0,1 % de ácido fórmico). Gradiente para ejecución de rutina de 3 minutos. La composición inicial de B al 5 % se mantuvo durante 25 segundos, luego se aumentó de B al 5 % a B al 100 % durante un período de 1 minuto 35 segundos. La composición se mantuvo durante 50 segundos a B al 100 %, luego se regresó a B al 5 % en 5 segundos y luego se mantuvo ahí durante 5 segundos. La duración total de la ejecución de gradiente fue de 3,0 minutos. Gradiente para una ejecución de 15 minutos: la composición inicial B al 5 % durante 1 minuto, luego aumentó de B al 5 % a B al 100 % durante un período de 9 minutos. La composición se mantuvo durante 2 min a B al 100 %, luego se regresó a B al 5 % en 10 segundos y se mantuvo allí durante 2 minutos 50 segundos. La duración total de la ejecución de gradiente fue de 15,0 minutos. La velocidad de flujo fue de 0,8 ml/minuto (para una ejecución de 3 minutos) y 0,6 ml/minuto (para una ejecución de 15 minutos). La detección fue a 254 nm. Columnas: Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 1,7 μm , 2,1 x 50 mm a 50 °C equipada con Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard Pre-column, 130A, 1,7 μm , 2,1 mm x 5 mm (ejecución de rutina de 3 minutos); y ACE Exe 2 C18-AR, 2 μm , 3,0 x 100 mm equipada con Waters Acquity UPLC® BEH Shield RP18 VanGuard Pre-colum, 130A, 1,7 μm , 2,1 mm x 5 mm (ejecución de 15 minutos).

Las condiciones del HPLC preparativas fueron las siguientes: Se llevó a cabo una cromatografía líquida de alto rendimiento ultrarrápida de fase inversa (UFLC, por sus siglas en inglés) en una máquina Shimadzu Prominence® mediante una columna Phenomenex® Gemini NX 5 μ C18 (at 50 °C) de dimensiones: 150 x 21,2 mm. Los eluyentes utilizados fueron el solvente A (H_2O con 0,1 % de ácido fórmico) y el solvente B (CH_3CN con 0,1 % de ácido fórmico). Todos los experimentos de UFLC se llevaron a cabo con condiciones de gradiente: la composición inicial de B al 13 % aumentó a B al 60 % en un período de 15 minutos, luego aumentó a B al 100 % en 2 minutos. La composición se mantuvo durante 1 minuto a B al 100 %, luego regresó a B al 13 % en 0,1 minutos y se mantuvo ahí durante 1,9 minutos. La duración total de la ejecución de gradiente fue 20,0 minutos. La velocidad fue 20,0 ml/minuto y la detección fue a 254 y 280 nm.

Síntesis de intermedios clave

(a) Compuesto 5a

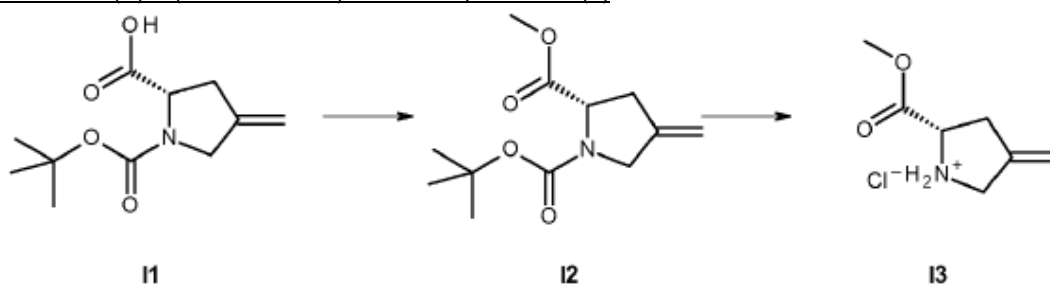
El siguiente compuesto 5a:



5a

se sintetizó como se describe (para el compuesto 10) en Grinda, M., et ál. ChemMedChem 2011 (5), 2137-2141 (DOI:10.1002/cmdc.201100355).

(a) Cloruro de (S)-2-(metoxicarbonil)-4-metilenopirrolidinio (3)



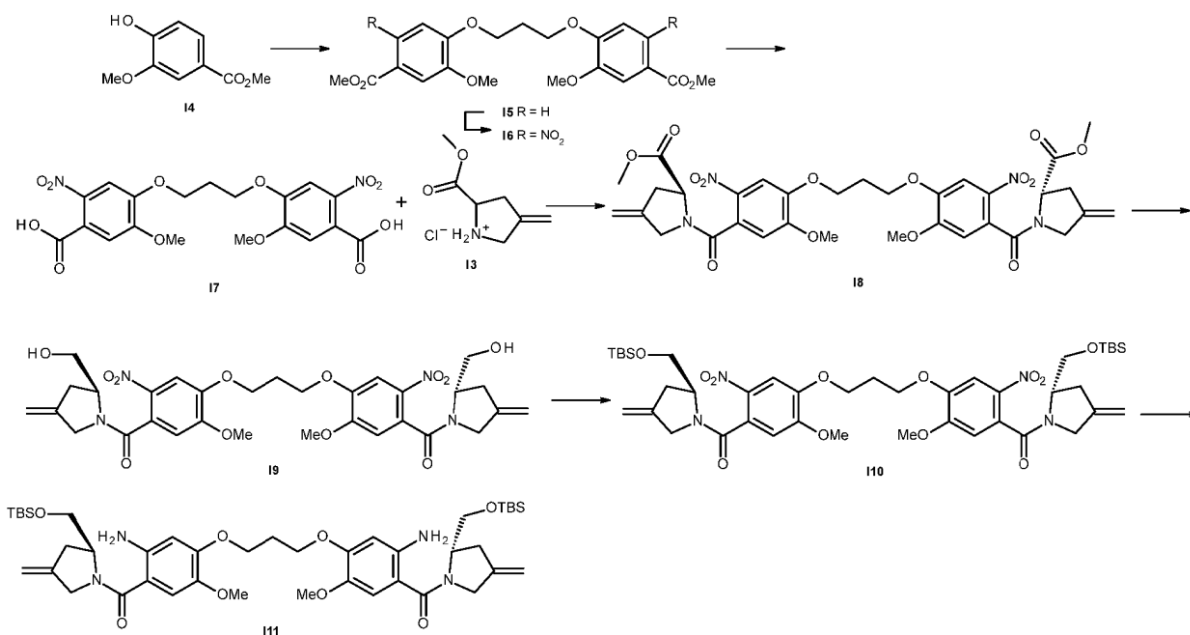
Se obtuvo un derivado de prolina (I1) comercialmente disponible de Omegachem.

5 (i) 4-metilenopirrolidina-1,2-dicarboxilato de 2-metilo de (S)-1-terc-butilo (I2)

Se agregó carbonato de potasio (19,92 g, 14 mmol, 3,0 eq.) a una solución agitada de ácido carboxílico I1 (10,92 g, 48 mmol, 1,0 eq.) en DMF (270 ml). La suspensión blanca resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, punto en el cual se agregó yodometano (21,48 g, 9,5 ml, 151 mmol, 3,15 eq.). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 días. Se quitó el DMF mediante evaporación rotatoria bajo presión reducida para proporcionar un residuo amarillo que se dividió entre etilacetato y agua. La capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con etilacetato. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera y se secaron sobre sulfato de magnesio. Se retiró el etilacetato mediante evaporación rotatoria bajo presión reducida para proporcionar el producto bruto como un aceite amarillo. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida [85 % de n-hexano/15 % de etilacetato] para proporcionar el producto como un aceite incoloro (10,74 g, 93 %).

(ii) Cloruro de (S)-2-(metoxicarbonil)-4-metilenopirrolidinio (I3)

Se agregó una solución de ácido clorhídrico 4 M en dioxano (63 ml, 254,4 mmol, 4,5 eq.) al fragmento I2 del anillo C protegido por Boc (13,67 g, 56,6 mmol, 1,0 eq.) a temperatura ambiente. Se observó efervescencia, lo que indica que se liberó CO₂ y se quitó el grupo Boc. El producto se precipitó como un sólido blanco y se agregó dioxano adicional para facilitar la agitación de la mezcla de reacción se dejó agitar durante una hora y luego se diluyó con dietil éter. El producto precipitado se recolectó mediante filtración al vacío y se lavó con dietil éter adicional. El secado con aire proporcionó el producto deseado como un polvo blanco (9,42 g, 94 %).

(b) ((Propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2-amino-5-metoxi-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidin-1-il)metanona) (I11)

30 (i) 1',3'-Bis[2-metoxi-4-(metoxicarbonil)fenoxi]propano (I5)

Se agregó azodicarboxilato de diisopropilo (71,3 ml, 73,2 g, 362 mmol) en gotas durante un período de 60 min a una solución con agitación suspendida de metil vanilato I4 (60 g, 329 mmol) y Ph₃P (129,4 g, 494 mmol) en THF anhidro

(800 ml) a 0-5 °C (hielo/acetona) bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó agitar a 0-5 °C durante 1 h adicional luego de cuyo tiempo se agregó una solución de 1,3-propanodiol (11,4 ml, 120 g, 158 mmol) en THF (12 ml) en gotas durante un período de 20 minutos. La mezcla de reacción se dejó entibiar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 5 días. El precipitado blanco resultante I3 se recolectó mediante filtración al vacío, se lavó con THF y se secó en un desecador de vacío hasta lograr un peso constante. Proporcionar = 54,68 (84 % en función de 1,3-propanodiol). Datos analíticos: Pureza satisfactoria mediante LC/MS 3,20 min (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 427 ([M + Na]⁺, 10); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,64 (dd, 2H, J = 1,8, 8,3 Hz), 7,54 (d, 2H, J = 1,8 Hz), 6,93 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 4,30 (t, 4H, J = 6,1 Hz), 3,90 (s, 6H), 3,89 (s, 6H), 2,40 (p, 2H, J = 6,0 Hz).

10 (ii) 1',3'-Bis[2-metoxi-4-(metoxycarbonil)-5-nitrofenoxi]propano (I6)

Se agregó Cu(NO₃)₂·3H₂O sólido (81,54 g, 337,5 mmol) lentamente a una suspensión con agitación suspendida del bis-éster I5 (54,68 g, 135 mmol) en anhídrido acético (650 ml) a 0-5 °C (hielo/acetona). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 1 h a 0-5 °C y luego se dejó entibiar hasta temperatura ambiente. Se observó una exotermia suave (c. 40-50 °C), acompañada por un espesamiento de la mezcla y se observó la evolución de NO₂ en esta etapa. Se agregó anhídrido acético adicional (300 ml) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en hielo (~1,5 L), se agitó y se dejó regresar a temperatura ambiente. El precipitado amarillo resultante se recolectó mediante filtración al vacío y se secó en un desecador para proporcionar el compuesto de bis-nitro deseado I6 como un sólido amarillo. Rendimiento = 66,7 g (100 %). Datos analíticos: Pureza satisfactoria por LC/MS 3,25 min (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 517 ([M + Na]⁺, 40); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 5 7,49 (s, 2H), 7,06 (s, 2H), 4,32 (t, 4H, J = 6,0 Hz), 3,95 (s, 6H), 3,90 (s, 6H), 2,45-2,40 (m, 2H). Ver ref Thurston 1996.

(iii) 1',3'-bis(4-carboxi-2-metoxi-5-nitrofenoxi)propano (I7)

25 Una suspensión de metil éster I6 (66,7 g, 135 mmol) en THF (700 ml) se trató con NaOH 1 N (700 ml) y la mezcla de reacción se dejó agitar vigorosamente a temperatura ambiente. Luego de 4 días de agitación, la suspensión se volvió una solución de color oscuro que se sometió a evaporación giratoria bajo presión reducida para eliminar el THF. El residuo acuoso resultante se acidificó hasta pH 1 con HCl concentrado y el precipitado incoloro I7 se recolectó y se secó profundamente en un horno de vacío (50 °C). Rendimiento = 54,5 g (87 %). Datos analíticos: Pureza satisfactoria por CL/EM 2,65 min (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 489 ([M + Na]⁺, 30); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 5 7,62 (s, 2H), 7,30 (s, 2H), 4,29 (t, 4H, J = 6,0 Hz), 3,85 (s, 6H), 2,30-2,26 (m, 2H).

(iv) 1,1'-(4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitrobenzoi))((2S,2'S)-bis(4-metilenopirrolidina-2-carboxilato) de dimetilo (I8)

35 Se agregó una cantidad catalítica de DMF anhidro (2,4 ml) a una suspensión agitada de cloruro de oxalilo (14,7 g, 9,8 ml, 115,8 mmol, 3 eq.) y un núcleo de dímero I7 (18 g, 38,6 mmol, 1 eq.) en DCM anhidro (500 ml) a temperatura ambiente. Se observó efervescencia vigorosa luego de que se añadió DMF y la mezcla de reacción se dejó agitar por 18 horas en un matraz de fondo redondo que contenía un tubo de secado para cloruro de calcio. La solución resultante transparente se evaporó bajo presión reducida y el sólido se trituró con éter. El producto sólido se recolectó mediante filtración al vacío, se lavó con éter adicional y se secó al vacío a 40 °C durante 1,5 h. Este sólido se agregó luego en partes a una suspensión del anillo C 3 (15,1 g, 84,9 mmol, 2,2 eq.) y TEA (19,5 g, 27 ml, 119,6 mmol, 5 eq.) en DCM seco (375 ml), lo que mantuvo la temperatura entre -40 y -50 °C con la ayuda de un baño de hielo/acetónitrilo. La mezcla de reacción se dejó agitar a -40 °C durante 1 h y luego se dejó entibiar a temperatura ambiente, hasta el punto en el que la CLEM indicó el consumo total del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con DCM adicional y se lavó secuencialmente con ácido clorhídrico acuoso (1 M, 2 x 200 ml), bicarbonato de sodio saturado acuoso (2 x 250 ml), agua (250 ml), salmuera (250 ml), se secaron (MgSO₄). Se quitó el DCM mediante evaporación rotatoria bajo presión reducida para proporcionar el producto como una espuma amarilla (25,72 g, 94 %). Datos analíticos: TA 1,59 min; MS (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 713 ([M + H]⁺, 100).

50 (v) ((Propano-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(hidroximetil)-4-metilenpirrolidin-1-il)metanona) (I9)

55 Se agregó borohidruro de litio sólido (3,18 g, 146 mmol, 3 eq.) en una parte a una solución del éster I8 (34,72 g, 48,7 mmol, 1 eq.) en THF seco (350 ml), en una atmósfera de nitrógeno a 0 °C (baño de hielo). La mezcla de reacción se dejó agitar a 0 °C por 30 minutos y luego se dejó entibiar a temperatura ambiente, hasta el punto en que se observó la precipitación de una goma naranja. La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente por 2 horas adicionales y luego se enfrió en un baño de hielo y se trató con agua para proporcionar una suspensión amarilla. Se agregó cuidadosamente ácido clorhídrico (1 M) hasta que cesó la efervescencia. La mezcla de reacción se extrajo con etilacetato (x 4) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (x 1), salmuera (x 1) y se secó (MgSO₄). Se eliminó etilacetato mediante la evaporación giratoria bajo presión reducida para proporcionar una espuma amarilla. Se obtuvo el producto como una espuma amarillo pálido (23,1 g, 72 %) mediante purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [elución de gradiente de DCM/MeOH al 0 % a 5 % en incrementos de 1 %]. Datos analíticos: TA 1,23 min; MS (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 657 ([M + H]⁺, 100).

65

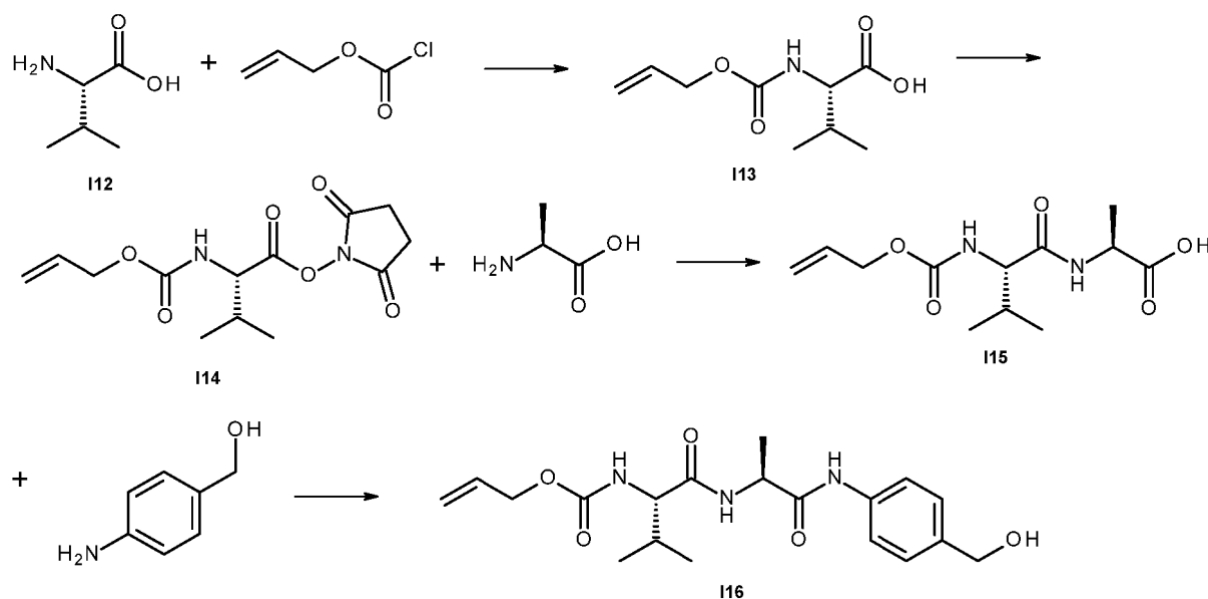
(vi) ((Propano-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidin-1-il)metanona) (I10)

Una solución del bis-alcohol I9 (10 g, 15,2 mmol, 1 eq.), t-butildimetilsililcloruro (5,97 g, 39,6 mmol, 2,6 eq.) e imidazol (5,38 g, 79 mmol, 5,2 eq.) en DMF seco (80 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (500 ml) para proporcionar un precipitado amarillo. La mezcla se extrajo con DCM (4 x 100 ml) y los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secó (MgSO₄) y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar un aceite amarillo viscoso. La purificación mediante cromatografía en columna [biotage isolera, elución de gradiente hexano al 60 %/EtOAc al 100 %, 8 volúmenes de columna 100 g de cartucho snap ultra®] proporciona el producto como una espuma amarilla (11,8 g, 88 %). Datos analíticos: TA 2,20 min; MS (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 885 ([M + H]⁺, 100), 907 ([M + Na]⁺, 50)

(vii) ((Propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2-amino-5-metoxi-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidin-1-il)metanona) (I11)

Se activó polvo de cinc (31,9 g, 488 mmol, 40 eq.) mediante agitación/sonificación con HCl 1 M durante 10 min. El cinc se filtró mediante lavado con HCl 1 M, agua (x 3) y MeOH (x 2). El cinc activado se agregó a una solución del compuesto nitro-TBS I10 (10,8 g, 12,2 mmol, 1 eq.) en MeOH (88 ml) y una solución de 5 % de ácido fórmico/MeOH (440 ml). La temperatura aumentó hasta 37 °C y la mezcla de reacción cambió de una solución amarilla a incolora. Una vez que la exotermia disminuyó (20 min), la reacción mostró completarse mediante CLEM. Se filtró la mezcla de reacción a través de un lavado de célite con EtOAc. La parte de EtOAc se lavó con una solución de bicarbonato saturada (x 4) [¡cuidado efervescencia!], agua (x 1), salmuera (x 1), se secó (MgSO₄) y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar un sólido amarillo. La purificación por cromatografía en columna ultrarrápida [n-hexanos/EtOAc 50/50 v/v con respecto a EtOAc 100 % en incrementos de 10 %] proporcionó el producto como una espuma amarilla (9,5 g, 86 %). Datos analíticos: TA 2,12 min; MS (ES⁺) m/z (intensidad relativa) 825 ([M + H]⁺, 60), 847 ([M + Na]⁺, 30)

(c) Aloc-Val-Ala-PABOH (I16)



(i) Aloc-Val-OH (I13)

Se agregó cloroformato de alilo (41 g, 36,2 ml, 0,34 mol, 1,2 eq.) en gotas a una solución agitada de L-valina I12 (33,25 g, 0,28 mol, 1 eq.) y el carbonato de potasio (58,9 g, 0,426 mol, 1,5 eq.) en agua (650 ml) y THF (650 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 h. El THF se evaporó bajo presión reducida y la solución restante se extrajo con dietil éter (o MTBE) (x 2). La parte acuosa se acidificó hasta pH 2 con HCl conc. y se extrajo con el DCM (x 3). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (x 1), se secaron (MgSO₄) y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar un aceite incoloro (57,1 g). Esto se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

(ii) Aloc-Val-OSu (I14)

A una solución agitada del compuesto I13 (57,1 g, 0,28 mol, 1 eq.) y N-hidroxisuccinimida (32,68 g, 0,28 mol, 1 eq.) en THF seco (800 ml) se le agregó dicitohexilcarbodiimida (58,6 g, 0,28 mol, 1 eq.). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 18 h. Se filtró la mezcla de reacción. El sólido se lavó con THF y el filtrado combinado se concentró bajo presión reducida. El residuo aceite/sólido se redisolvió en DCM y se dejó reposar a 0 °C durante 30 min. La suspensión se filtró mediante lavado con DCM frío. La evaporación del filtrado bajo presión reducida

proporcionó el éster de succinimida como un sólido blanco que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

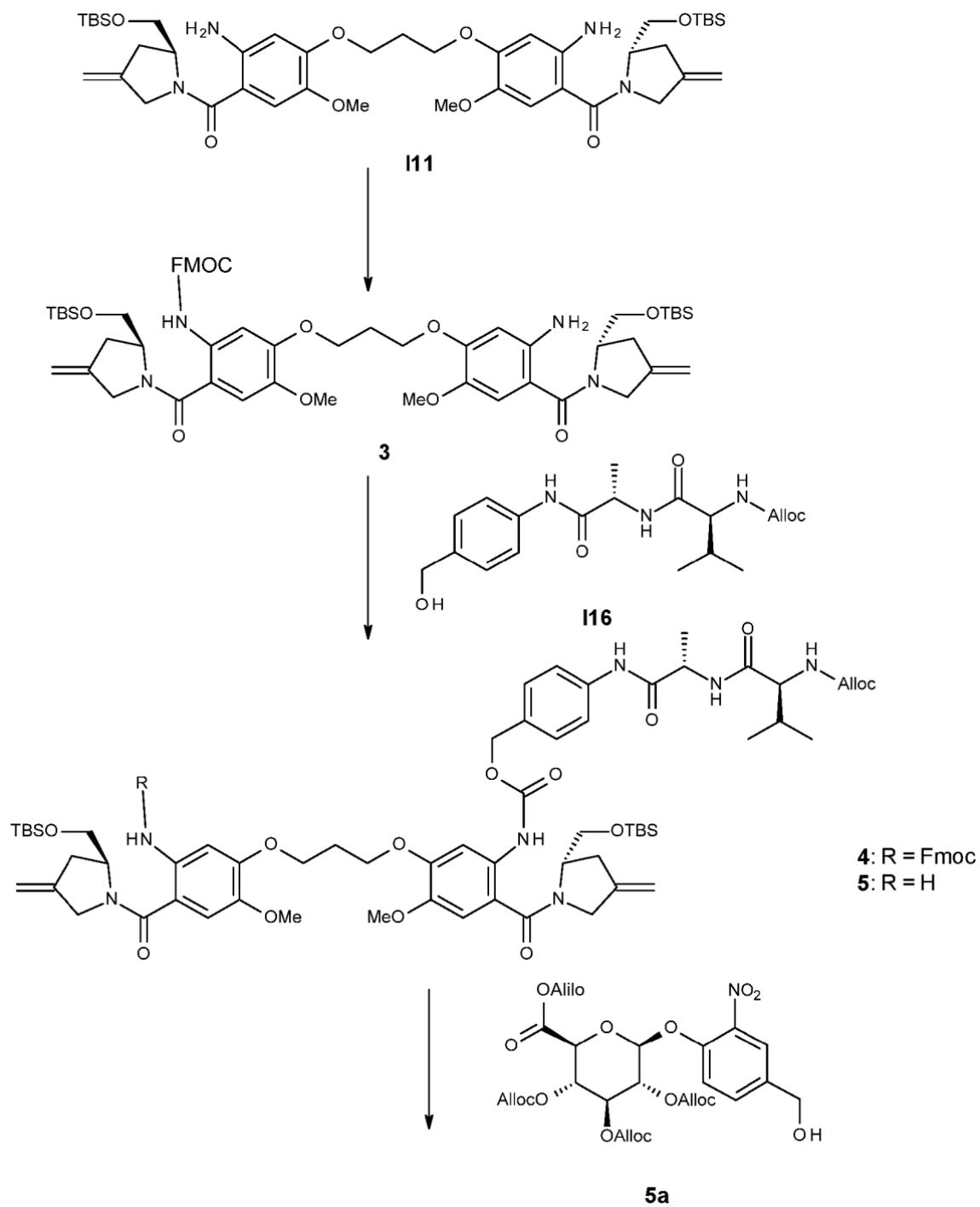
(iii) Alloc-Val-Ala-OH (I15)

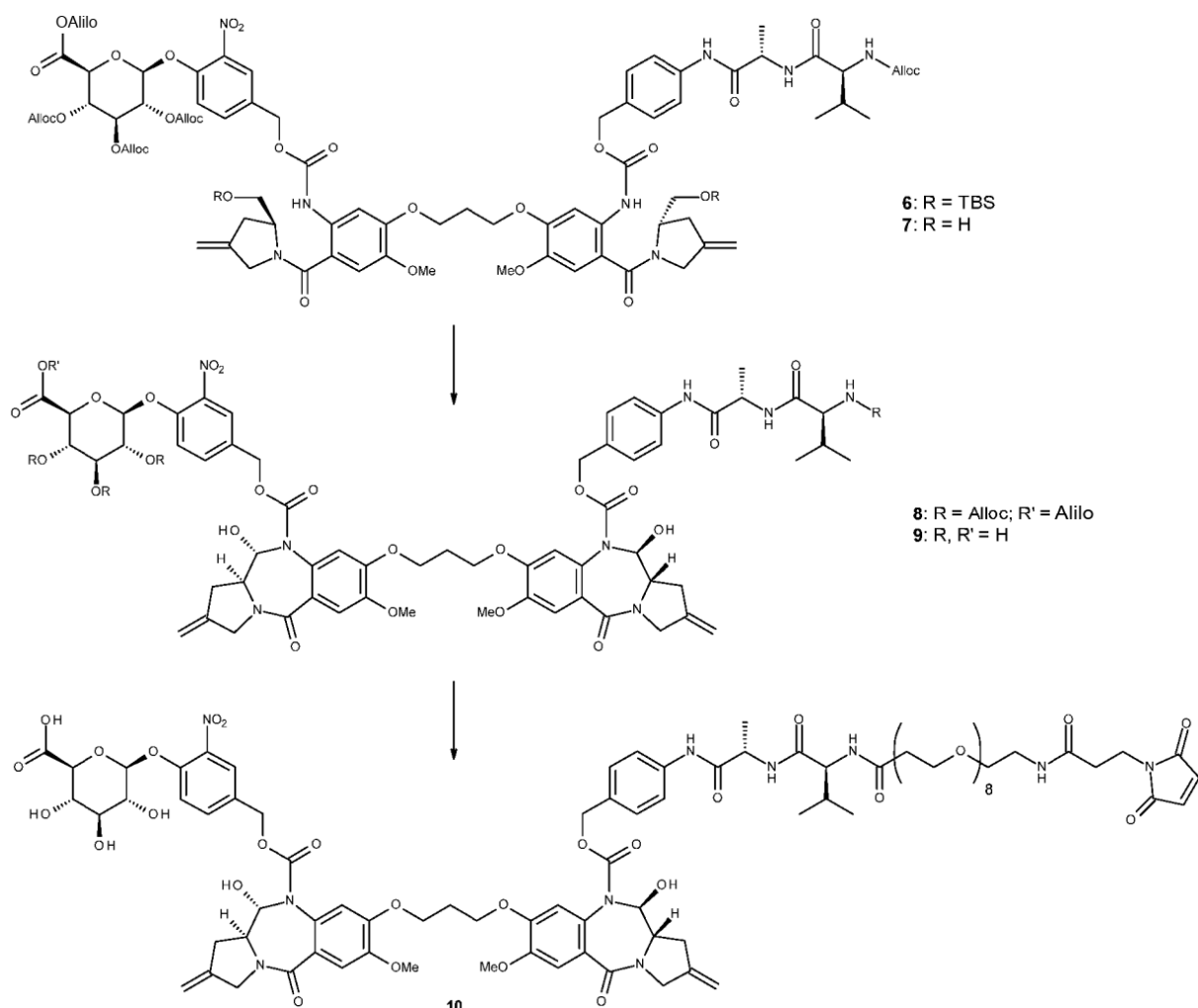
- 5 Se agregó una solución de Alloc-Val-OSu **I14** (11,67 g, 39,0 mmol, 1 eq.) en THF (50 ml) a una solución de H-Ala-OH (3,66 g, 41,08 mmol, 1,05 eq.) y NaHCO₃ (3,61 g, 43,03 mmol, 1,1 eq.) en THF (100 ml) y H₂O (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 h y el THF se evaporó bajo presión reducida. El pH se ajustó hasta 3-4 con ácido cítrico para precipitar una goma blanca. Esto se extrajo con etilacetato (6 x 150 ml) y los extractos combinados se lavaron con H₂O (200 ml), salmuera (200 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar un sólido blanco. La trituración con dietil éter (xs) proporcionó el producto puro como un polvo blanco (7,93 g, 74 %). Datos analíticos: TA 2,17 min; MS (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 295 ([M + Na]⁺, 63), 273 ([M + 1]⁺, 60).

(iv) Alloc-Val-Ala-PABOH (I16)

- 15 Se agregó EEDQ (4,79 g, 19,3 mmol, 1,05 eq.) a una solución de alcohol p-aminobencílico (2,38 g, 19,3 mmol, 1,05 eq.) y Alloc-Val-Ala-OH **I15** (5,02 g, 18,4 mmol, 1,0 eq) en THF seco (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 h. El solvente se evaporó bajo presión reducida para proporcionar un sólido marrón pálido. El sólido se trituró con dietil éter y se filtró mediante lavado con un exceso de dietil éter. Esto proporcionó el producto como un sólido blanco (6,2 g, 89 %). Datos analíticos: TA 2,50 min; MS (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 400,6 ([M + Na]⁺, 50), 378,6 ([M + 1]⁺, 60).

Ejemplo 1





5 (a) 5-(3-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (3)

Se agregó FmocCl (1,97 g, 7,63 mmol) a una mezcla agitada de bis-anilina I11 (6,99 g, 8,48 mmol) y Na₂CO₃ (2,25 g, 21,2 mmol) en THF (65 ml) y H₂O (65 ml). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 horas donde el análisis mediante LC/MS reveló el producto de Fmoc 3 mono deseado en un tiempo de retención de 2,34 minutos, I % = 40 ES+ m/z 1069 [M+ Na]⁺, 1047 [M+ H]⁺, junto con material de partida sin reacción en el tiempo de retención 2,15 minutos, I % = 12 y material de *bis*-Fmoc en el tiempo de retención 2,50 minutos, I % = 45, ES+ m/z 1291 [M+ Na]⁺, 1269 [M+ H]⁺. Las capas se separaron y la fase acuosa extraída con DCM (2 x 20 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (30 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para brindar el producto bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 50 g, 100 ml por minuto) proporcionó el producto 3 de Fmoc mono puro como una espuma anaranjada (2,67 g, 39 % de rendimiento en función de FmocCl, elución a 50 % hexano/EtOAc), bis-anilina 2 sin reacción (1,78 g, elución a 100 % de EtOAc) y bis-Fmoc (3,28 g, elución a 70 % de hexano/EtOAc).

20 (b) 5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (4)

Se agregó trifosgeno (26 mg, 86 μmol) a una solución agitada del producto de Fmoc mono 3 (250 mg, 0,24 mmol) y TEA (73 μl, 53 mg, 0,53 mmol) en DCM seco (10 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestreada en MeOH para proporcionar carbamato de metilo, tiempo de retención de 2,39 minutos, ES+ m/z 1127 [M+ Na]⁺, 1105 [M+ H]⁺). La mezcla se trató con TEA adicional (50 μl, 36 mg, 0,36 mmol) seguido de la adición del enlazador I16 (90 mg, 0,24 mmol). Luego de 4 horas con agitación en argón, el LC/MS reveló una conversión satisfactoria a carbamato 4 en el tiempo de retención de 2,34 minutos, ES+ m/z 1472 [M+ Na]⁺, 1451 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (60 ml) y se lavó NH₄Cl saturado acuoso (2 x 20 ml), H₂O (20 ml), salmuera (30 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío

para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 25 g, 75 ml por minuto) proporcionó el carbamato puro 4 (elución en 28 % hexanos/EtOAc) como una espuma amarilla (257 mg, 74 % de rendimiento).

5 (c) (5-(3-(5-amino-4-(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de 4-(((S)-2-(((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encilo) (5)

10 Se agregó dimetilamina (16,5 ml de una solución 2,0 M en THF, 33,0 mmol) a una solución agitada del compuesto protegido de Fmoc 4 (2,39 g, 1,65 mmol) en THF (46 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, el análisis de LC/MS reveló una terminación de la reacción con el producto deseado en el tiempo de retención de 2,17 minutos, ES+ m/z 1250 [M+ Na]+, 1228 [M+ H]+, junto con el subproducto de escisión de Fmoc en el tiempo de retención de 1,92 minutos y su aducto de DMA en el tiempo de retención de 1,10 minutos. La mezcla se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto que fue purificado posteriormente mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) para proporcionar la anilina pura 5 (elución a 100 % de EtOAc) como una espuma anaranjada (1,87 g, 92 % de rendimiento).

20 (d) (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(3-(5-(((4-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato de alilo (6)

25 Se agregó trifosgeno (161 mg, 0,54 mmol) a una solución agitada de anilina 5 (1,85 g, 1,51 mmol) y piridina (269 µl, 263 mg, 3,32 mmol) en DCM seco (20 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestrada en MeOH para proporcionar carbamato de metilo, tiempo de retención de 2,21 minutos, ES+ m/z 1308 [M+ Na]+, 1286 [M+ H]+). La mezcla se trató con piridina adicional (183 µl, 179 mg, 2,27 mmol) y dilaurato de dibutiastaño (179 µl, 191 mg, 0,30 mmol) seguido de la adición del enlazador 5a (960 mg, 1,51 mmol). Luego de 20 horas con agitación en argón, el LC/MS reveló una conversión satisfactoria a carbamato 6 (tiempo de retención) de 2,25 minutos, ES+ m/z 1915 [M+ Na]+, 1892 [M+ H]+. La mezcla se diluyó con DCM (60 ml) y se lavó NH₄Cl saturado (2 x 20 ml), H₂O (20 ml), salmuera (30 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el carbamato puro 6 (elución en 42 % hexanos/EtOAc) como una espuma amarilla (2,01 g, 70 % de rendimiento).

35 (e) (2S, 3S, 4S, 5R, 6S)-6-(4-(((5-(3-(5-(((4-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-(((S)-2-((hidroximetil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-(((S)-2-((hidroximetil)-4-metilenopirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato de alilo (7)

40 Se agregó ácido acético glacial (18 ml) a una solución agitada del compuesto protegido por TBS 6 (2,12 g, 1,12 mmol) en THF (6 ml) y H₂O (6 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 18 horas a temperatura ambiente tiempo después del cual el análisis de LC/MS reveló una finalización de la reacción con el producto deseado observado en el tiempo de retención 1,79 minutos ES+ m/z 1663 [M+ H]+, 1686 [M+ Na]+. La mezcla de reacción se agregó en gotas a una solución saturada enfriada (0-5 °C) de NaHCO₃ (300 ml). La solución neutra se dejó entibiar hasta temperatura ambiente y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml), las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (50 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para brindar el producto bruto. La purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó bi-alcohol 7 (elución en 93 % DCM/MeOH) como una espuma amarillenta (1,43 g, 77 % de rendimiento).

50 (f) (11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10(5H)-carboxilato de 4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-(((aliloxi)carbonil)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-3-nitrobencilo) (8)

60 Se agregó IBX al 45 % (264 mg, 0,43 mmol) a una solución agitada del bis-OH 7 (300 mg, 0,18 mmol) en DMSO seco (5 ml). La mezcla se calentó hasta 30 °C bajo una atmósfera de argón y el progreso de la reacción se monitoreó mediante LC/MS. Luego de 24 horas de agitación, se agregó IBX (22 mg, 36 µmol) y la mezcla se agitó durante 24 horas adicionales. En este punto el análisis mediante LC/MS reveló de forma predominante un pico único correspondiente a un producto deseado en el tiempo de retención 1,78 minutos, ES+ m/z 1682 [M+ Na]+. La mezcla de reacción se vertió en agua (40 ml), se filtró y el precipitado se recolectó, se lavó con H₂O (50 ml) y el filtrado se apartó. El residuo (precipitado) se lavó con DCM (120 ml) y el precipitado no disuelto restante se lavó con NaHCO₃ (60 ml) saturado acuoso. Los filtrados combinados se transfirieron a un embudo individual y las capas se separaron. 65 La fase acuosa se extrajo con DCM (2 x 20 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ (2 x 50 ml) y salmuera (60 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto. La

purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 25 g, 75 ml por minuto) proporcionó el producto ciclado 8 (elución en 94,5 % DCM/MeOH) como una espuma blanca (261 mg, 87 % de rendimiento).

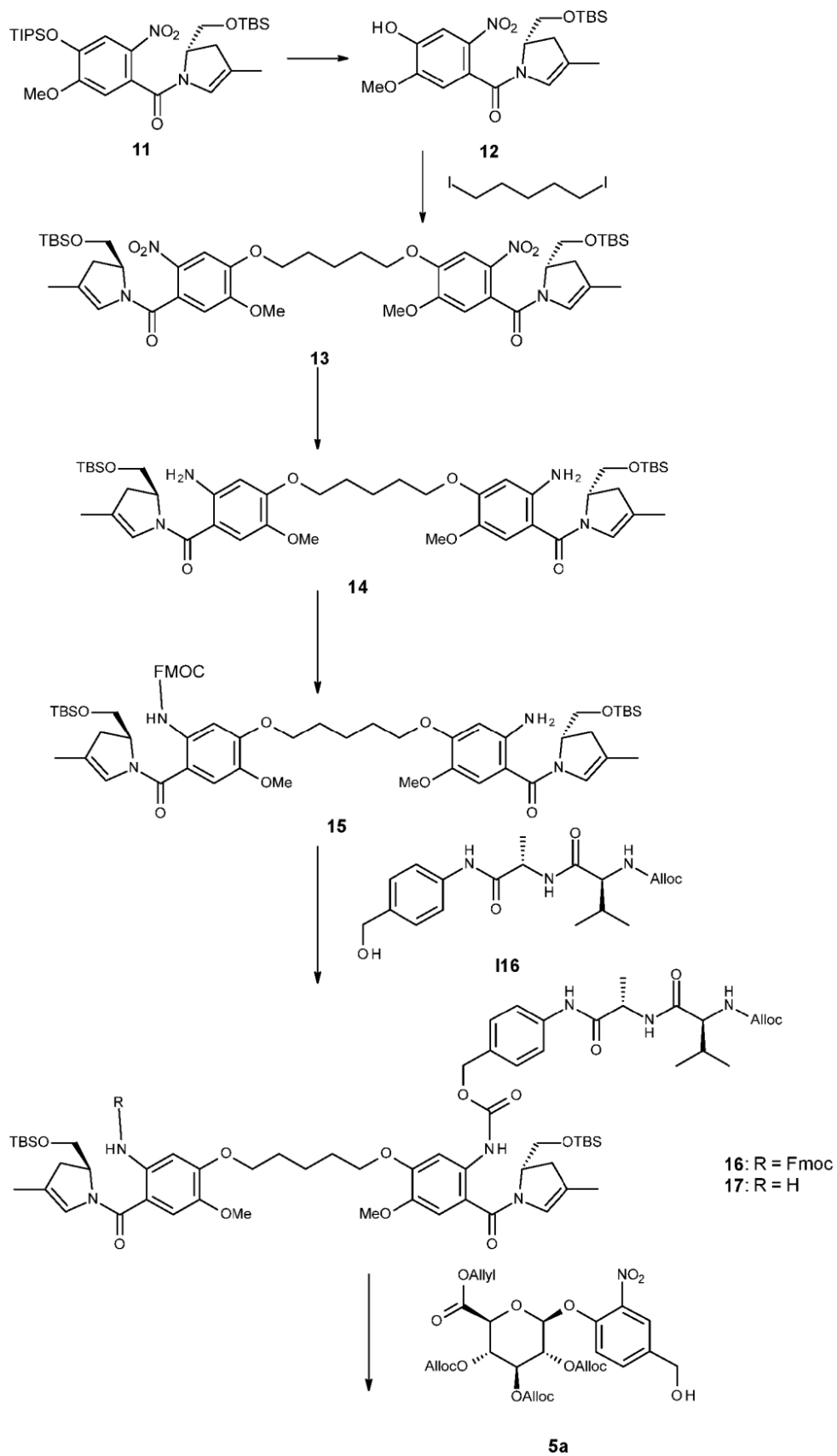
5 (g) *Ácido ((2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (9)*

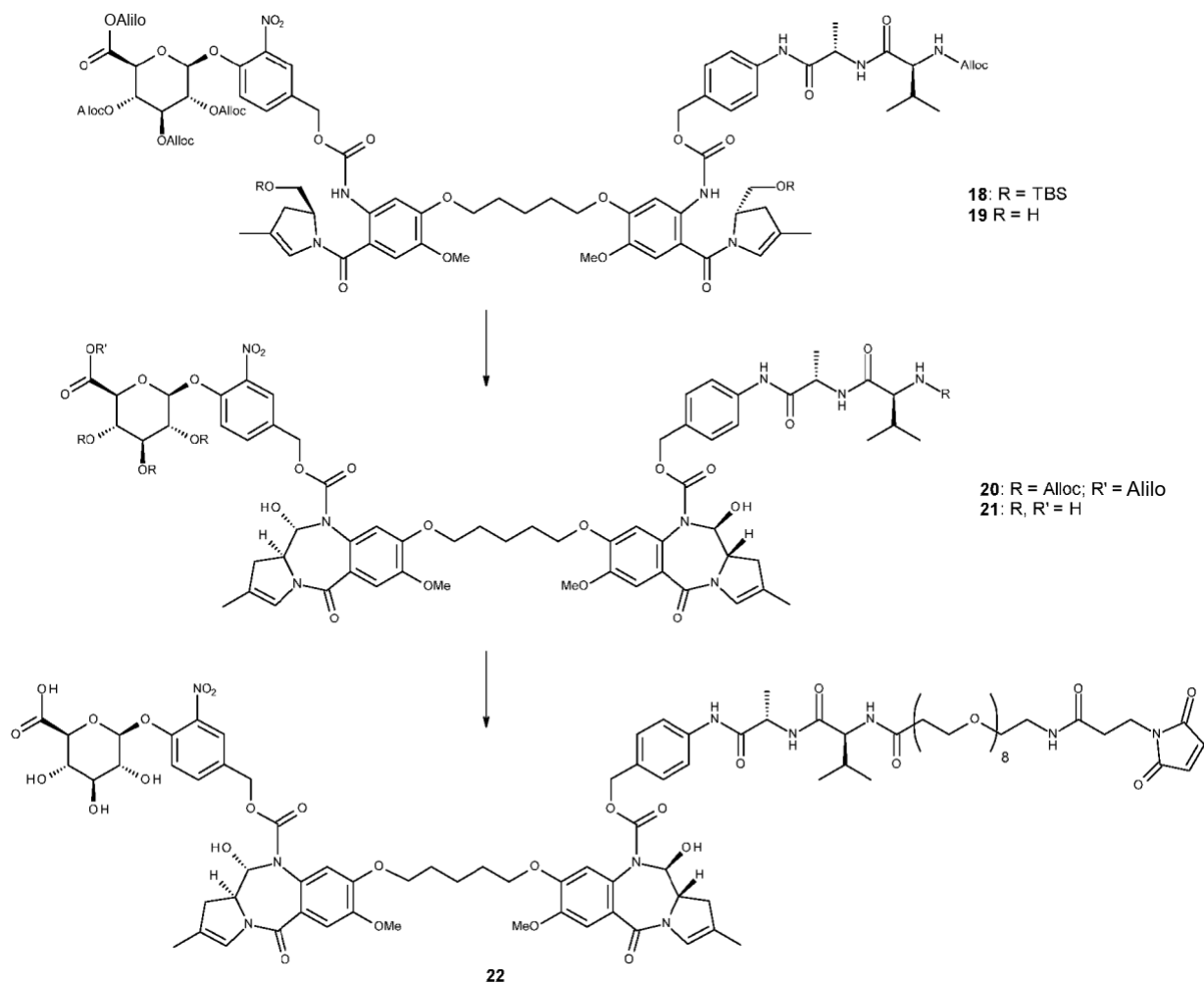
10 Se agregó Pd(PPh₃)₄ (18,2 mg, 15,7 μmol) a una solución agitada de pirrolidina (72 μmol, 62 mg, 0,87 mmol) y el compuesto Aloc/alilo 8 (261 mg 0,16 mmol) en DCM seco (3 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar bajo una atmósfera de argón donde comenzó a formarse un precipitado. Luego de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente el análisis mediante LC/MS reveló una terminación de la reacción con un producto deseado observado en el tiempo de retención 1,13 minutos ES+ m/z 1284 [M+ H]. El solvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo resultante se trituró con dietil éter seguido de evaporación adicional al vacío para proporcionar la amina en bruto 9 como un sólido que se utilizó en el siguiente paso sin purificación o análisis adicional.

20 (h) *Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrolol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (10)*

25 Se agregó una solución de éster MAL-dPEG@8-TFP (132 mg, 0,18 mmol) en DCM seco (7 ml) a una muestra agitada de la amina 9 (202 mg, 0,16 mmol), piridina (24 μl, 23 mg, 0,3 mmol) y DMF (0,25 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar en argón durante 20 horas y comenzó a oscurecerse en color con el tiempo. El análisis mediante LC/MS reveló la formación de un producto deseado en el tiempo de retención 1,38 minutos , ES+ m/z 1857 [M+ H]⁺, 1880 [M+ Na]⁺, junto con una amina sin reacción en el tiempo de retención 1,13 minutos. Se agregó éster de MAL-dPEG@8-TFP adicional (66 mg, 0,09 mmol), piridina (12 μl, 11 mg, 0,15 mmol) y DCM (3 ml) y a mezcla se dejó agitar durante tres días adicionales. En este punto se formó una cantidad satisfactoria de producto deseado luego del análisis mediante LC/MS y el solvente se retiró mediante evaporación al vacío. El producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la maleimida 10 como un sólido blanco (55 mg, 19 %): LC/MS (ejecución de 15 minutos), tiempo de retención 5,93 minutos, ES+ m/z 1857 [M+ H]⁺, 1880 [M+ Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 10,0 (br s, 2H), 8,25–8,12 (m, 1H), 7,99 (t, 1H, J = 5,7 Hz), 7,87 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,73 (br s, 1H), 7,62–7,48 (m, 3H), 7,40 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,22–7,11 (m, 2H), 7,06 (s, 2H), 7,00 (s, 2H), 6,87 (s, 2H), 6,84–6,76 (m, 1H), 6,68–6,52 (m, 2H), 5,45–5,30 (m, 3H), 5,25–5,01 (m, 9H), 4,97–4,82 (m, 2H), 4,42–4,34 (m, 1H), 4,24–4,17 (m, 1H), 4,16–3,92 (m, 8H), 3,87–3,72 (m, 6H), 3,60 (t, 4H, J = 7,2 Hz), 3,54–3,42 (m, 30H), 3,39–3,20 (m, 5H), 3,18–3,12 (m, 2H), 2,95–2,82 (m, 2H), 2,57–2,35 (m, 4H), 2,33 (t, 2H, J = 7,4 Hz), 2,24–2,13 (m, 2H), 2,03–1,90 (m, 1H), 1,30 (d, 1H, J = 7,0 Hz), 0,87 (d, 3H, J = 6,7 Hz), 0,83 (d, 3H, J = 6,7 Hz).

Ejemplo 2





(a) *(S)*-2-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)(4-hidroxi-5-metoxi-2-nitrofenil)metanona (12)

5

Se agregó LiOAc (2,11 g, 20,7 mmol) a una solución agitada del compuesto de TIPS 11 (12 g, 20,7 mmol) en DMF (67 ml) y H₂O (3 ml) a temperatura ambiente. Se observó un cambio de color de amarillo a rojo. Luego de 2 horas de agitación a temperatura ambiente el análisis mediante LC/MS reveló un conversión completa al producto deseado en el tiempo de retención 1,83 minutos, ES+ m/z 445 [M+ Na]⁺, 423 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con H₂O (300 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 150 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con ácido cítrico al 10 % p/v (2 x 200 ml), H₂O (200 ml), salmuera (200 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto en bruto 12 como un sólido amarillo (8,74 g, 100 % de rendimiento). Pureza satisfactoria, por lo cual el material se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

10

(b) ((*Pentano*-1,5--diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenileno))bis(((*S*)-2-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metanona) (13)

15

Se agregó 1,5-diiodopentano (1,54 ml, 3,35 g, 10,4 mmol) a una solución agitada de fenol 12 (8,74 g, 20,7 mmol), TBAI (750 mg, 2,05 mmol) y K₂CO₃ (3,15 g, 22,8 mmol) en DMF seco (60 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 70 °C y se agitó en una atmósfera de argón durante 16 horas punto en el cual el análisis mediante LC/MS reveló una formación del producto sustancial en el tiempo de retención 2,21 minutos, ES+ m/z 935 [M+ Na]⁺, 913 [M+ H]⁺. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y el DMF se retiró mediante evaporación al vacío. El residuo resultante se redisolvió en EtOAc (200 ml) y la fase acuosa se lavó con agua (3 x 40 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el bis-éter 13 (elución en 60 % hexanos/EtOAc) como una espuma amarilla (6,75 g, 71 % de rendimiento).

20

25

(c) ((*Pentano*-1,5--diilbis(oxi))bis(2-amino-5-metoxi-4,1-fenileno))bis(((*S*)-2-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1*H*-pirrol-1-il)metanona) (14)

30

Se trató polvo de cinc (2,79 g, 42,8 mmol) con HCl (50 ml) 1 N y se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La mezcla se sonificó durante 10 minutos y el cinc activado se recolectó mediante filtración al vacío en un sínter luego se lavó con HCL 1 N (25 ml), H₂O (20 ml), MeOH (20 ml) y se secó al vacío en la almohadilla de filtración de sínter. El cinc activado se agregó a una solución agitada vigorosamente del compuesto bis-nitro 13 (974 mg, 1,07 mmol) en MeOH (15 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató en gotas con una solución de 5 % v/v de HCO₂H en MeOH (20 ml). Se observaron un cambio de color de verde a gris metálico y una exotermia hasta 37 °C. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente punto en el cual el análisis mediante LC/MS reveló una conversión completa al producto deseado en el tiempo de retención 2,19 minutos, ES+ m/z 875 [M+ Na]⁺, 853 [M+ H]⁺. La mezcla se filtró a través de celite® y la almohadilla se lavó con EtOAc (75 ml). El filtrado se lavó con NaHCO₃ (3 x 20 ml) acuoso saturado, salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar la bis-anilina en bruto 14 como una espuma anaranjada oscura (840 mg, 92 % de rendimiento). Pureza satisfactoria, por lo cual el material se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

(d) *(9H-fluoren-9-il)metil(5-((5-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato (15)*

Se agregó FmocCl (1,50 g, 5,93 mmol) a una suspensión agitada de bis-anilina 14 (6,74 g, 7,91 mmol) y Na₂CO₃ (2,10 g, 19,8 mmol) en THF (40 ml) y H₂O (40 ml). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 horas donde el análisis mediante LC/MS reveló un el producto de Fmoc 15 mono deseado en un tiempo de retención de 2,41 minutos, I % = 32 ES+ m/z 1098 [M+ Na]⁺, 1076 [M+ H]⁺, junto con material de partida sin reacción en el tiempo de retención 2,22 minutos, I % = 30 y material de bis-Fmoc en el tiempo de retención 2,60 minutos, I % = 36, ES+ m/z 1321 [M+ Na]⁺, 1298 [M+ H]⁺. La mezcla se dividió entre H₂O (50 ml) y EtOAc (50 ml), las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H₂O (30 ml), salmuera (40 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el producto 15 de Fmoc mono puro como una espuma anaranjada (2,43 g, 38 % de rendimiento en función de FmocCl, elución a 58 % hexanos/EtOAc), bis-anilina 14 sin reacción (3,06 g, elución a 40 % de EtOAc) y bis-Fmoc (2,32 g, elución a 74 % de hexano/EtOAc).

(e) *(9H-fluoren-9-il)metil(5-((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato (16)*

Se agregó trifosgeno (242 mg, 0,81 mmol) a una solución agitada del producto de Fmoc mono 15 (2,43 g, 2,26 mmol) y TEA (692 µl, 502 mg, 4,97 mmol) en DCM seco (30 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestreada en MeOH para proporcionar carbamato de metilo, tiempo de retención de 2,38 minutos, ES+ m/z 1156 [M+ Na]⁺, 1133 [M+ H]⁺). La mezcla se trató con TEA adicional (472 µl, 342 mg, 3,39 mmol) seguido de la adición del enlazador I16 (852 mg, 2,26 mmol). Luego de 3,5 horas con agitación en argón, el LC/MS reveló una conversión satisfactoria a carbamato 16 en el tiempo de retención de 2,33 minutos, ES+ m/z 1501 [M+ Na]⁺, 1479 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó NH₄Cl saturado acuoso (2 x 20 ml), salmuera (30 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el carbamato puro 16 (elución en 46 % hexanos/EtOAc) como una espuma amarilla (2,26 g, 68 % de rendimiento).

(f) *(5-((5-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encilo (17)*

Se agregó dimetilamina (15,0 ml de una solución 2,0 M en THF, 30,6 mmol) a una solución agitada del compuesto protegido de Fmoc 16 (2,26 g, 1,65 mmol) en THF (20 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, el análisis de LC/MS reveló una terminación de la reacción con el producto deseado en el tiempo de retención de 2,17 minutos, ES+ m/z 1279 [M+ Na]⁺, 1257 [M+ H]⁺, junto con el subproducto de escisión de Fmoc en el tiempo de retención de 1,79 minutos y su aducto de DMA en el tiempo de retención de 0,97 minutos. La mezcla se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto que fue purificado posteriormente mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) para proporcionar la anilina pura 17 (elución a 18 % de Hexano/EtOAc) como una espuma anaranjada (1,94 g, 100% de rendimiento).

(g) *Alil(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(5-((5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (18)*

Se agregó trifosgeno (165 mg, 0,55 mmol) a una solución agitada de anilina 17 (1,94 g, 1,54 mmol) y piridina (274 µl, 268 mg, 3,39 mmol) en DCM seco (20 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el

análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestreada en MeOH para proporcionar carbamato de metilo, tiempo de retención de 2,21 minutos, ES+ m/z 1337 [M+ Na]⁺, 1315 [M+ H]⁺). La mezcla se trató con piridina adicional (187 µl, 183 mg, 2,31 mmol) y dilaurato de dibutiastaño (179 µl, 191 mg, 0,30 mmol) seguido de la adición del enlazador 5a (984 mg, 1,54 mmol). Luego de 18 horas con agitación en argón, el LC/MS reveló una conversión satisfactoria a carbamato 18 en el tiempo de retención de 2,23 minutos, ES+ m/z 1942 [M+ Na]⁺, 1920 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (30 ml) y se lavó NH₄Cl saturado (2 x 20 ml), H₂O (20 ml), salmuera (40 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el carbamato puro 18 (elución en 43 % hexanos/EtOAc) como una espuma amarilla (2,17 g, 74 % de rendimiento).

(h) *Alil(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(hidroximetil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrole-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(hidroximetil)-4-metil-2,3-dihidro-1H-pirrole-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamoi)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (19)*

Se agregó ácido acético glacial (18 ml) a una solución agitada del compuesto protegido por TBS **18** (2,17 g, 1,13 mmol) en THF (6 ml) y H₂O (6 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 18 horas a temperatura ambiente tiempo después del cual el análisis de LC/MS reveló una finalización de la reacción con el producto deseado observado en el tiempo de retención 1,82 minutos ES+ m/z 1691 [M+ H]⁺, 1714 [M+ Na]⁺. La mezcla de reacción se agregó en gotas a una solución saturada enfriada (0-5 °C) de NaHCO₃ (300 ml). La solución neutral se dejó entibiar hasta temperatura ambiente y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml), las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para brindar el producto bruto. La purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó bi-alcohol **19** (elución en 96,5 % DCM/MeOH) como una espuma blanca (1,31 g, 69 % de rendimiento).

(i) *4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((aliloxi)carbonil)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-3-nitrobencil(11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10(5H)-carboxilato (20)*

Se agregó 45 % de IBX (269 mg, 0,43 mmol) a un solución agitada del bis-OH **19** (300 mg, 0,18 mmol) en DMSO seco (5 ml). La mezcla se calentó hasta 30 °C bajo una atmósfera de argón y el progreso de la reacción se monitoreó mediante LC/MS. Luego de 24 horas de agitación, se agregó IBX (22 mg, 36 µmol) y la mezcla se agitó durante 24 horas. En este punto el análisis mediante LC/MS reveló la formación del producto en el tiempo de retención 1,79 minutos, ES+ m/z 1710 [M+ Na]⁺. La mezcla de reacción se agregó en gotas a una solución de NaHCO₃ acuosa saturada (100 ml) y se extrajo con DCM (2 x 75 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ saturado acuoso (2 x 20 ml), H₂O (30 ml), salmuera (40 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 25 g, 75 ml por minuto) proporcionó el producto ciclado **11** (elución en 97,4 % DCM/MeOH) como una espuma blanca (136 mg, 46 % de rendimiento).

(j) *Síntesis alternativa de 4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((aliloxi)carbonil)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-3-nitrobencil(11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10(5H)-carboxilato (20)*

Se agregaron TEMPO (6,6 mg, 42 µmol) y DAIB (125 mg, 0,39 mmol) a un solución agitada del bis-OH **19** (300 mg, 0,18 mmol) en DCM seco (15 ml) a temperatura ambiente. La mezcla agitada bajo una atmósfera de argón y el progreso de la reacción se monitoreó mediante LC/MS. Luego de 24 horas de agitación, se agregó TEMPO (6,6 mg, 42 µmol) y DAIB (25 mg, 78 µmol) y la mezcla se agitó durante otras 24 horas. En este punto el análisis mediante LC/MS reveló la formación del producto en el tiempo de retención 1,79 minutos, ES+ m/z 1710 [M+ Na]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó con tiosulfato de sodio acuoso saturado (40 ml), NaHCO₃ (30 ml) saturado acuoso, salmuera (40 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 25 g, 75 ml por minuto) proporcionó el producto ciclado **21** (elución en 96,5 % DCM/MeOH) como una espuma blanca (231 mg, 78 % de rendimiento).

(k) *Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (21)*

Se agregó Pd(PPh₃)₄ (15,8 mg, 13,7 µmol) a una solución agitada de pirrolidina (63 µl, 54 mg, 0,75 mmol) y el compuesto Aloc/alilo **20** (231 mg, 0,14 mmol) en DCM seco (4 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar bajo una atmósfera de argón donde comenzó a formarse un precipitado. Luego de 30 minutos de agitación a temperatura

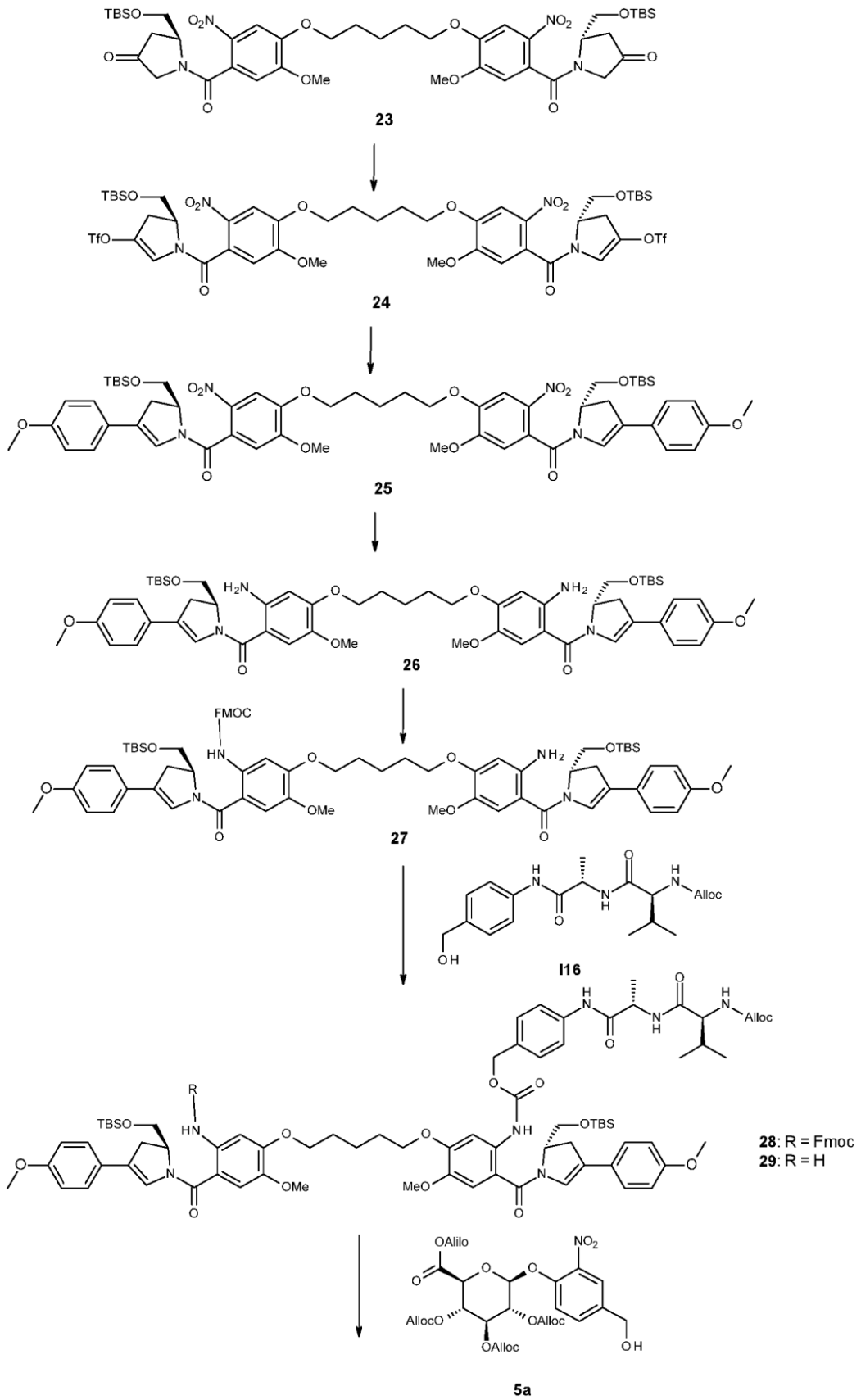
ambiente el análisis mediante LC/MS reveló una terminación de la reacción con un producto deseado observado en el tiempo de retención 1,18 minutos ES+ m/z 1312 [M+ H]⁺. El solvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo resultante se trituró con dietil éter seguido de evaporación adicional al vacío para proporcionar la amina en bruto 12 como un sólido que se utilizó en el siguiente paso sin purificación o análisis adicional.

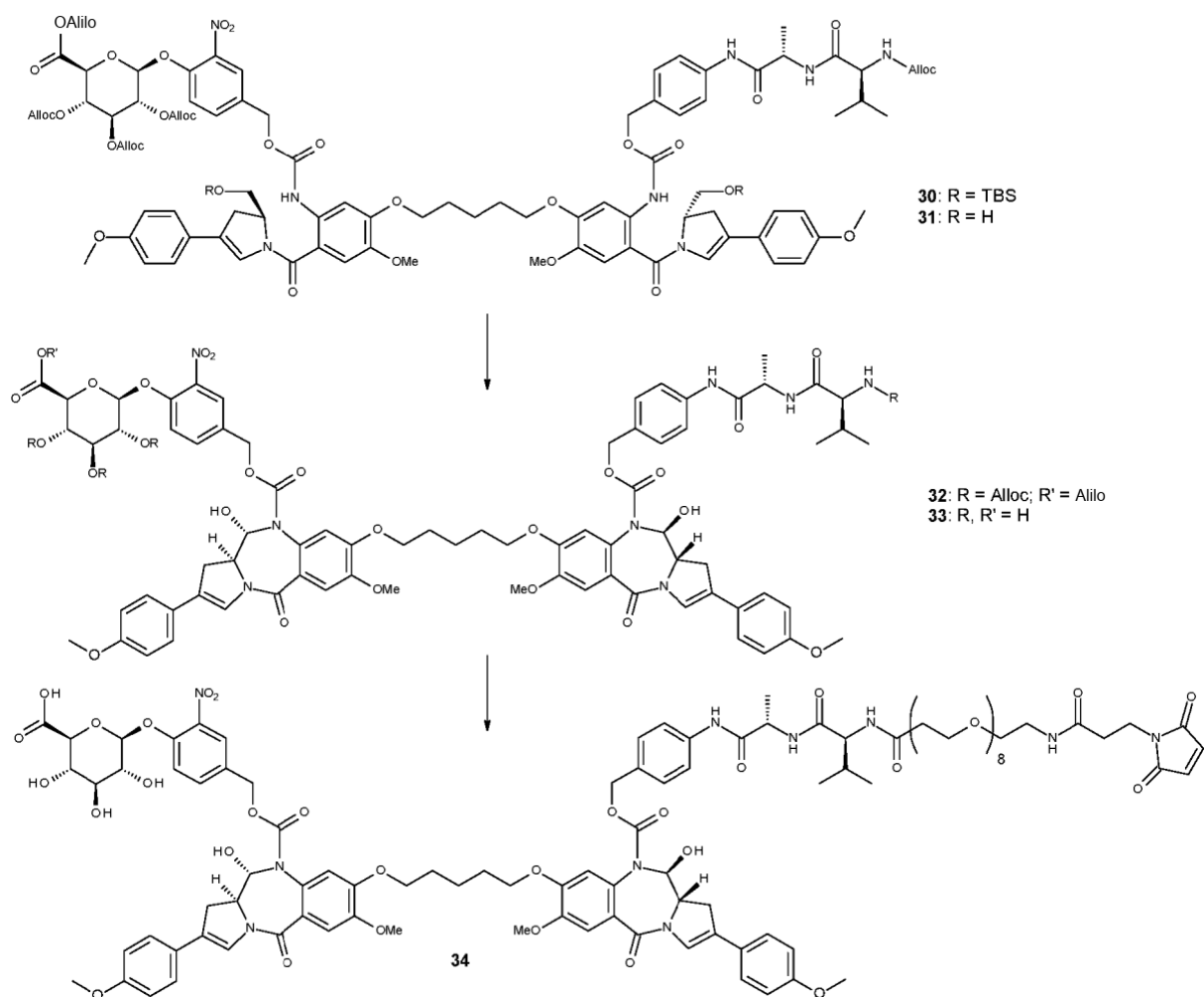
5
 (l) Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxa-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxa-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-
 triazaheptatriacontanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-
 10 pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-
 pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico
 (22)

Se agregó una solución de éster MAL-dPEG@8-TFP (122 mg, 0,16 mmol) en DCM seco (5 ml) a una muestra agitada de la amina 21 (180 mg, 0,16 mmol), piridina (28 µl, 27 mg, 0,34 mmol) y DMF (0,25 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar en argón durante 20 horas y comenzó a oscurecerse en color con el tiempo. El análisis mediante LC/MS reveló la formación de un producto deseado en el tiempo de retención 1,43 minutos, ES- m/z 1884 [M- H]⁻, junto con una amina sin reacción en el tiempo de retención 1,18 minutos. Se agregó éster de MAL-dPEG@8-TFP adicional (66 mg, 0,09 mmol), piridina (12 µl, 11 mg, 0,15 mmol) y DCM (3 ml) y a mezcla se dejó agitar durante tres días adicionales. En este punto se formó una cantidad satisfactoria de producto deseado luego del análisis mediante LC/MS y el solvente se retiró mediante evaporación al vacío. El producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la maleimida 22 como un sólido blanco (55 mg, 19 %): LC/MS (ejecución de 15 minutos), tiempo de retención 5,82 minutos, ES+ m/z 1886 [M+ H]⁺, 1908 [M+ Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, d6-DMSO) δ 9,98 (br s, 2H), 8,25–8,15 (m, 1H), 7,99 (t, 1H, J = 5,7 Hz), 7,87 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,69 (br s, 1H), 7,62–7,48 (m, 3H), 7,37 (d, 1H, J = 8,9 Hz), 7,21–7,09 (m, 2H), 7,04 (s, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,98 (s, 2H), 6,79 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 6,72–6,65 (m, 2H), 6,62–6,58 (m, 2H), 5,63–5,50 (m, 2H), 5,41–5,32 (m, 2H), 5,25–5,05 (m, 4H), 4,93–4,80 (m, 2H), 4,41–4,32 (m, 1H), 4,23–4,16 (m, 1H), 4,00–3,90 (m, 4H), 3,87–3,72 (m, 6H), 3,70–3,60 (m, 2H), 3,58 (t, 4H, J = 7,2 Hz), 3,52–3,43 (m, 28H), 3,39–3,20 (m, 5H), 3,18–3,10 (m, 2H), 2,95–2,82 (m, 2H), 2,53–2,34 (m, 4H), 2,31 (t, 2H, J = 7,3 Hz), 1,99–1,90 (m, 1H), 1,82–1,68 (m, 4H), 1,73 (s, 6H), 1,60–1,47 (m, 2H), 1,28 (d, 1H, J = 7,0 Hz), 0,85 (d, 3H, J = 6,8 Hz), 0,81 (d, 3H, J = 6,8 Hz).

30

Ejemplo 3





El compuesto 23 es el compuesto 46 en WO2014/057074.

- 5 (a) *(5S,5'S)-(4,4'-(Pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitrobenzoi))bis(5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4,5-dihidro-1H-pirrol-1,3-diil)bis(trifluorometanosulfonato)* (**24**)

Se agregó 2,6-lutidina (8,90 ml, 8,22 g, 76,7 mmol) anhidra con una jeringa a una solución agitada de bis-cetona **23** (5,41 g, 5,90 mmol) en DCM seco (200 ml) a -45 °C (hielo seco/acetonitrilo) en una atmósfera de argón. Luego se agregó anhídrido trifluorometanosulfónico anhidro (5,96 ml, 10,0 g, 35,5 mmol), tomado de una ampolla recién abierta, con una jeringa, mientras se mantiene la temperatura a -40 °C o inferior. La mezcla de reacción se dejó agitar a -45 °C durante 1 hora punto en el cual el análisis de LC/MS reveló una conversión al producto en el tiempo de retención 2,23 minutos, ES+ m/z 1203 [M+ Na]⁺, 1181 [M+ H]⁺. La mezcla de reacción fría se diluyó inmediatamente con DCM (200 ml) y se lavó con agua (1 x 200 ml), una solución de ácido cítrico al 5 % (2 x 200 ml), NaHCO₃ (200 ml) acuoso saturado, salmuera (300 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar un producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) el bis-enol triflato **3** (elución en 78% hexanos/EtOAc) como una espuma amarilla (5,02 g, 72 % de rendimiento).

- 20 (b) *((Pentano-1,5-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona)* (**25**)

Se agregó Pd(PPh₃)₄ (196 mg, 0,17 mmol) a una mezcla agitada del bis-enol triflato **24** (5,02 g, 4,25 mmol), ácido 4-metoxifenilborónico (1,68 g, 11,1 mmol), Na₂CO₃ (1,44 g, 13,6 mmol), EtOH (20 ml), tolueno (40 ml) y agua (20 ml). La mezcla de reacción se calentó a 30 °C y se agitó en una atmósfera de argón durante 3 horas luego de lo cual se observó una conversión completa al producto deseado mediante LC/MS, tiempo de retención 2,23 minutos, ES+ m/z 1120 [M+ Na]⁺, 1098 [M+ H]⁺. La mezcla de reacción se dividió entre EtOAc (200 ml) y H₂O (100 ml) y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (2 x 50 ml), salmuera (50 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó un compuesto bis-C2-arilo **25** (elución a 63 % hexano/EtOAc) como una espuma amarillenta (3,11 g, 67 % de rendimiento).

(c) *((Pentano-1,5-dilbis(oxi))bis(2-amino-5-metoxi-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona) (26)*

5 Se agregó cinc no activado (4,13 g, 63,1 mmol) a una solución agitada de forma vigorosa del compuesto bis-nitro 25 (1,73 g, 1,58 mmol) en EtOH (15 ml) y EtOAc (15 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató con agua (1 ml) luego en gotas con una solución de 5 % v/v de HCO₂H en MeOH (19 ml). Se observaron un cambio de color de verde a gris metálico y una exotermia de 40 °C. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente punto en el cual el análisis mediante LC/MS reveló una conversión completa al producto deseado en el tiempo de retención 2,19 minutos, ES+ m/z 1060 [M+ Na]⁺, 1038 [M+ H]⁺. La mezcla se filtró a través de celite® y la almohadilla se lavó con EtOAc (100 ml). El filtrado se lavó con NaHCO₃ (3 x 50 ml) acuoso saturado [cuidado: jefervescencia!], salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar la bis-anilina en bruto **26** como una espuma anaranjada oscura (1,56 g, 95 % de rendimiento). Pureza satisfactoria, por lo cual el material se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

15 (d) *(9H-fluoren-9-il)metil(5-((5-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato (27)*

20 Se agregó FmocCl (1,22 g, 4,70 mmol) a una suspensión agitada de bis-anilina 26 (6,50 g, 6,27 mmol) y Na₂CO₃ (1,66 g, 15,7 mmol) en THF (32 ml) y H₂O (32 ml). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 3 horas donde el análisis mediante LC/MS reveló un el producto de Fmoc 27 mono deseado en un tiempo de retención de 2,33 minutos, I % = 51 ES+ m/z 1282 [M+ Na]⁺, 1260 [M+ H]⁺, junto con material de partida sin reacción en el tiempo de retención 2,19 minutos, I % = 24 y material de bis-Fmoc en el tiempo de retención 2,47 minutos, I% = 24, ES+ m/z 1504 [M+ Na]⁺, 1482 [M+ H]⁺. La mezcla se dividió entre H₂O (50 ml) y EtOAc (75 ml), las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (30 ml), salmuera (40 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el producto 27 de Fmoc mono puro como una espuma anaranjada (3,31 g, 56 % de rendimiento en función de FmocCl, elución a 53 % hexanos/EtOAc), bis-anilina 26 sin reacción (2,09 g, elución a 40 % de EtOAc) y bis-Fmoc (1,39 g, elución a 68 % de hexanos/EtOAc).

35 (e) *(9H-fluoren-9-il)metil(5-((5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato (28)*

40 Se agregó trifosgeno (281 mg, 0,81 mmol) a una solución agitada del producto de Fmoc mono 27 (3,31 g, 2,63 mmol) y TEA (805 µl, 584 mg, 5,79 mmol) en DCM seco (35 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestreado en MeOH para proporcionar carbamato de metilo, tiempo de retención de 2,35 minutos, ES+ m/z 1340 [M+ Na]⁺, 1318 [M+ H]⁺). La mezcla se trató con TEA adicional (549 µl, 398 mg, 3,95 mmol) seguido de la adición del enlazador I16 (992 mg, 2,63 mmol). Luego de 20 horas de agitación en argón, el LC/MS reveló una conversión al carbamato 28 deseado en el tiempo de retención 2,33 minutos, I % = 40, ES+ m/z 1685 [M+ Na]⁺, junto con el material escindido de Fmoc 29 en el tiempo de retención 2,19 minutos, I% = 28, ES+ m/z 1463 [M+ Na]⁺, 1441 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (40 ml) y se lavó NH₄Cl saturado acuoso (2 x 30 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el carbamato puro 28 como una espuma amarilla (1,64 g, 38 % de rendimiento, elución de 40 % hexano/EtOAc) junto con el producto escindido de Fmoc 29 (1,31 g, elución en 20 % Hexano/EtOAc).

50 (f) *(5-((5-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrole-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilyl)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encilo (29)*

55 Se agregó dimetilamina (9,9 ml de una solución 2,0 M en THF, 19,7 mmol) a una solución agitada del compuesto protegido de Fmoc 28 (1,64 g, 0,99 mmol) en THF (15 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 1,5 hora a temperatura ambiente, el análisis de LC/MS reveló una terminación de la reacción con el producto deseado en el tiempo de retención de 2,19 minutos, ES+ m/z 1463 [M+ Na]⁺, 1441 [M+ H]⁺, junto con el subproducto de escisión de Fmoc y su aducto de DMA en el tiempo de retención de 0,97 minutos. La mezcla se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto que fue purificado posteriormente mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) para proporcionar la anilina pura 29 (elución a 20 % de Hexano/EtOAc) como una espuma anaranjada (1,36 g, 96 % de rendimiento).

65 (g) *Alil(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-*

tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (30)

Se agregó trifosgeno (198 mg, 0,67 mmol) a una solución agitada de anilina 29 (2,67 g, 1,85 mmol) y piridina (329 µl, 322 mg, 4,07 mmol) en DCM seco (25 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestreada en MeOH para proporcionar carbamato de metilo, tiempo de retención de 2,22 minutos, ES+ m/z 1521 [M+ Na]⁺, 1499 [M+ H]⁺). La mezcla se trató con piridina adicional (224 µl, 220 mg, 2,78 mmol) y dilaurato de dibutiastaño (219 µl, 234 mg, 0,37 mmol) seguido de la adición del enlazador 5a (1,18 g, 1,85 mmol). Luego de 16 horas de agitación bajo argón, el LC/MS reveló un consumo de isocianato y una disminución en la intensidad de señal para el enlazador 5a, pero no para M²⁺ para el producto deseado en el tiempo de retención 2,23 minutos. La mezcla se diluyó con DCM (30 ml) y se lavó NH₄Cl saturado (2 x 30 ml), salmuera (40 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (Hexano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el carbamato puro 30 (elución en 39 % hexanos/EtOAc) como una espuma amarilla (2,40 g, 62 % de rendimiento).

(h) *Alil(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(5-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(hidroximetil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)pentil)oxi)-2-((S)-2-(hidroximetil)-4-(4-metoxifenil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (31)*

Se agregó ácido acético glacial (21 ml) a una solución agitada del compuesto protegido por TBS 30 (2,40 g, 1,14 mmol) en THF (7 ml) y H₂O (7 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 16 horas a temperatura ambiente tiempo después del cual el análisis de LC/MS reveló una finalización de la reacción con el producto deseado observado en el tiempo de retención 1,88 minutos ES+ m/z 1876 [M+ H]⁺, 1898 [M+ Na]⁺. La mezcla de reacción se agregó en gotas a una solución saturada enfriada (0-5 °C) de NaHCO₃ (350 ml). La solución neutra se dejó entibiar hasta temperatura ambiente y se dividió con EtOAc (200 ml). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 50 ml) y las capas orgánicas combinados se lavaron con NaHCO₃ (2 x 60 ml), salmuera (70 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto bruto. La purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó bi-alcohol 31 (elución en 95,6 % DCM/MeOH) como una espuma amarillenta (2,07 g, 97 % de rendimiento).

(i) *4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-(((aliloxi)carbonil)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-3-nitroencil(11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanomido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxy)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-11,11a-dihidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10(5H)-carboxilato (32)*

Se agregó Cu(NCCH₃)₄·CF₃SO₃ (2 mg, 5,3 µmmol) a una solución agitada del bis-OH 31 (100 mg, 53 µmmol) y la solución de TEMPO con oxidación aeróbica de Stahl TEMPO (27 µl de una solución 0,2 M de CH₃CN, 5,3 µmmol) en CH₃CN (1 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar en una atmósfera de aire (globo) durante 3 horas, punto en el cual el análisis mediante LC/MS no reveló un cambio evidente en el tiempo de retención o ES+. Se agregaron Cu(NCCH₃)₄·CF₃SO₃ (2 mg, 5,3 µmmol) adicional y una solución de TEMPO con oxidación aeróbica de Stahl (27 µl de una solución 0,2 M en CH₃CN, 5,3 µmmol) y la mezcla de reacción se dejó agitar durante 16 horas adicionales. El análisis de LC/MS nuevamente no reveló ningún cambio en el tiempo de retención, sin embargo, el ES⁺ mostró una ausencia del material de partida m/z y una fuerte presencia del producto deseado m/z 1894 [M+ Na]⁺. El solvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo resultante se purificó mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 10 g, 36 ml por minuto) proporcionó el producto ciclado 32 (elución en 96,2 % DCM/MeOH) como una espuma blanca (91 mg, 92 % de rendimiento).

(j) *Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (33)*

Se agregó Pd(PPh₃)₄ (15,0 mg, 12,8 µmol) a una solución agitada de pirrolidina (59 µl, 50 mg, 0,70 mmol) y el compuesto Aloc/alilo 32 (240 mg, 0,13 mmol) en DCM seco (5 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar en una atmósfera de argón, luego de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente el análisis mediante LC/MS reveló una terminación de la reacción con un producto deseado observado en el tiempo de retención 1,31 minutos ES+ m/z 1496 [M+ H]⁺. El solvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo resultante se trituró con dietil éter, sonificado, seguido por una evaporación adicional al vacío para proporcionar la amina en bruto 33 como un sólido amarillo que se llevó a cabo a través de la siguiente etapa sin una purificación o análisis adicional.

(k) *Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((5-(((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-(4-metoxifenil)-5-oxo-5,10,11,11a-*

tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10-carbonil(oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (34)

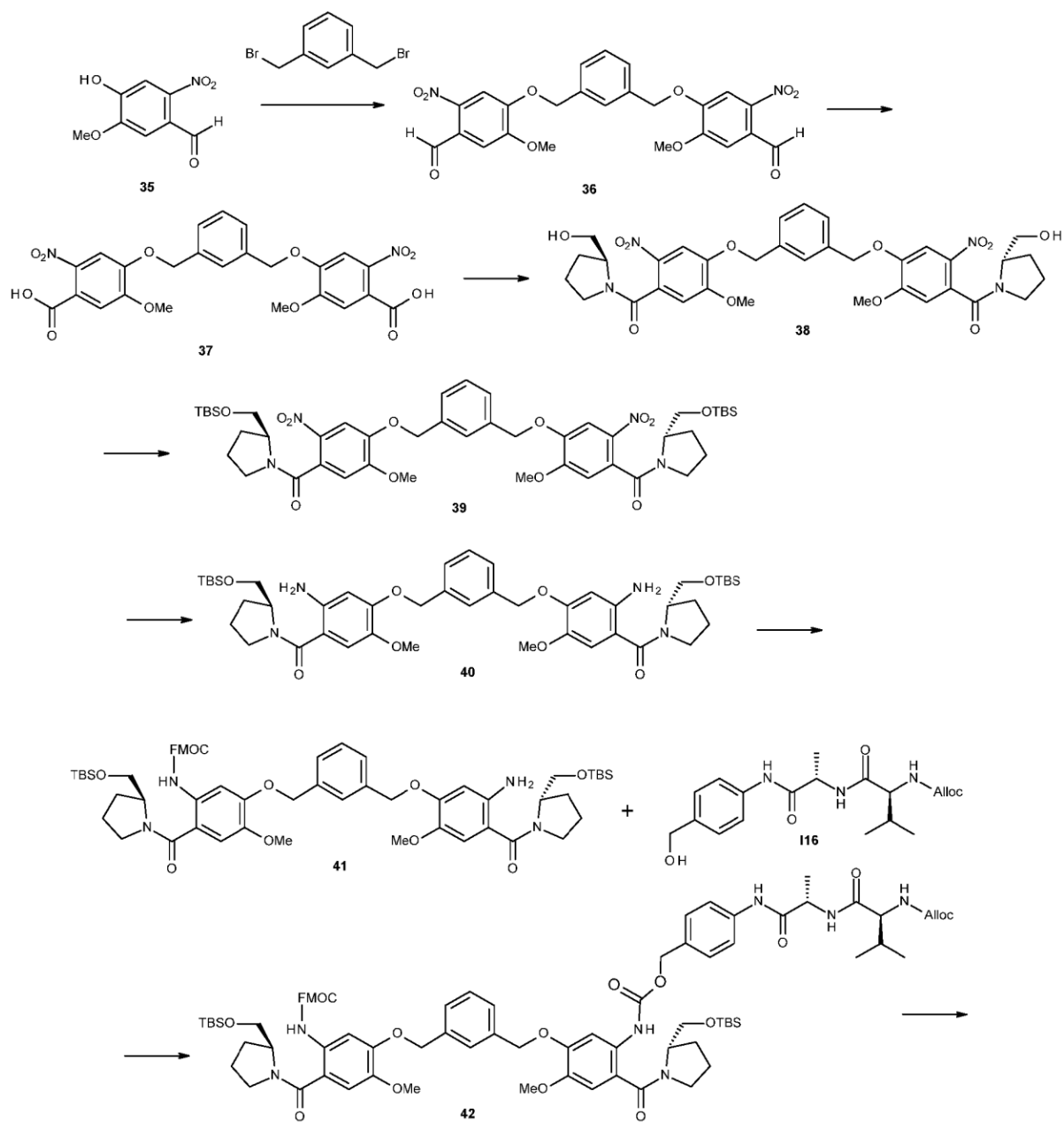
5 Se agregó una solución de éster MAL-dPEG@8-TFP (114 mg, 0,15 mmol) en DCM seco (5 ml) a una muestra agitada de la amina 33 (191 mg, 0,13 mmol) y piridina (26 µl, 25 mg, 0,32 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar en argón durante 20 horas y comenzó a oscurecerse en color con el tiempo. El análisis mediante LC/MS reveló una formación del producto deseado en el tiempo de retención 1,59 minutos (m/z deseado para M²⁺ no detectado durante el monitoreo de la reacción) junto con una amina sin reacción en el tiempo de retención 1,31 minutos. Se agregó éster de MAL-dPEG@8-TFP adicional (114 mg, 0,15 mmol), piridina (26 µl, 25 mg, 0,32 mmol) y DCM (3 ml) y la mezcla se dejó agitar durante seis días adicionales. En este punto, se formó una cantidad satisfactoria de producto deseado luego del análisis mediante LC/MS y el solvente se retiró mediante evaporación al vacío. El producto en bruto se purificó mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 10 g, 36 ml por minuto, con elución de 82 % DCM/MeOH) seguido por HPLC preparativa para proporcionar la maleimida 34 como un sólido apenas amarillo (46 mg, 13 %).

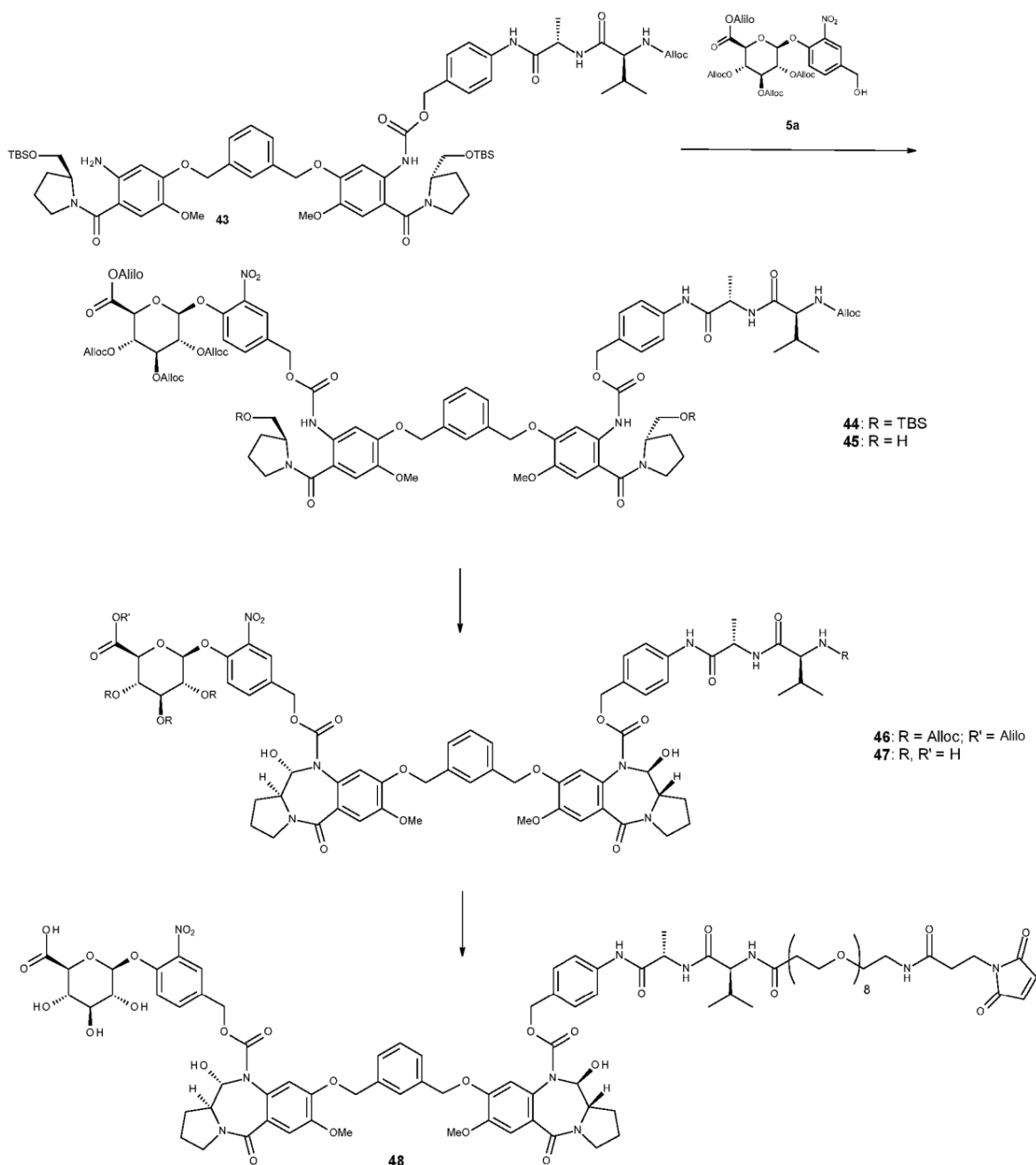
10 LC/MS (ejecución de 15 minutos), tiempo de retención 6,71 minutos, ES+ m/z 1036 [M²⁺ + H], 1058 [M²⁺ + Na], 1046 [M + Na]²⁺; ¹H NMR (400 MHz, d6-DMSO) δ 10,02 (br s, 2H), 8,27–8,16 (m, 1H), 8,01 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 7,90 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 7,72 (br s, 1H), 7,60–7,51 (m, 3H), 7,46–7,38 (m, 5H), 7,23–7,15 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 7,09 (s, 1H), 6,99 (s, 2H), 6,92 (d, 2H, J = 8,9 Hz), 6,91 (d, 2H, J = 8,9 Hz), 6,88–6,77 (m, 6H), 5,70–5,60 (m, 2H), 5,39–5,33 (m, 2H), 5,24–5,09 (m, 4H), 4,96–4,81 (m, 2H), 4,42–4,34 (m, 1H), 4,24–4,17 (m, 1H), 4,04–3,93 (m, 4H), 3,87–3,79 (m, 8H), 3,77 (s, 6H), 3,59 (t, 4H, J = 7,3 Hz), 3,52–3,46 (m, 28H), 3,40–3,26 (m, 7H, oscurecido por H₂O), 3,19–3,11 (m, 2H), 2,95–2,82 (m, 2H), 2,53–2,31 (m, 4H), 2,02–1,92 (m, 1H), 1,86–1,73 (m, 4H), 1,62–1,52 (m, 2H), 1,30 (d, 1H, J = 7,0 Hz), 0,87 (d, 3H, J = 6,7 Hz), 0,83 (d, 3H, J = 6,8 Hz).

15

20

Ejemplo 4





(a) 4,4'-((1,3-fenilenebis(metilen))bis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitrobenzaldehído) (36)

5 Se agregó 1,3-bis(bromometil)benceno (5,0 g, 19,1 mmol) a una solución agitada del fenol 35 (7,5 g, 38,2 mmol), TBAI (705 mg, 1,91 mmol) y K_2CO_3 (5,81 g, 42,0 mmol) en DMF seco (60 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 70 °C y se agitó en una atmósfera de argón durante 2 horas punto en el cual el análisis mediante LC/MS reveló una formación del producto sustancial en el tiempo de retención 1,67 minutos, ES+ m/z 519 $[M+ Na]^+$, 497 $[M+ H]^+$. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se retiró el DMF mediante evaporación al vacío. El residuo resultante se diluyó con agua (300 ml) y el precipitado anaranjado 36 recolectado mediante filtración al vacío, luego se lavó con H_2O , dietil éter y se secó en un horno de vacío hasta obtener un peso constante (9,18 g, 97 % de rendimiento).

(b) 4,4'-((1,3-fenilenebis(metileno))bis(oxi))bis(ácido 5-metoxi-2-nitrobenzoico) (37)

15 Una solución de clorito de sodio (8,44 g, 92,7 mmol, 80 % de grado técnico) y dihidrogenofosfato de sodio monobásico (6,2 g, 51,8 mmol) y agua (140 ml) se agregó a una solución de aldehído 36 (9,18 g, 18,5 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) a temperatura ambiente. Se agregó inmediatamente peróxido de hidrógeno (30 % p/p, 53 ml, 518 mmol) en gotas a la mezcla bifásica agitada de forma vigorosa. Se observaron efervescencia y una exotermia a 30 °C junto con un cambio de color de anaranjado a amarillo pálido y una disolución de la suspensión. La mezcla de reacción se enfrió

20

en un baño de hielo y se acidificó hasta pH 2 con ácido clorhídrico concentrado. La mezcla de reacción se extrajo luego con EtOAc (4 x 150 ml) y la fase orgánica combinada se lavaron con salmuera (2 x 100 ml), se secaron (MgSO₄), filtraron y evaporaron al vacío para proporcionar el ácido en bruto 37. El sólido se trituroó con dietiléter y se secó en un horno de vacío hasta obtener un peso constante (9,90 g, >100 % de rendimiento). Pureza satisfactoria mediante LC/MS (tiempo de retención 1,56 minutos, ES- m/z 527 [M+ H]⁺).

(c) *(((1,3-fenilenobis(metileno))bis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il)metanona) (38)*

10 Se agregó DMF (12 gotas) a una suspensión agitada del ácido bis-nitrobenzoico 37 (9,90 g, 18,7 mmol) y cloruro de oxalilo (4,9 ml, 7,1 g, 56,3 mmol) en DCM anhidro (130 ml). Luego de la efervescencia inicial, la suspensión de reacción se volvió una solución y la mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 horas. La mayoría del solvente se retiró mediante evaporación al vacío y la solución concentrada se trituroó con dietiléter. El precipitado amarillo resultante (LC/MS muestreado en MeOH proporcionó éster de metilo en el tiempo de retención 1,69 minutos, ES+ m/z 579 [M+ Na]⁺) se recolectó mediante filtración al vacío, se lavó con dietiléter frío y se secó durante 1 hora en un horno al vacío a 40 °C. El cloruro ácido sólido se agregó en partes a una suspensión agitada de (S)-(+)-2-pirrolidinametanol (4,35 g, 4,25 ml, 43,0 mmol) y TEA (13,0 ml, 9,46 g, 93,5 mmol) en DCM (100 µl) a -40 °C (hielo seco/CH₃CN). Luego de 1 hora de agitación, la reacción se completó como se consideró mediante LC/MS con exclusivamente el producto deseado en el tiempo de retención 1,44 minutos, ES+ m/z 717 [M+ Na]⁺, 695 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (100 ml) y se lavó con HCl 1 N (3 x 50 ml), NaHCO₃ (3 x 40 ml) saturado, salmuera (70 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y el solvente se evaporó al vacío para proporcionar el producto puro 38 como un sólido amarillo (12,7 g, 100 % de rendimiento).

25 (d) *(((1,3-fenilenebis(metileno))bis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidin-1-il)metanona) (39)*

Se agregó TBSCI (8,27 g, 54,9 mmol) a una solución agitada de bis-alcohol 38 (12,7 g, 18,3 mmol) e imidazol (7,47 g, 110 mmol) en DCM seco (100 ml). Luego de agitación a temperatura ambiente durante 1,5 horas, el análisis mediante LC/MS reveló un conversión completa al producto deseado en el tiempo de retención 2,11 minutos, ES+ m/z 946 [M+ Na]⁺, 924 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (100 ml) y se lavó con agua (2 x 75 ml), salmuera (80 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y el solvente se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto 39 como un sólido amarillo (16,7 g, 99 % de rendimiento). El material fue suficientemente puro para utilizar en la siguiente etapa sin purificación adicional.

35 (e) *(((1,3-fenilenobis(metileno))bis(oxi))bis(2-amino-5-metoxi-4,1-fenileno))bis(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidin-1-il)metanona) (40)*

Se agregó cinc no activado (18,5 g, 282 mmol) a una solución agitada de forma vigorosa del compuesto bis-nitro 39 (6,50 g, 7,10 mmol) en EtOH (65 ml) y EtOAc (65 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató con agua (6,5 ml) luego en gotas con una solución de 5 % v/v de HCO₂H en EtOH (130 ml). Se observaron un cambio de color de verde a gris metálico y una exotermia de 37 °C. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente punto en el cual el análisis mediante LC/MS reveló un conversión completa al producto deseado en el tiempo de retención 2,04 minutos, ES+ m/z 885 [M+ Na]⁺, 863 [M+ H]⁺. La mezcla se filtró a través de celite® y la almohadilla se lavó con EtOAc (200 ml). El filtrado se lavó con NaHCO₃ (3 x 100 ml) acuoso saturado [cuidado: ¡efervescencia!], salmuera (150 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar la bis-anilina en bruto 40 como una espuma anaranjada oscura (5,41 g, 89% de rendimiento). Pureza satisfactoria, por lo cual el material se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

50 (f) *(9H-fluoren-9-il)metil (5-((3-((5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-2-metoxidenoxi)metil)bencil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato (41)*

Se agregó FmocCl (1,43 g, 5,50 mmol) a una suspensión agitada de bis-anilina 40 (6,34 g, 7,35 mmol) y Na₂CO₃ (1,95 g, 18,4 mmol) en THF (32 ml) y H₂O (32 ml). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 horas donde el análisis mediante LC/MS reveló un el producto de Fmoc 41 mono deseado en un tiempo de retención de 2,24 minutos, I% = 41 ES+ m/z 1108 [M+ Na]⁺, 1086 [M+ H]⁺, junto con material de partida sin reacción en el tiempo de retención 2,03 minutos, I% = 19 y material de bis-Fmoc en el tiempo de retención 2,39 minutos, I% = 40, ES+ m/z 1330 [M+ Na]⁺, 1308 [M+ H]⁺. La mezcla se dividió entre H₂O (50 ml) y EtOAc (50 ml), las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con H₂O (30 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (heptano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el producto 41 de Fmoc mono puro como una espuma anaranjada (2,40 g, 40 % de rendimiento en función de FmocCl, elución a 30 % heptano/EtOAc), bis-anilina 40 sin reacción (1,72 g, elución a 100 % de EtOAc) y bis-Fmoc (1,95 g, elución a 69 % de heptano/EtOAc).

65 (g) *(9H-fluoren-9-il)metil(5-((3-((5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-*

carbonil)-2-metoxifenoxi)metil)encil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbarnato (42)

5 Se agregó trifosgeno (236 mg, 0,80 mmol) a una solución agitada del producto de Fmoc mono 41 (2,40 g, 2,21 mmol) y TEA (676 µl, 491 mg, 4,86 mmol) en DCM seco (30 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestreada en MeOH para proporcionar carbarnato de metilo, tiempo de retención de 2,27 minutos, ES+ m/z 1166 [M+ Na]⁺, 1144 [M+ H]⁺). La mezcla se trató con TEA adicional (461 µl, 335 mg, 3,32 mmol) seguido de la adición del enlazador 116 (835 mg, 2,21 mmol).
10 Luego de 2,5 horas con agitación en argón, el LC/MS reveló una conversión satisfactoria a carbarnato 9 en el tiempo de retención de 2,24 minutos, ES+ m/z 1511 [M+ Na]⁺, 1489 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó NH₄Cl saturado acuoso (2 x 40 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (heptano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el carbarnato puro 42 (elución en 38 % heptano/EtOAc) como una espuma amarilla (2,40 g, 73 % de rendimiento).

15 (h) *4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil (5-((3-((5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)metil)encil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbarnato (43)*

20 Se agregó dimetilamina (16,1 ml de una solución 2,0 M en THF, 32,2 mmol) a una solución agitada del compuesto protegido de Fmoc 42 (2,40 g, 1,61 mmol) en THF (20 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente, el análisis de LC/MS reveló una terminación de la reacción con el producto deseado en el tiempo de retención de 2,07 minutos, ES+ m/z 1289 [M+ Na]⁺, 1267 [M+ H]⁺, junto con el subproducto de escisión de Fmoc en el tiempo de retención de 1,74 minutos y su aducto de DMA en el tiempo de retención de 0,95 minutos. La
25 mezcla se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto que fue purificado posteriormente mediante Isolera™ (heptano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) para proporcionar la anilina pura 43 (elución a 100 % de EtOAc) como una espuma blanca (1,77 g, 87 % de rendimiento).

30 (i) *Alil(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-((3-((5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)metil)encil)oxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbarnato)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (44)*

35 Se agregó trifosgeno (150 mg, 0,50 mmol) a una solución agitada de anilina 43 (1,77 g, 1,40 mmol) y piridina (249 µl, 243 mg, 3,08 mmol) en DCM seco (20 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestreada en MeOH para proporcionar carbarnato de metilo, tiempo de retención de 2,11 minutos, ES+ m/z 1347 [M+ Na]⁺, 1325 [M+ H]⁺). La mezcla se trató con piridina adicional (170 µl, 166 mg, 2,10 mmol) y dilaurato de dibutiastaño (165 µl, 177 mg, 0,28 mmol) seguido de la adición del enlazador 5a (891 mg, 1,40 mmol). Luego de 24 horas con agitación en argón, el LC/MS reveló una
40 conversión satisfactoria a carbarnato 44 en el tiempo de retención de 2,16 minutos, ES+ m/z 1952 [M+ Na]⁺, 1930 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (40 ml) y se lavó NH₄Cl saturado (2 x 35 ml), salmuera (30 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (heptano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el carbarnato puro 44 (elución en 32 % heptano/EtOAc) como un sólido blanco (2,16 g, 80 % de rendimiento).

45 (j) *Alil(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-((3-((5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-((hidroximetil)pirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)metil)encil)oxi)-2-((S)-2-((hidroximetil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbarnato)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (45)*

50 Se agregó ácido acético glacial (18 ml) a una solución agitada del compuesto protegido por TBS 44 (2,16 g, 1,12 mmol) en THF (6 ml) y H₂O (6 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 5 horas a temperatura ambiente tiempo después del cual el análisis de LC/MS reveló una finalización de la reacción con el producto deseado observado en el tiempo de retención 1,77 minutos ES+ m/z 1702 [M+ H]⁺, 1724 [M+ Na]⁺. La mezcla de reacción se agregó en
55 gotas a una solución saturada enfriada (0-5 °C) de NaHCO₃ (300 ml). La solución neutral se dejó entibiar hasta temperatura ambiente y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml), las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (60 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para brindar el producto bruto. La purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó bi-alcohol 45 (elución en 94,8 % DCM/MeOH) como una espuma blanca (1,86 g, 98 % de rendimiento).

60 (k) *4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((aliloxi)carbonil)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-3-nitroencil(11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)metil)encil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10(5H)-carboxilato (46)*

65

Se agregó 45 % de IBX (263 mg, 0,42 mmol) a un solución agitada del bis-OH 45 (300 mg, 0,18 mmol) en DMSO seco (4 ml). La mezcla se calentó hasta 30 °C bajo una atmósfera de argón y el progreso de la reacción se monitoreó mediante LC/MS. Luego de 24 horas de agitación, se agregó IBX (2 x 22 mg, 2 x 36 µmol) y la mezcla se agitó durante 28 horas adicionales. En este punto el análisis mediante LC-MS reveló la formación del producto resuelto en el tiempo de retención 1,72 minutos, ES+ m/z 1698 [M+ H]⁺, 1720 [M+ Na]⁺. La mezcla de reacción se agregó en gotas a una solución de NaHCO₃ acuosa saturada (100 ml) y se extrajo con DCM (2 x 40 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (40 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 25 g, 75 ml por minuto) proporcionó el producto ciclado 46 (elución en 96,5 % DCM/MeOH) como una espuma blanca (219 mg, 73 % de rendimiento).

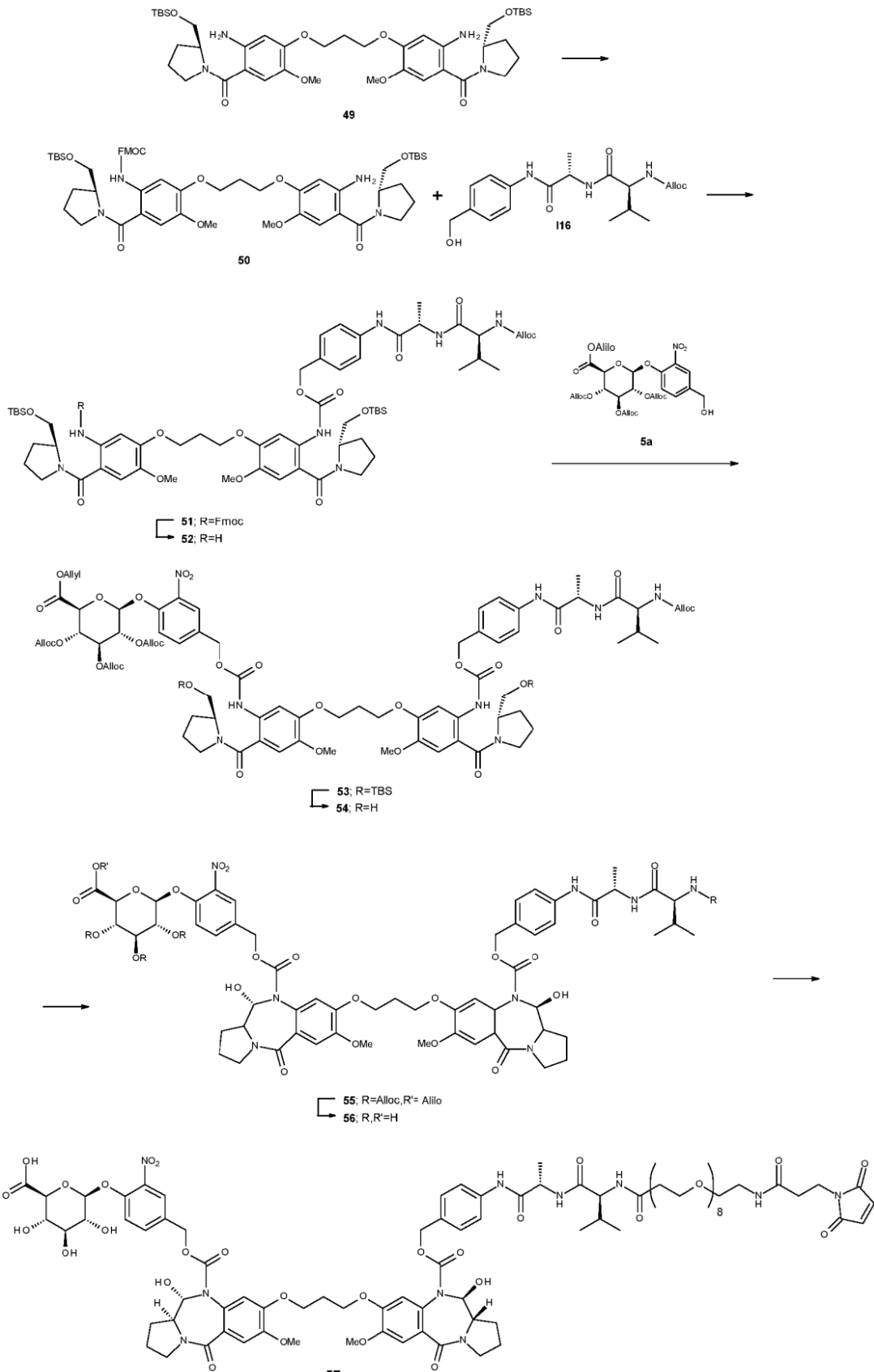
(l) *Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)metil)bencil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (47)*

Se agregó Pd(PPh₃)₄ (13,0 mg, 11,1 µmol) a una solución agitada de pirrolidina (51 µl, 43 mg, 0,61 mmol) y el compuesto Aloc/alilo 46 (189 mg, 0,11 mmol) en DCM seco (2 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar en una atmósfera de argón, durante 30 minutos a temperatura ambiente, donde el análisis mediante LC/MS reveló una terminación de la reacción con un producto deseado observado en el tiempo de retención 1,13 minutos ES+ m/z 1322 [M+ H]⁺. El solvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo resultante triturado con dietil éter seguido de evaporación adicional al vacío para proporcionar la amina en bruto 47 como un sólido que se utilizó en el siguiente paso sin purificación o análisis adicional.

(m) *Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-((3-(((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaoxa-3,6,34-triazaheptatriacontanamido)bencil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)metil)bencil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol-2,1-c)[1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (48)*

Se agregó una solución de éster MAL-dPEG@8-TFP (123 mg, 0,16 mmol) en DCM seco (2 ml) a una muestra agitada de la amina 47 (147 mg, 0,11 mmol) y piridina (22 µl, 22 mg, 0,28 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar en argón durante 20 horas y comenzó a oscurecerse en color con el tiempo. El análisis mediante LC/MS reveló la formación del producto deseado en el tiempo de retención 1,37 minutos, ES+ m/z 1896 [M+ H]⁺, 1918 [M+ Na]⁺, junto con una traza de amina sin reacción en el tiempo de retención 1,13 minutos. La descomposición sustancial del producto y el solvente se retiró mediante evaporación al vacío. El producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la maleimida 48 como un sólido blanco (75 mg, 36 %): LC/MS (ejecución de 15 minutos), y tiempo de retención 5,48 minutos ES+ m/z 1896 [M+ H]⁺, 1918 [M+ Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 9,92 (br s, 2H), 8,20–8,14 (m, 1H), 8,01 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 7,87 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,73 (br s, 1H), 7,62–7,36 (m, 8H), 7,23–7,15 (m, 2H), 7,11 (s, 1H), 7,09 (s, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,99 (s, 1H), 6,94 (s, 1H), 6,62–6,51 (m, 2H), 5,53–5,41 (m, 3H), 5,35–5,85 (m, 9H), 4,41–4,32 (m, 1H), 4,23–4,16 (m, 1H), 4,00–3,90 (m, 2H), 3,81 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,61–3,58 (m, 4H), 3,52–3,45 (m, 28H), 3,42–3,23 (m, 9H), 3,18–3,12 (m, 2H), 2,50–2,35 (m, 2H), 2,34–2,31 (m, 2H), 2,10–1,8 (m, 9H), 1,28 (d, 1H, J = 7,1 Hz), 0,87 (d, 3H, J = 6,7 Hz), 0,83 (d, 3H, J = 6,8 Hz).

Ejemplo 5



(a) (9H-fluoren-9-il)metil(5-(3-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato (50)

5 Se agregó FmocCl (1,58 g, 6,09 mmol) a una mezcla agitada de bis-anilina 49 (6,50 g, 8,12 mmol) y Na₂CO₃ (2,15 g,

20,3 mmol) en THF (35 ml) y H₂O (35 ml). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2,5 horas donde el análisis mediante LC/MS reveló un el producto de Fmoc 50 mono deseado en un tiempo de retención de 2,19 minutos, I% = 49 ES+ m/z 1046 [M+ Na]⁺, 1024 [M+ H]⁺, junto con material de partida sin reacción en el tiempo de retención 1,96 minutos, I% = 19 y material de bis-Fmoc en el tiempo de retención 2,34 minutos, I% = 32, ES+ m/z 1270 [M+ Na]⁺, 1246 [M+ H]⁺. La mezcla se dividió entre H₂O (50 ml) y EtOAc (50 ml), las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 25 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con H₂O (30 ml), salmuera (50 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (heptano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el producto 50 de Fmoc mono puro como una espuma anaranjada (3,61 g, 58 % de rendimiento en función de FmocCl, elución a 61 % heptano/EtOAc), bis-anilina 2 sin reacción (2,04 g, elución a 100 % de EtOAc) y bis-Fmoc (1,71 g, elución a 30 % de heptano/EtOAc).

(b) *5-(3-(5-(((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato de 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encilo (51)*

Se agregó trifosgeno (377 mg, 1,27 mmol) a una solución agitada del producto de Fmoc mono 50 (3,61 g, 3,53 mmol) y TEA (1,08 ml, 784 mg, 7,70 mmol) en DCM seco (40 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestrada en MeOH para proporcionar carbamato de metilo, tiempo de retención de 2,23 minutos, ES+ m/z 1104 [M+ Na]⁺, 1082 [M+ H]⁺). La mezcla se trató con TEA adicional (737 µl, 535 mg, 5,30 mmol) seguido de la adición del enlazador 116 (1,33 g, 3,53 mmol). Luego de 2,5 horas con agitación en argón, el LC/MS reveló una conversión satisfactoria a carbamato 51 en el tiempo de retención de 2,21 minutos, ES+ m/z 1449 [M+ Na]⁺, 1427 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó NH₄Cl saturado acuoso (2 x 30 ml), H₂O (30 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (heptano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el carbamato puro 51 (elución en 40 % hexanos/EtOAc) como una espuma amarilla (3,34 g, 66 % de rendimiento).

(c) *4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil (5-(3-(5-amino-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamato (52)*

Se agregó dimetilamina (23,4 ml de una solución 2,0 M en THF, 46,8 mmol) a una solución agitada del compuesto protegido de Fmoc 51 (3,34 g, 2,34 mmol) en THF (15 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar en argón durante 1 hora a temperatura ambiente, el análisis de LC/MS reveló una terminación de la reacción con el producto deseado en el tiempo de retención de 2,02 minutos, ES+ m/z 1227 [M+ Na]⁺, 1205 [M+ H]⁺, junto con el subproducto de escisión de Fmoc en el tiempo de retención de 1,72 minutos y su aducto de DMA en el tiempo de retención de 0,93 minutos. La mezcla se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto que fue purificado posteriormente mediante Isolera™ (heptano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) para proporcionar la anilina pura 52 (elución a 100 % de EtOAc) como una espuma anaranjada (2,51 g, 89 % de rendimiento).

(d) *Alil(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)pirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-metilenepirrolidinapirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (53)*

Se agregó trifosgeno (222 mg, 0,75 mmol) a una solución agitada de anilina 52 (2,51 g, 2,08 mmol) y piridina (370 µl, 362 mg, 4,58 mmol) en DCM seco (30 ml) a temperatura ambiente. Luego de agitar durante 10 minutos en argón, el análisis de LC/MS reveló una conversión completa a isocianato (muestrada en MeOH para proporcionar carbamato de metilo, tiempo de retención de 2,06 minutos, ES+ m/z 1285 [M+ Na]⁺, 1263 [M+ H]⁺). La mezcla se trató con piridina adicional (252 µl, 247 mg, 3,12 mmol) y dilaurato de dibutiastaño (247 µl, 263 mg, 0,42 mmol) seguido de la adición del enlazador 5a (1,33 g, 2,08 mmol). Luego de 28 horas con agitación en argón, el LC/MS reveló una conversión satisfactoria a carbamato 53 (tiempo de retención) de 2,12 minutos, ES+ m/z 1890 [M+ Na]⁺, 1868 [M+ H]⁺. La mezcla se diluyó con DCM (40 ml) y se lavó con NH₄Cl saturado (3 x 30 ml), salmuera (50 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (heptano/EtOAc, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó el carbamato puro 53 (elución en 37 % heptano/EtOAc) como una espuma amarilla (3,12 g, 80 % de rendimiento).

(e) *Alil(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((5-(3-(5-(((4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)amino)-4-((S)-2-(hidroximetil)pirrolidina-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-(hidroximetil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metoxifenil)carbamoil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (54)*

Se agregó ácido acético glacial (24 ml) a una solución agitada del compuesto protegido por TBS 53 (3,12 g, 1,67 mmol) en THF (8 ml) y H₂O (8 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar durante 18 horas a temperatura ambiente tiempo después del cual el análisis de LC/MS reveló una finalización de la reacción con el producto deseado observado

en el tiempo de retención 1,72 minutos ES+ m/z 1640 [M+ H]⁺, 1662 [M+ Na]⁺. La mezcla de reacción se agregó en gotas a una solución saturada enfriada (0-5 °C) de NaHCO₃ (450 ml). La solución neutra se dejó entibiar hasta temperatura ambiente y se extrajo con EtOAc (3 x 80 ml), las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (80 ml), se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó al vacío para brindar el producto bruto. La purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 100 g, 100 ml por minuto) proporcionó bi-alcohol 54 (elución en 96,6 % DCM/MeOH) como una espuma blanca (2,05 g, 75 % de rendimiento).

(f) 4-(((2S,3R,4S,5S,6S)-6-((aliloxi)carbonil)-3,4,5-tris(((aliloxi)carbonil)oxi)tetrahydro-2H-piran-2-yl)oxi)-3-nitrobenzil(11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)benzil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,11,11a-tetrahydro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10(5H)-carboxilato (55)

Se agregó 45 % de IBX (273 mg, 0,44 mmol) a una solución agitada del bis-OH 54 (300 mg, 0,18 mmol) en DMSO seco (4 ml). La mezcla se calentó hasta 30 °C bajo una atmósfera de argón y el progreso de la reacción se monitoreó mediante LC/MS. Luego de 24 horas de agitación, se agregó IBX (26 mg, 42 μmol) y la mezcla se agitó durante 24 horas. En este punto el análisis mediante LC/MS reveló de forma predominante un pico único correspondiente a un producto deseado en el tiempo de retención 1,68 minutos, ES+ m/z 1658 [M+ Na]⁺. La mezcla de reacción se agregó en gotas a una solución de NaHCO₃ acuosa saturada enfriada (100 ml) y se extrajo con DCM (2 x 40 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (40 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el producto en bruto. La purificación mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 25 g, 75 ml por minuto) proporcionó el producto ciclado 55 (elución en 97 % DCM/MeOH) como una espuma blanca (256 mg, 87 % de rendimiento).

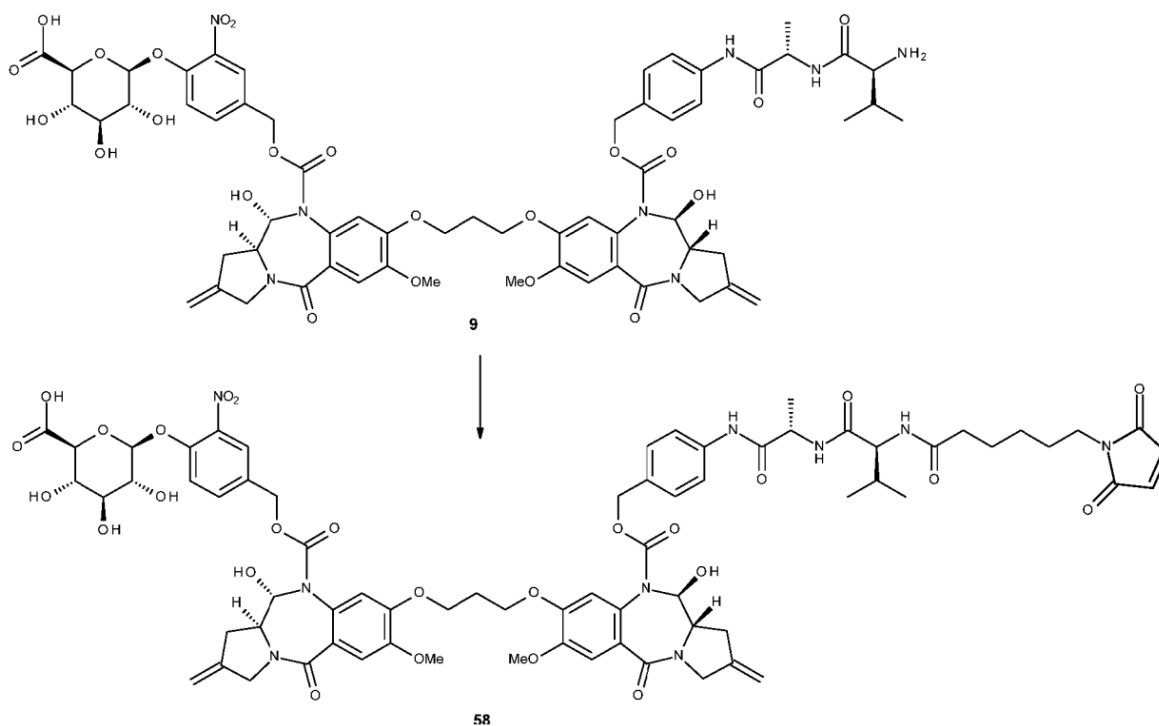
(g) Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)benzil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (56)

Se agregó Pd(PPh₃)₄ (18,1 mg, 15,7 μmol) a una solución agitada de pirrolidina (72 μl, 62 mg, 0,86 mmol) y el compuesto Aloc/alilo 55 (256 mg, 0,16 mmol) en DCM seco (2 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar bajo una atmósfera de argón donde un precipitado comenzó a formarse. Luego de 30 minutos de agitación a temperatura ambiente el análisis mediante LC/MS reveló una terminación de la reacción con un producto deseado observado en el tiempo de retención 1,07 minutos ES+ m/z 1260 [M+ H]⁺. El solvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo resultante se trituró con dietil éter seguido de evaporación adicional al vacío para proporcionar la amina en bruto 56 como un sólido que se utilizó en el siguiente paso sin purificación o análisis adicional.

(h) Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((11S,11aS)-8-(3-(((11S,11aS)-10-(((4-((2S,5S)-37-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5-isopropil-2-metil-4,7,35-trioxo-10,13,16,19,22,25,28,31-octaosa-3,6,34-triazahaptatriacontanamido)benzil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2,3,5,10,11,11a-hexahidro-1H-pirrol[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (57)

Se agregó una solución de éster MAL-dPEG@8-TFP (140 mg, 0,19 mmol) en DCM seco (2 ml) a una muestra agitada de la amina 56 (198 mg, 0,16 mmol), piridina (32 μl, 31 mg, 0,39 mmol) y DMF (0,25 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar en argón durante 20 horas y comenzó a oscurecerse en color con el tiempo. El análisis mediante LC/MS reveló la formación de un producto deseado en el tiempo de retención 1,31 minutos, ES+ m/z 1834 [M+ H]⁺, 1857 [M+ Na]⁺, junto con una amina sin reacción en el tiempo de retención 1,07 minutos. Se agregó éster de MAL-dPEG@8-TFP adicional (70 mg, 0,09 mmol), piridina (16 μl, 16 mg, 0,2 mmol) y DCM (2 ml) y a mezcla se dejó agitar durante 24 horas adicionales. El volumen del solvente se redujo luego en un 50 % mediante evaporación al vacío, en este punto se formó una cantidad satisfactoria de producto deseado luego del análisis mediante LC/MS y el solvente se retiró completamente mediante evaporación al vacío. El producto en bruto se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar la maleimida 56 como un sólido blanco (48 mg, 17 %): LC/MS (ejecución de 15 minutos), tiempo de retención 5,22 minutos, ES+ m/z 1834 [M+ H]⁺, 1856 [M+ Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 9,99 (br s, 2H), 8,24–8,17 (m, 1H), 8,01 (t, 1H, J = 5,6 Hz), 7,88 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,74 (br s, 1H), 7,64–7,50 (m, 3H), 7,44–7,34 (m, 1H), 7,23–7,13 (m, 2H), 7,06 (s, 2H), 7,00 (s, 2H), 6,86 (s, 1H), 6,79 (s, 1H), 6,59–6,47 (m, 2H), 5,52–5,37 (m, 3H), 5,32–5,02 (m, 4H), 4,98–4,84 (m, 2H), 4,44–4,34 (m, 1H), 4,24–4,19 (m, 1H), 4,17–3,96 (m, 5H), 3,92–3,84 (m, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,60 (t, 4H, J = 7,3 Hz), 3,54–3,45 (m, 29H), 3,40–3,24 (m, 8H), 3,19–3,12 (m, 2H), 2,57–2,35 (m, 2H), 2,34–2,30 (m, 2H), 2,25–2,12 (m, 2H), 2,10–1,78 (m, 9H), 1,30 (d, 1H, J = 6,9 Hz), 0,87 (d, 3H, J = 6,7 Hz), 0,83 (d, 3H, J = 6,7 Hz)

Ejemplo 6

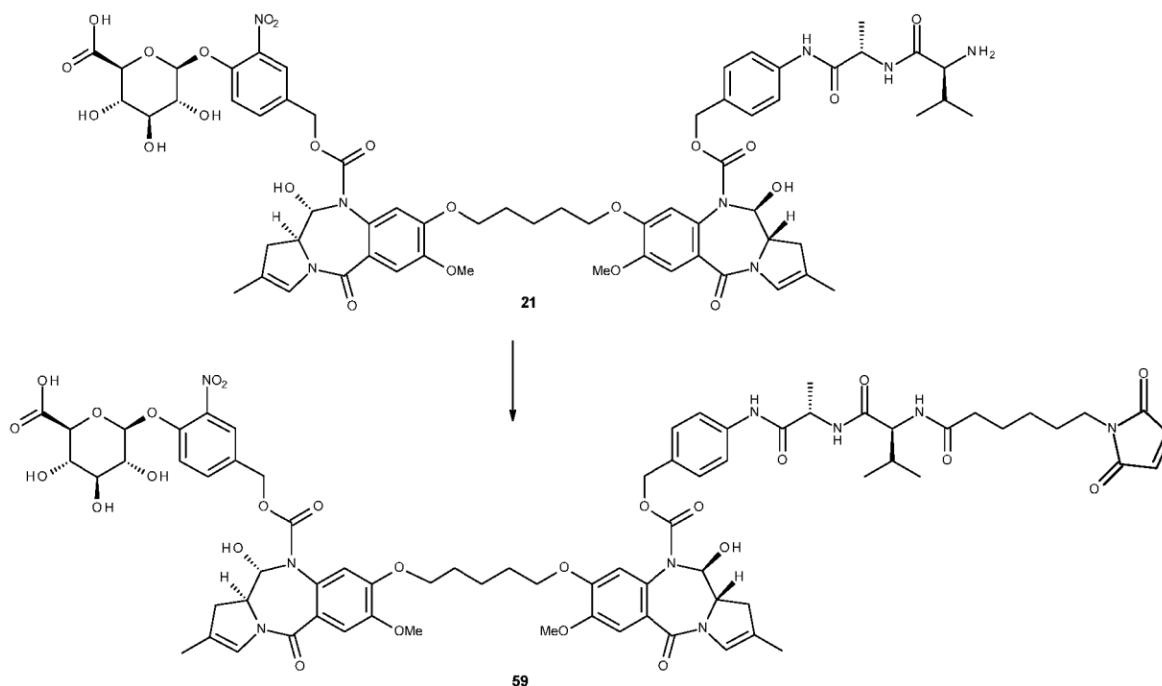


5 **Ácido** (2*S*,3*S*,4*S*,5*R*,6*S*)-6-(4-(((11*S*,11*aS*)-8-(3-(((11*S*,11*aS*)-10-(((4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1*H*-pirrol-1-*il*)hexanamido)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11*a*-hexahidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin-8-*il*)oxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metileno-5-oxo-2,3,5,10,11,11*a*-hexahidro-1*H*-pirrolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2*H*-piran-2-carboxílico (58)

10 Se agregó una solución de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 6-maleimidohexanoico (51 mg, 0,17 mmol) en DCM seco (2 ml) a una muestra agitada de la amina 9 (141 mg, 0,11 mmol), piridina (22 μ l, 21 mg, 0,33 mmol) y DMF (0,25 ml). La mezcla de reacción se dejó agitar en argón durante 20 horas y comenzó a oscurecerse en color con el tiempo. El análisis mediante LC-MS reveló la formación de un producto deseado en el tiempo de retención 1,42 minutos, ES-
 15 m/z 1474 $[M-H]^-$, junto con una amina sin reacción en el tiempo de retención 1,12 minutos. El solvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo resultante se purificó mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 10 g, 36 ml por minuto, elución a 80 % de DCM/MeOH) para proporcionar 90 mg de 58 enriquecido. La purificación adicional mediante HPLC preparativa proporcionó el maleimido 58 como un sólido blanco (26 mg, 16 %): LC-MS (ejecución de
 20 15 minutos), tiempo de retención 5,85 minutos, ES+ m/z 1477 $[M+H]^+$, 1499 $[M+Na]^+$; 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 10,0 (br s, 2H), 8,16 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz), 7,80 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz), 7,74 (br s, 1H), 7,62–7,50 (m, 3H), 7,39 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz), 7,22–7,11 (m, 2H), 7,06 (s, 2H), 7,00 (s, 2H), 6,89 (s, 2H), 6,84–6,78 (m, 1H), 6,68–6,56 (m, 2H), 5,45–5,30 (m, 3H), 5,29–5,01 (m, 9H), 4,98–4,85 (m, 2H), 4,42–4,33 (m, 1H), 4,24–3,92 (m, 9H), 3,77 (s, 6H), 3,44 (t, 2H, $J = 9,5$ Hz), 3,39–3,30 (m, 2H), 2,93–2,80 (m, 2H), 2,57–2,35 (m, 2H), 2,23–2,06 (m, 4H) 2,03–1,90 (m, 1H), 1,48 (p, 4H, $J = 7,3$ Hz), 1,30 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz), 1,18 (p, 2H, $J = 7,6$ Hz), 0,86 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz), 0,83 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz).

25

Ejemplo 7



5 **Ácido** (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-((((11S,11aS)-8-((5-((((11S,11aS)-10-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-il)oxi)pentil)oxi)-11-hidroxi-7-metoxi-2-metil-5-oxo-5,10,11,11a-tetrahidro-1H-pirrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepina-10-carbonil)oxi)metil)-2-nitrofenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (59)

10 Se agregó una solución de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 6-maleimidohexanoico (42 mg, 0,14 mmol) en DCM seco (2 ml) a una muestra agitada de la amina 21 (118 mg, 0,09 mmol), piridina (18 µl, 18 mg, 0,23 mmol). La mezcla de reacción se dejó agitar en argón durante 24 horas y comenzó a oscurecerse en color con el tiempo. El análisis mediante LC-MS reveló la formación de un producto deseado en el tiempo de retención 1,45 minutos, ES- m/z 1502 [M-H]⁻, junto con una amina sin reacción en el tiempo de retención 1,15 minutos. El solvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo resultante se purificó mediante Isolera™ (DCM/MeOH, SNAP Ultra 10 g, 36 ml por minuto, elución a 66 % de DCM/MeOH) para proporcionar 76 mg de 59 enriquecido. La purificación adicional mediante HPLC preparativa proporcionó maleimida 59 como un sólido blanco (27 mg, 20 %): LC-MS (ejecución de 15 minutos), tiempo de retención 6,13 minutos, ES+ m/z 1505 [M+ H]⁺, 1527 [M+ Na]⁺; ¹H NMR (400 MHz, d6-DMSO) δ 9,95 (br s, 2H), 8,15 (d, 1H, J = 6,9 Hz), 7,80 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,87 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,71 (br s, 1H), 7,62–7,48 (m, 3H), 7,39 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 7,21–7,12 (m, 2H), 7,06 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 6,99 (s, 2H), 6,82 (s, 1H), 6,76 (s, 1H), 6,72–6,65 (m, 2H), 6,62 (s, 2H), 5,63–5,50 (m, 2H), 5,48–5,40 (m, 2H), 5,31–5,08 (m, 6H), 4,98–4,82 (m, 3H), 4,43–4,34 (m, 1H), 4,21–4,14 (m, 1H), 4,03–3,86 (m, 4H), 3,79 (s x 2, 6H), 3,72–3,61 (m, 2H), 3,38–3,35 (m, 2H), 2,98–2,85 (m, 2H), 2,59–2,42 (m, 2H), 2,23–2,06 (m, 2H), 2,00–1,88 (m, 1H), 1,82–1,68 (m, 4H), 1,74 (s, 6H), 1,61–1,41 (m, 8H), 1,22–1,14 (m, 2H), 1,28 (d, 1H, J = 7,0 Hz), 0,86 (d, 3H, J = 6,7 Hz), 0,82 (d, 3H, J = 6,8 Hz).

25 **Ejemplo 8 – Conjugación**

Conjugado trastuzumab-10 (Conj A)

30 Se agregó una solución de 50 mM de DL-ditiotreitól (DTT) en una solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) pH 7,4 (equivalente/anticuerpo 80 molar, 16 micromoles, 320 µl) a una solución 12,0 ml de anticuerpo, trastuzumab (30 mg, 20 nanomoles) en un amortiguador de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 2,5 mg/ml. La mezcla de reducción se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4-5 horas (o hasta que se observó una reducción total mediante UHPLC) en un agitador orbital con agitación suave (50 rpm). El anticuerpo reducido se intercambió mediante un
 35 amortiguador, a través del uso de una centrifugación de filtro giratorio, en un amortiguador de reoxidación que contiene PBS y EDTA 1 mM para retirar todo el exceso de agente de reducción. Se agregó una solución de ácido dehidroascórbico 50 mM (DHAA, equivalente/anticuerpo 20 molar, 4 micromoles, 80 µl) en DMSO y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave (50 rpm) en una concentración de anticuerpo de 1,5 mg/ml (o se agrega más DHAA y la reacción se deja durante más tiempo hasta
 40 que se observa la reoxidación total de los tioles de cisteína para reformar los disulfuros de cisteína intercatenarios mediante UHPLC). Luego, la mezcla de reoxidación se filtra de forma estéril y se diluye en un amortiguador de conjugación que contiene PBS EDTA 1 mM para una concentración final de anticuerpo de 1,0 mg/ml. Se agregó el

compuesto 10 como una solución de DMSO (equivalente/anticuerpo 10 molar, 1 micromol, en DMSO 1,5 ml) a 13,5 ml de esta solución de anticuerpo reoxidada (15 mg, 100 nanomoles) durante una concentración de DMSO final al 10 % (v/v). La solución se mezcló durante 1,5 horas a temperatura ambiente, luego la conjugación se inactivó mediante adición de N-acetil cisteína (15 micromoles, 150 µl a 100 mM), luego se purificó mediante filtración por centrifugado con el uso de un filtro de centrifugado Amicon Ultracell 50 kDa MWCO de 15 ml, se llevó a cabo una filtración estéril y se analizó.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6 u XB- C18 150 mm x 2,1 mm con elución con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del conj. A 280 nm y 330 nm (específico del Compuesto 10) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas a una molécula única del compuesto 10, consistente con una relación fármaco por anticuerpo (DAR, por sus siglas en inglés) de 1,89 moléculas del compuesto 10 por anticuerpo.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 µm 3,0 x 20 mm) con elución con un amortiguador de SEC filtrado de forma estéril 0,3 ml/minuto que contiene un fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra del Conj A a 280 nm muestra una pureza de monómero de 99 %. El análisis de SEC de UHPLC proporciona una concentración de Conj A final a 1,45 mg/ml en 8,5 ml, la masa obtenida del Conj A es 12,3 mg (rendimiento de 82 %).

Conjugado de tratuzumab-22 (Conj B)

Se agregó una solución de DL-ditiotreitol (DTT) 50 mM en una solución amortiguada por fosfato pH 7,4 (PBS) (equivalente/anticuerpo 80 molar, 42,7 micromoles, 853 µl) a una solución 20,0 ml de anticuerpo trastuzumab (80 mg, 533 nanomoles) en un amortiguador de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminatetracético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 4,0 mg/ml. La mezcla de reducción se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4-5 horas (o hasta que se observe una reducción total mediante UHPLC) en un agitador orbital con agitación suave (60 rpm). El anticuerpo reducido se intercambió mediante un amortiguador, a través del uso de una centrifugación de filtro giratorio, en un amortiguador de reoxidación que contiene PBS y EDTA 1 mM para retirar todo el exceso de agente de reducción. Se agregó una solución de ácido dehidroascórbico 50 mM (DHAA, equivalente/anticuerpo 20 molar, 10,7 micromoles, 213 µl) en DMSO y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave (50 rpm) en una concentración de anticuerpo de 1,5 mg/ml (o se agrega más DHAA y la reacción se deja durante más tiempo hasta que se observa la reoxidación total de los tioles de cisteína para reformar los disulfuros de cisteína intercatenarios mediante UHPLC). Luego, la mezcla de reoxidación se filtra de forma estéril y se diluye en un amortiguador de conjugación que contiene PBS y EDTA 1 mM para una concentración final de anticuerpo de 1,0 mg/ml. Se agregó el compuesto 22 como una solución de DMSO (equivalente/anticuerpo 10 molar, 1,33 micromoles, en DMSO 2,0 ml) a 18,0 ml de esta solución de anticuerpo reoxidada (20 mg, 133 nanomoles) para una concentración de DMSO final al 10 % (v/v). La solución se mezcló durante 1,5 horas a temperatura ambiente, luego la conjugación se inactivó mediante adición de N-acetil cisteína (20 micromoles, 200 µl a 100 mM), luego se purificó mediante filtración giratoria a través del uso de un filtro giratorio MWCO de 50 kDa Amicon Ultracell de 15 ml, se filtró de forma estéril y se analizó.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6u XB-C18 150 mm x 2,1 mm con elución con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del Conj B a 280 nm y 330 nm (específico del Compuesto 22) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas a una molécula única del compuesto 22, consistente con una relación fármaco por anticuerpo (DAR, por sus siglas en inglés) de 1,71 moléculas del compuesto 22 por anticuerpo.

El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 µm 3,0 x 20 mm) con elución con un amortiguador de SEC filtrado de forma estéril 0,3 ml/minuto que contiene un fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra del Conj B a 280 nm muestra una pureza de monómero de 99 %. El análisis de SEC de UHPLC proporciona una concentración del Conj B a 1,39 mg/ml en 10,3 ml, una masa obtenida del Conj B es 14,3 mg (72 % de rendimiento).

Conjugado de tratuzumab-34 (Conj C)

Se agregó una solución de DL-ditiotreitol (DTT) 50 mM en una solución amortiguada por fosfato pH 7,4 (PBS) (equivalente/anticuerpo 80 molar, 42,7 micromoles, 853 µl) a una solución 20,0 ml de anticuerpo trastuzumab (80 mg, 533 nanomoles) en un amortiguador de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminatetracético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 4,0 mg/ml. La mezcla de reducción se dejó para reaccionar a temperatura ambiente durante 4-5 horas (o hasta que se observa una reducción total mediante UHPLC) en un agitador orbital con agitación suave (60 rpm). El anticuerpo reducido se intercambió mediante un amortiguador, a través del uso de una centrifugación de filtro giratorio, en un amortiguador de reoxidación que contiene PBS y EDTA 1 mM para retirar todo el exceso de agente de reducción. Se agregó una solución de ácido dehidroascórbico 50 mM (DHAA, equivalente/anticuerpo 20 molar, 10,7 micromoles, 213 µl) en DMSO y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar

- durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave (50 rpm) en una concentración de anticuerpo de 1,5 mg/ml (o se agrega más DHAA y la reacción se deja durante más tiempo hasta que se observa la reoxidación total de los tioles de cisteína para reformar los disulfuros de cisteína intercatenarios mediante UHPLC). Luego, la mezcla de reoxidación se filtra de forma estéril y se diluye en un amortiguador de conjugación que contiene PBS y EDTA 1 mM para una concentración final de anticuerpo de 1,0 mg/ml. Se agregó el compuesto 34 como una solución de DMSO (equivalente/anticuerpo 10 molar, 1,33 micromoles, en DMSO 2,0 ml) a 18,0 ml de esta solución de anticuerpo reoxidada (20 mg, 133 nanomoles) para una concentración de DMSO final al 10 % (v/v). La solución se mezcló durante 1,5 horas a temperatura ambiente, luego la conjugación se inactivó mediante la adición de N-acetil cisteína (20 micromoles, 200 µl a 100 mM), luego se purificó mediante filtración por centrifugado mediante el uso de un filtro por centrifugado Amicon Ultracell 50 kDa MWCO de 15 ml y purificado adicionalmente en un AKTA™ Start FPLC mediante el uso de una columna GE Healthcare HiLoad™ 26/600 equipada con un Superdex 200 PG con elución con 2,5 ml/min PBS. Las fracciones correspondientes al pico del monómero del Conj C se agruparon, se concentraron mediante el uso de un filtrado por centrifugado Amicon Ultracell 50 kDa MWCO de 15 ml, se filtró de forma estéril y se analizó.
- 15 El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6u XB-C18 150 mm x 2,1 mm con elución con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del conj. C a 280 nm y 330 nm (específico del Compuesto 34) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas a una molécula única del compuesto 34, consistente con una relación fármaco por anticuerpo (DAR, por sus siglas en inglés) de 1,66 moléculas del compuesto 34 por anticuerpo.
- 20 El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 µm 3,0 x 20 mm) con elución con un amortiguador de SEC filtrado de forma estéril 0,3 ml/minuto que contiene un fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra del Conj C a 280 nm muestra una pureza de monómero de 99 %.
- 25 El análisis de SEC de UHPLC proporciona una concentración de Conj C final a 1,36 mg/ml en 10,4 ml, la masa obtenida del Conj C es 14,1 mg (rendimiento de 71 %).

Conjugado de Trastuzumab-10 (Conj D)

- 30 Se agregó una solución de DL-ditiotreitol (DTT) 50 mM en una solución amortiguada por fosfato pH 7,4 (PBS) (equivalente/anticuerpo 150 molar, 40 micromoles, 800 µl) a una solución 16,0 ml de anticuerpo trastuzumab (40 mg, 267 nanomoles) en un amortiguador de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminatetracético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 2,5 mg/ml. La mezcla de reducción se dejó para reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas (o hasta que se observe una reducción total mediante UHPLC) en un agitador orbital con agitación suave (50 rpm). La solución del anticuerpo reducido se intercambió mediante amortiguador (para retirar todo el exceso de agente de reducción), mediante una centrifugación con un filtro de centrifugado, en un amortiguador de conjugación con PBS y EDTA 1 mM para una concentración de anticuerpo final de 2,5 mg/ml. Se agregó el compuesto 10 como una solución de DMSO (equivalente/anticuerpo 25 molar, 1,67 micromoles, en DMSO 0,4 ml) a 3,6 ml de esta solución de anticuerpo reducida (10 mg, 67 nanomoles) para una concentración de DMSO final al 10 % (v/v). La solución se mezcló durante 1,5 horas a temperatura ambiente, luego de la conjugación se inactivó mediante la adición de N-acetil cisteína (8,33 micromoles, 83,3 µl a 100 mM), luego se purificó en un AKTA™ Start FPLC mediante el uso de una columna GE Healthcare HiLoad™ 26/600 equipada con un Superdex 200 PG con elución con 2,5 ml/min PBS. Las fracciones correspondientes al pico del monómero del Conj D se agruparon, se concentraron mediante el uso de un filtrado por centrifugado Amicon Ultracell 50 kDa MWCO de 15 ml, se filtró de forma estéril y se analizó.
- 45 El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6 u XB- C18 150 mm x 2,1 mm con elución con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del conj D a 280 nm y 330 nm (específico del Compuesto 10) muestra una mezcla de cadenas ligeras no conjugadas, cadenas ligeras enlazadas a una molécula simple del Compuesto 10, de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas a hasta tres moléculas del compuesto 10, consistente con una relación fármaco por anticuerpo (DAR, por sus siglas en inglés) de 7,47 moléculas del compuesto 10 por anticuerpo.
- 50 El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 µm 3,0 x 20 mm) con elución con un amortiguador de SEC filtrado de forma estéril 0,3 ml/minuto que contiene un fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra del Conj D a 280 nm muestra una pureza de monómero de 99 %.
- 55 El análisis de SEC de UHPLC proporciona una concentración de Conj D final a 1,90 mg/ml en 4,4 ml, la masa obtenida del Conj A es 8,4 mg (rendimiento de 84 %).

Conjugado trastuzumab-22 (Conj E)

- 60 Se agregó una solución de DL-ditiotreitol (DTT) 50 mM en una solución salina amortiguada por fosfato pH 7,4 (PBS) (equivalente/anticuerpo 150 molar, 40 micromoles, 800 µl) a una solución 16,0 ml de anticuerpo, trastuzumab (40 mg, 267 nanomoles) en un amortiguador de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminatetracético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 2,5 mg/ml. La mezcla de reducción se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas (o hasta que se observe una reducción total mediante UHPLC) en una agitadora orbital con
- 65

agitación suave (50 rpm). La solución de anticuerpo reducido se intercambi6 (para retirar todo el exceso de agente de reducci6n), a trav6s del uso de una centrifugaci6n de filtro giratorio, en un amortiguador de conjugaci6n que contiene PBS y EDTA 1 mM para una concentraci6n final de anticuerpo de 2,5 mg/ml. Se agreg6 el compuesto 22 como una soluci6n de DMSO (equivalente/anticuerpo 25 molar, 1,67 micromoles, en DMSO 0,4 ml) a 3,6 ml de esta soluci6n de anticuerpo reducida (10 mg, 67 nanomoles) para una concentraci6n final de DMSO al 10 % (v/v). La soluci6n se mezcl6 durante 1,5 horas a temperatura ambiente, luego la conjugaci6n se inactiv6 mediante la adici6n de N-acetil cisteina (8,33 micromoles, 83,3 ml a 100), luego se purific6 en un AKTA™ Start FPLC con una columna GE Healthcare HiLoad™ 26/600 equipada con Superdex 200 PG, con eluci6n con PBS 2,5 ml/min. Las fracciones correspondientes al pico de mon6mero del Conj E se agruparon, se concentraron mediante el uso de un filtro giratorio Amicon Ultracell 50 kDa MWCO de 15 ml, se llev6 a cabo una filtraci6n est6ril y se analiz6.

El an6lisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6 u XB-C18 150 mm x 2,1 mm con eluci6n con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del Conj E a 280 nm y 330 nm (específico del Compuesto 22) muestra una mezcla de cadenas ligeras no conjugadas y cadenas ligeras enlazadas a una mol6cula 6nica del compuesto 22, cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas hasta a tres mol6culas del Compuesto 22 consistente con una relaci6n f6rmaco por anticuerpo (DAR, por sus siglas en ingl6s) de 7,39 mol6culas del compuesto 22 por anticuerpo.

El an6lisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 µm 3,0 x 20 mm) con eluci6n con un amortiguador de SEC filtrado de forma est6ril 0,3 ml/minuto que contiene un fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra del Conj E a 280 nm muestra una pureza de mon6mero de 96 %. El an6lisis de SEC de UHPLC proporciona una concentraci6n del Conj E a 1,93 mg/ml en 4,6 ml, la masa obtenida del Conj E es 8,9 mg (rendimiento de 89 %).

Conjugado de tratuzumab-34 (Conj F)

Se agreg6 una soluci6n de DL-ditiotreitol (DTT) 50 mM en una soluci6n salina amortiguada por fosfato pH 7,4 (PBS), (equivalente/anticuerpo 150 molar, 10 micromoles, 200 µl) a una soluci6n de 4,0 ml de anticuerpo (10 mg, 66,7 nanomoles) en un amortiguador de reducci6n que contiene PBS y 6cido etilendiaminatetrac6tico (EDTA) 1 mM y una concentraci6n final de anticuerpo de 2,5 mg/ml. La mezcla de reducci6n se dej6 para reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas (o hasta que se observa una reducci6n total mediante UHPLC) en un agitador orbital con agitaci6n suave (50 rpm). La soluci6n del anticuerpo reducido se intercambi6 mediante amortiguador (para retirar todo el exceso de agente de reducci6n), mediante una centrifugaci6n con un filtro de centrifugado, en un amortiguador de conjugaci6n con PBS y EDTA 1 mM para una concentraci6n de anticuerpo final de 2,5 mg/ml. Se agreg6 el compuesto 34 como una soluci6n de DMSO (equivalente/anticuerpo 25 molar, 1,67 micromoles, en DMSO 0,4 ml) a 3,6 ml de esta soluci6n de anticuerpo reducida (10 mg, 67 nanomoles) para una concentraci6n de DMSO final al 10 % (v/v). La soluci6n se mezcl6 durante 0,75 horas a temperatura ambiente, luego de la conjugaci6n se inactiv6 mediante la adici6n de N-acetil cisteina (8,33 micromoles, 83,3 µl a 100 mM), luego se purific6 en un AKTA™ Start FPLC mediante el uso de una columna GE Healthcare HiLoad™ 26/600 equipada con un Superdex 200 PG con eluci6n con 2,5 ml/min PBS. Las fracciones correspondientes al pico de Conj F se agruparon, se concentraron mediante un filtro de centrifugado Amicon Ultracell 50 kDa MWCO de 15 ml, se repurific6 en un AKTA™ Start FPLC mediante el uso de una columna GE Healthcare HiLoad™ 26/600 equipado con Superdex 200 PG, con eluci6n con PBS 2,5 ml/min. Las fracciones correspondientes al pico del Conj F se agruparon, se concentraron mediante el uso de un filtrado por centrifugado Amicon Ultracell 50 kDa MWCO de 15 ml, se filtr6 de forma est6ril y se analiz6.

El an6lisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6 u XB-C18 150 mm x 2,1 mm con eluci6n con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del conj. F a 280 nm y 330 nm (específico del Compuesto 34) muestra una mezcla de cadenas ligeras no conjugadas, cadenas ligeras enlazadas a una mol6cula simple del Compuesto 34, de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas a hasta tres mol6culas del compuesto 34, consistente con una relaci6n f6rmaco por anticuerpo (DAR, por sus siglas en ingl6s) de 7,41 mol6culas del compuesto 34 por anticuerpo.

El an6lisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 µm 3,0 x 20 mm) con eluci6n con un amortiguador de SEC filtrado de forma est6ril 0,3 ml/minuto que contiene un fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra del Conj F a 280 nm muestra una pureza de mon6mero de 0 % (d6mero-tr6mero 100 %). El an6lisis de SEC de UHPLC proporciona una concentraci6n de Conj F final a 1,09 mg/ml en 4,4 ml, la masa obtenida del Conj F es 4,8 mg (rendimiento de 48 %).

Conjugado Tratuzumab-58 (Conj G)

Se agreg6 una soluci6n de ditiotreitol (DTT) 50 mM en una soluci6n salina amortiguada por fosfato pH 7,4 (PBS), (equivalente/anticuerpo 120 molar, 32 micromoles, 0,64 ml a 50 mM) a una soluci6n 3,7 ml de anticuerpo (40 mg, 0,267 micromoles) en un amortiguador de reducci6n que contiene PBS y 6cido etilendiaminatetrac6tico (EDTA) 1 mM y una concentraci6n final de anticuerpo de 2,0 mg/ml. La mezcla de reducci6n se calent6 a +25 °C durante 4 horas (o

5 hasta que se observe una reducción total mediante UHPLC) en un agitador orbital con agitación suave (60 rpm). Luego de enfriar hasta temperatura ambiente, el anticuerpo reducido se intercambi6 mediante el uso de un filtro giratorio MWCO vivaspin 50 kDa, en un amortiguador de reoxidaci6n con PBS pH 7,4 y EDTA 1 mM para eliminar todo el exceso de agente de reducci6n. Se agreg6 una soluci6n de 6cido dehidroasc6rbico 50 mM (DHAA, 10 equivalente/anticuerpo 20 molar, 5,3 micromoles, 0,1 ml a 50 mM) en DMSO y la mezcla de reoxidaci6n se dej6 reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente con agitaci6n suave (60 rpm) en una concentraci6n de anticuerpo de ~2,0 mg/ml (o hasta que se observ6 la reoxidaci6n total de los tioles de cisteina para reformar los disulfuros de cisteina intercatenarios mediante UHPLC). La mezcla de reoxidaci6n se centrifug6 durante 3 min a 4000 rpm y luego se filtr6 de forma est6ril mediante el uso del filtro de membrana de 0,22 μ m. Se agreg6 el compuesto 58 como una soluci6n de DMSO (equivalente/anticuerpo 11 molar, 1,46 micromoles, en DMSO 0,9 ml) a 9,1 ml de esta soluci6n de anticuerpo reoxidada (20 mg, 0,13 micromoles) para una concentraci6n de DMSO final al 10 % (v/v). La soluci6n se agit6 durante 3 horas a +25 $^{\circ}$ C y luego la conjugaci6n se inactiv6 con N-acetil cisteina (7,3 micromoles, 0,07 ml a 100 mM).

15 El exceso de f6rmaco libre se retir6 el filtro giratorio mediante el uso de MWCO vivaspin 50 kDa, en un amortiguador con PBS pH 7,4. La extensi6n del retiro del f6rmaco libre se monitore6 mediante UHPLC-RP con el uso de un conjugado puro. Luego del retiro completo del f6rmaco libre, el Conj G se filtr6 mediante el uso de un filtro Mustang de 0,22 μ m en una atm6sfera est6ril y luego se almacen6 a +4 $^{\circ}$ C.

20 El an6lisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6 u XB- C18 150 x 2,1 mm con eluci6n con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del conjugado a 214 nm y 330 nm (específico del Compuesto 58) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas a una mol6cula 6nica del compuesto 58, consistente con una relaci6n f6rmaco por anticuerpo (DAR, por sus siglas en ingl6s) de 1,83 mol6culas del compuesto 58 por anticuerpo.

25 El an6lisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μ m 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 μ m 3,0 x 20 mm) con eluci6n con un amortiguador de SEC filtrado de forma est6ril 0,3 ml/minuto que contiene un fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra de Conj G a 280 nm muestra una pureza de mon6mero de m6s de 99 %. El an6lisis de SEC de UHPLC proporciona una concentraci6n de Conj G final a 1,34 mg/ml en 8,9 ml, la masa obtenida del Conj G es 11,9 mg (rendimiento de 60 %).

Conjugado de tratuzumab-59 (Conj H)

35 El anticuerpo (30 mg) se carg6 en el soporte s6lido y se redujo, se reoxid6, se conjug6 en el Compuesto 59, se purific6, se liber6 de la resina y se formul6 en histidina 25 mM, sacarosa 200 mM, Tween-20 al 0,02 %, pH 6,0 de acuerdo con el m6todo descrito en US20140037961A1.

40 El an6lisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6 u XB-C18 150 x 2,1 mm con eluci6n con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del conjugado a 214 nm y 330 nm (específico del Compuesto 59) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas a una 6nica mol6cula del Compuesto 59, de forma consistente con una relaci6n f6rmaco por anticuerpo (DAR) de 1,9 mol6culas del compuesto 59 por anticuerpo.

45 El an6lisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 μ m 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 μ m 3,0 x 20 mm) con eluci6n con un amortiguador de SEC filtrado de forma est6ril 0,3 ml/minuto que contiene un fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra de Conj H a 280 nm muestra una pureza de mon6mero de m6s de 97 %. El an6lisis de SEC de UHPLC proporciona una concentraci6n de Conj H final a 1,49 mg/ml en 7,5 ml, la masa obtenida del Conj H es 11,2 mg (rendimiento de 37 %).

Conjugado de tratuzumab-48 (Conj I)

55 Se agreg6 una soluci6n de ditioneitol (DTT) 50 mM en una soluci6n salina amortiguada por fosfato pH 7,4 (PBS), (equivalente/anticuerpo 80 molar, 21,4 micromoles, 0,43 ml a 50 mM) a una soluci6n 3,7 ml de anticuerpo (40 mg, 0,267 micromoles) en un amortiguador de reducci6n que contiene PBS y 6cido etilendiaminatetrac6tico (EDTA) 1 mM y una concentraci6n final de anticuerpo de 2,0 mg/ml. La mezcla de reducci6n se calent6 a +25 $^{\circ}$ C durante 4 horas (o hasta que se observa una reducci6n total mediante UHPLC) en un agitador orbital con agitaci6n suave (60 rpm). Luego de enfriar hasta temperatura ambiente, el anticuerpo reducido se intercambi6 mediante un amortiguador, a trav6s del uso de un filtro giratorio con un vivaspin MWCO 50 kDa, en un amortiguador de reoxidaci6n que contiene PBS pH 7,4 y EDTA 1 mM para retirar todo el exceso de agente de reducci6n. Se agreg6 una soluci6n de 6cido dehidroasc6rbico (DHAA, equivalente/anticuerpo 20 molar, 5,3 micromoles, 0,1 ml a 50 mM) 50 mM en DMSO y la mezcla de reoxidaci6n se permiti6 reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente con agitaci6n suave (60 rpm) en una concentraci6n de anticuerpo de ~2,0 mg/ml (o hasta que se observ6 la reoxidaci6n total de los tioles de cisteina para reformar los disulfuros de cisteina intercatenarios mediante UHPLC). Luego, la mezcla de reoxidaci6n se centrifug6 durante 3 min a 4000 rpm y luego se filtr6 mediante el uso de un filtro de membrana de 0,22 μ m. Se agreg6 el Compuesto 48 como

una solución de DMSO (equivalente/anticuerpo 11 molar, 1,46 micromoles, en DMSO 1,7 ml) a 16,8 ml de esta solución de anticuerpo reoxidada (20 mg, 0,13 micromoles) para una concentración final de DMSO al 10 % (v/v). La solución se agitó durante 3 horas a +25 °C y luego la conjugación se inactivó con N-acetil cisteína (7,3 micromoles, 0,07 ml a 100 mM).

5 El exceso de fármaco libre se retiró con el filtro giratorio mediante el uso de MWCO vivaspin 50 kDa en PBS con amortiguador pH 7,4. La extensión del retiro del fármaco libre se monitoreó mediante UHPLC-RP con el uso de un conjugado puro. Luego de una eliminación completa del fármaco libre, el ADC se filtró mediante el uso de 0,22 µm, filtro Mustang en una atmósfera estéril y luego se almacenó a +4 °C.

10 El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6 u XB-C18 150 x 2,1 mm con elución con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del conjugado a 214 nm y 330 nm (específico del Compuesto 48) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas a una molécula única del compuesto 48, de forma consistente con una relación fármaco por anticuerpo (DAR, por sus siglas en inglés) de 1,86 moléculas del compuesto 48 por anticuerpo.

15 El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 µm 3,0 x 20 mm) con elución con un amortiguador de SEC filtrado de forma estéril 0,3 ml/minuto que contiene fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra de Conj I a 280 nm muestra una pureza de monómero de más de 99 %. El análisis de SEC de UHPLC proporciona una concentración de Conj I final a 1,7 mg/ml en 7,3 ml, la masa obtenida del Conj I es 12,4 mg (rendimiento de 62 %).

25 *Conjugado de Tratzumab-57 (Conj J)*

Se agregó una solución de ditioneitol (DTT) en una solución salina amortiguada por fosfato pH 7,4 (PBS), (equivalente/anticuerpo 80 molar, 21,4 micromoles, 0,43 ml a 50 mM) a una solución 3,7 ml de anticuerpo (40 mg, 0,267 micromoles) en un amortiguador de reducción que contiene PBS y ácido etilendiaminatetracético (EDTA) 1 mM y una concentración final de anticuerpo de 2,0 mg/ml. La mezcla de reducción se calentó a +25 °C durante 4 horas (o hasta que se observe una reducción total mediante UHPLC) en un agitador orbital con agitación suave (60 rpm). Luego de enfriar hasta temperatura ambiente, el anticuerpo reducido se intercambió mediante un amortiguador, a través del uso de un MWCO 50 kDa vivaspin, en un amortiguador de reoxidación que contiene PBS pH 7,4 y EDTA 1 mM para retirar todo el exceso de agente de reducción. Se agregó una solución de ácido dehidroascórbico 50 mM (DHAA, equivalente/anticuerpo 20 molar, 5,3 micromoles, 0,1 ml a 50 mM) en DMSO y la mezcla de reoxidación se dejó reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente con agitación suave (60 rpm) en una concentración de anticuerpo de ~2,0 mg/ml (o hasta que se observó la reoxidación total de los tioles de cisteína para reformar los disulfuros de cisteína intercatenarios mediante UHPLC). La mezcla de reoxidación se centrifugó durante 3 min a 4000 rpm y luego se filtró de forma estéril mediante el uso del filtro de membrana de 0,22 µm. Se agregó el compuesto 57 como una solución de DMSO (equivalente/anticuerpo 11 molar, 1,46 micromoles, en DMSO 1,7 ml) a 16,8 ml de esta solución de anticuerpo reoxidada (20 mg, 0,13 micromoles) para una concentración de DMSO final al 10 % (v/v). La solución se agitó durante 3 horas a +25 °C y luego la conjugación se inactivó con N-acetil cisteína (7,3 micromoles, 0,07 ml a 100 mM).

45 El exceso de fármaco libre se retiró mediante el filtro de centrifugado mediante MWCO vivaspin 50 kDa en PBS con amortiguador pH 7,4. La extensión del retiro del fármaco libre se monitoreó mediante UHPLC-RP con el uso de un conjugado puro. Luego de una eliminación completa del fármaco libre, el ADC se filtró mediante el uso de 0,22 µm, filtro Mustang en una atmósfera estéril y luego se almacenó a +4 °C.

50 El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence mediante el uso de una columna Phenomenex Aeris 3,6 u XB- C18 150 x 2,1 mm con elución con un gradiente de agua y acetonitrilo en una muestra reducida del conjugado a 214 nm y 330 nm (específico del Compuesto 57) muestra cadenas ligeras no conjugadas y una mezcla de cadenas pesadas no conjugadas y cadenas pesadas enlazadas a una molécula única del compuesto 57, consistente con una relación fármaco por anticuerpo (DAR, por sus siglas en inglés) de 1,87 moléculas del compuesto 57 por anticuerpo.

55 El análisis de UHPLC en un sistema Shimadzu Prominence con una columna Tosoh Bioscience TSKgel SuperSW mAb HTP 4 µm 4,6 x 150 mm (con una columna de guardia de 4 µm 3,0 x 20 mm) con elución con un amortiguador de SEC filtrado de forma estéril 0,3 ml/minuto que contiene un fosfato de potasio 200 mM pH 6,95, cloruro de potasio 250 mM e isopropanol al 10 % (v/v) en una muestra del Conj J a 280 nm muestra una pureza de monómero mayor a 100 %. El análisis de SEC de UHPLC proporciona una concentración del Conj J a 0,86 mg/ml en 10,3 ml, masa obtenida del Conj J es 8,9 mg (rendimiento de 45 %).

Ejemplo 9

65 *Evaluación in vitro del Conjugado 10*

Se colocaron en placas células DU145 (2000/pocillo, ensayo de 72 horas) y MDA-MB-361 (5000/pocillo, ensayo de 144 horas) en medio de cultivo en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido en un volumen de 80 µl por pocillos y se deja adherir durante la noche. Para diluciones de carga útil, primero se preparó una concentración de 60 X de cada dosis a ser evaluada mediante la dilución de los artículos de evaluación en DMSO. Las diluciones 60 X de la carga útil se diluyeron luego adicionalmente hasta un concentración de 5x en un medio de cultivo celular solo o un medio de cultivo celular con enzima β-glucuronidasa 5x (Sigma Cat n.º G0799-25KU). 20 µl de medio de cultivo celular con un artículo de prueba +/- enzima se agregaron a las células en pocillos triplicados, y la curva de dosis final varió de 6,4 nM a 61 pM en series de dilución en serie 1:4 en etapas. El DMSO solo se diluyó en un medio de cultivo se utilizó como los controles. Las células tratadas se cultivaron a 37 °C/5 % de CO₂ durante 72 a 144 horas (dependiendo de las cinéticas de crecimiento establecidas de cada línea celular particular). En el final del ensayo, se utilizó el ensayo de viabilidad de luminiscencia CellTiter-Glo® (CTG) (Promega) para determinar la citotoxicidad relativa. Se agregaron 100 µl de reactivo CTG a cada pocillo y las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave, se leyó la absorbancia de cada muestra a 560 nM mediante el uso de un luminómetro EnVision (Perkin Elmer). Se calculó el porcentaje de viabilidad celular mediante la fórmula a continuación:

(luminiscencia promedio de muestras tratadas/luminiscencia promedio de muestras de control) x 100.

Los valores IC₅₀ se determinaron mediante el uso de un análisis de regresión no lineal logístico con un software GraphPad.

Compuesto 10	Sin glucuronidasa	Con glucuronidasa
DU145 – IC ₅₀	6,84 µM	201 nM
MDA-MB-361-IC ₅₀	778 nM	32 nm

Evaluación in vitro del Conj A









Se utilizó un método similar como se describe anteriormente con células MDA-MB-361 (HER2 altas, 5000 células/pocillo, ensayo de 144 horas) y MCF-7 (HER2 bajas, 1500 células/pocillo, ensayo de 144 horas). La densidad de colocación de células en placas y la duración del ensayo se determinaron en función de las cinéticas de crecimiento de cada línea celular en particular. Una concentración de 5x de cada dosis de ADC a ser evaluada se preparó mediante la dilución de los artículos de evaluación en medio de cultivo. Se agregaron veinte µl de ADC a las células en pocillos triplicados con una curva de dosis final que varió de 3 µg/ml a 11 pg/ml en una serie de dilución serial 1:4. Las células tratadas se cultivaron a 37 °C / 5 % de CO₂ durante 144 horas y se utilizó el ensayo de viabilidad luminiscente CellTiter-Glo® (CTG) (Promega) para determinar la citotoxicidad relativa como se describe anteriormente.

IC ₅₀	MDA-MB-361	MCF-7
Conj A	14,5 ng/µl	~3 µg/µl

Evaluación del Conj B y el Conj C en células con inactivación de ARNip de β-glucuronidasa

Las células SKOV3 con sobreexpresión de HER2 se sometieron a transfección inversa para inactivar los niveles de expresión de GUSB. En primer lugar, una solución madre de 4x de RNAiMAX (concentración final de 0,125 µl/pocillo, Life Technologies) y una solución madre de 4x de oligos ARNip (ARNip sin direccionamiento/negativo, ARNip de GAPDH y GUSB, concentración final de ARNip de 100 nM/pocillo, Life Technologies) se prepararon en medio OptiMEM. Se incluyó solamente una mezcla de RNAiMAX/OptiMEM como el control de lípido. La solución de RNAiMAX de 4x y las soluciones de ARNip de 4x se llevaron a 2x mediante la mezcla en una relación uno a uno, y la mezcla RNAiMAX/ARNip se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego de la incubación, 40 µl de las mezclas de RNAiMAX/ARNip y el control de lípido se agregaron por pocillo en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido y 40 µl de la solución celular se agregaron en la mezcla lípido/ARNip, con una densidad de colocación en placas final de 2000 células/pocillo. Las placas se cultivaron a 37 °C/5 % de CO₂ durante 72 horas, punto en el cual 20 µl de una concentración de 5x de cada dosis del Conj B/Conj C se agregaron en las células en pocillos duplicados con una curva de dosis final que varía de 10 µg/ml a 0,15 ng/ml en una serie de dilución serial 1:4. Las células tratadas con ADC se cultivaron a 37 °C / 5 % de CO₂ durante 72 horas adicionales y se utilizó el ensayo de viabilidad luminiscente CellTiter-Glo® (CTG) (Promega) para determinar la citotoxicidad relativa como se describe anteriormente. La eficacia de la inactivación del ARNip se determinó mediante niveles de expresión de ARN y medición de la actividad de enzimas β-glucuronidasa.

Los resultados se muestran en LA Figura 1 (Conj B) y la Figura 2 (Conj C), donde se utilizan los siguientes símbolos.

	Sin transfectar
	Solo lípido
	Ne ARNip oligo2
	GUSB oligo3
	GAPDH oligo2
	Neg2 ARNip tox
	GUSB ARNip tox
	GAPDH ARNip tox

IC ₅₀ (ng/ml)	Sin transfectar	Neg oligo2	ARNip	Lípido solamente	GUSB oligo3	GAPDH oligo2
ConjB	12,66	18,19		13,1	26,05	27,84
ConjC	4,871	13,07		5,818	31,59	23,00

Ejemplo 10 - Evaluación in vitro

- 5 El medio a partir de un cultivo celular subconfluente (80-90 % de confluencia) en un matraz T75 se aspiró y el matraz se enjuagó con PBS (alrededor de 20 ml) y se vació. Se agregó tripsina-EDTA (5 ml), el matraz regresó a la incubadora con gas a 37 °C durante hasta alrededor de 5 minutos, luego se golpeó fuertemente para desprender y disociar las células del plástico. La suspensión celular se transfirió a un tubo de centrifugación con tapa de rosca de 50 ml estéril, se diluyó con el medio de crecimiento a un volumen final de 15 ml, luego se sometió a centrifugación (400 g, durante 10 5 min). Se aspiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un medio de cultivo 10 ml. Puede ser necesario el pipeteado reiterado para producir suspensiones celulares monodispersas. La concentración y viabilidad celular se miden a partir de células teñidas con azul tripano, y se cuentan con un contador celular automático LUNA-II™. Las células se diluyeron hasta 2x10⁵/ml, se dispensaron (50 µl/pocillo) en placas de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante la noche antes del uso.
- 15 Una solución madre (1 ml) del conjugado de anticuerpo fármaco (20 µg/ml) se llevó a cabo mediante la dilución del ADC esterilizado por filtro en el medio de cultivo celular. Un conjunto de diluciones de 8 x 10 veces de ADC madre se llevó a cabo en una placa de 24 pocillos mediante transferencia en serie de 100 µl en 900 µl de medio de cultivo celular.
- 20 La dilución de ADC se dispensó (50 µl/pocillo) en 4 pocillos replicados de la placa de 96 pocillos, que contienen una suspensión celular 50 µl sembrada el día anterior. Los pocillos de control recibieron medio de cultivo celular 50 µl. La placa de 96 pocillos que contienen células y los ADC se incubaron en 37 °C en una incubadora con gas CO₂ durante el tiempo de exposición.
- 25 Al final del período de incubación, al se midió la viabilidad celular mediante un ensayo MTS. El MTS (Promega) se dispensó (20 µl por pocillo) en cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37 °C en la incubadora con gas CO₂. Se

midió la absorbancia del pocillo a 490 nm. Se calculó el porcentaje de supervivencia celular a partir de la absorbancia promedio en los 4 pocillos tratados con ADC en comparación con la absorbancia promedio en 4 pocillos no tratados de control (100 %). Se determinó IC₅₀ a partir de los datos de respuesta a la dosis mediante el uso de GraphPad Prism a través de un algoritmo de ajuste de curva no lineal: sigmoide, 4PL X es log(concentración).

5

Línea celular	Descripción	Exposición a ADC	Medio de crecimiento celular
MDA MB 468	HER2 negativas, Carcinoma de mama	4 días	RPMI 1640 con glutamax, 10 % (v/v) de suero bovino fetal HyClone™
NCIN87	Carcinoma gástrico	7 días	RPMI 1640 con glutamax, 10 % (v/v) de suero bovino fetal HyClone™

ADC	IC ₅₀ (nM) en:	
	MDMA MB 468	NCI-N87
	Conj A	>100
Conj B	>100	0,0222
Conj C	68	0,0013
Conj D	>100	0,185
Conj E	>100	0,0023
Conj F	81	0,0003

ADC	EC ₅₀ (µg/ml)
ConjA	0,0133
ConjB	0,00141
ConjC	0,00000187
ConjD	0,00271
ConjE	0,00000203
ConjF	3 x 10 ⁻¹⁶
ConjG	0,00369
ConjH	0,000496
ConjI	0,00844
ConjJ	0,0829

Ejemplo 11 – Evaluación de xenoinjertos

10

Ratones xenoinjertados NCI-N87

Los ratones hembra con inmunodeficiencia combinada grave (Fox Chase SCID®, C.B-17/lcr-Prkdcscid, Charles River) tuvieron diez semanas de edad con un intervalo de peso corporal (PC) de 16,5 a 21,1 gramos en el Día 1 del estudio. Los animales fueron alimentados como se deseó con agua (ósmosis inversa, 1 ppm Cl) y Lab Diet® NIH 31 modificada e irradiada que consiste en proteína en bruto al 18,0 %, grasa en bruto al 5,0 % y fibra en bruto al 5,0 %. Los ratones se alojaron en un lecho para animales de laboratorio de Enricho'cobs™ irradiado en microaisladores estático en un ciclo ligero de 12 horas a 20-22 °C (68-72 °F) y 40-60 % de humedad. CR Discovery Services cumple específicamente con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio con respecto a restricción, cuidados, procedimientos quirúrgicos, alimentación y regulación del fluido y cuidados veterinarios. El programa de cuidado y uso animal en CR Discovery Services se acredita por la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC, por sus siglas en inglés), que asegura el cumplimiento con estándares aceptados para el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

25

Cultivo de células tumorales

Se cultivaron células NCI-N87 de linfoma de carcinoma gástrico en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina 2 mM, penicilina 100 unidades/ml, sulfato de estreptomycin 100 µg/ml y gentamicina 25 µg/ml. Las células se cultivaron en frascos de cultivo de tejido en una incubadora humidificada a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % y aire al 95 %.

30

Implante in vivo y crecimiento tumoral

Las células NCI-N87 utilizadas para el implante se recolectaron durante el crecimiento de fase log y se resuspendieron en una solución salina amortiguada por fosfato (PBS) que contiene Matrigel™ al 50 % (BD Biosciences). En el día del implante tumoral, cada ratón de prueba se inyectó de forma subcutánea en el flanco derecho con 1 x 10⁷ células (0,1 ml de suspensión celular) y el crecimiento tumoral se monitoreó a medida que el tamaño promedio alcanzó el intervalo diana de 100 a 150 mm³. Catorce días después, designado como el día 1 del estudio, los ratones se clasifican de acuerdo con el tamaño tumoral calculado en grupos, cada uno consiste en diez animales con volúmenes tumorales individuales que varían de 108 a 144 mm³ y volúmenes tumorales promedio grupales de 115 mm³.

40

Los tumores se midieron en dos dimensiones mediante el uso de calibres y el volumen se calculó mediante el uso de la fórmula:

$$5 \quad \text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

donde w = ancho y l = longitud, en mm, del tumor. El peso tumoral puede estimarse asumiendo que 1 mg es equivalente a 1 mm³ de volumen tumoral.

10 *Tratamiento*

El tratamiento comienza el día 1 en grupos de 10 ratones (n = 10) con tumores subcutáneos establecidos NCI-N87 (108-144 mm³). Se administró trastuzumab-10 de forma intravenosa una vez en el día 1 (qd x 1). Un grupo tratado con un vehículo funcionó como el grupo de control para el análisis de eficacia. Los tumores se midieron dos veces por semana hasta que el estudio finalizó en el día 79. Cada ratón se sometió a eutanasia cuando su tumor alcanzó un volumen de referencia de 800 mm³ o en el día final, lo que haya sucedido primero. El tiempo hasta la referencia (TTE, por sus siglas en inglés) se calculó para cada ratón.

El resultado del tratamiento se determinó a partir del porcentaje de demora del crecimiento tumoral (% TGD, por sus siglas en inglés), definido como el aumento del porcentaje de la mediana de TTE para los ratones tratados con respecto a los de control, con diferencias entre grupos considerados estadísticamente diferentes en $P \leq 0,05$ mediante el uso de un análisis de supervivencia logrank. Los ratones se monitorearon para determinar respuestas a la regresión total (RT) y regresión parcial (RP).

La tolerabilidad al tratamiento fue evaluada mediante mediciones de peso corporal y una observación frecuente para determinar indicios de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. La tolerabilidad al tratamiento fue evaluada mediante mediciones de peso corporal y una observación frecuente para determinar indicios de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Todos los regímenes fueron tolerados de forma satisfactoria. La mediana del TTE para los controles tratados con vehículo un fue de 50,7 días, lo que establece un TGD posible máximo de 28,3 días (56 %) para el estudio de 79 días.

Se definió la dosis eficaz mínima como la dosificación mínima exigida para producir la estasis tumoral durante veintiocho días luego de la administración del artículo de evaluación. En función de la inspección visual de las gráficas de volumen tumoral media y mediana y el cambio de porcentaje del volumen tumoral del día 1, el trastuzumab-10 (Conj A) a 1,0 mg/kg pareció ser la dosificación que logró una respuesta consistente con la dosis eficaz mínima.

Dos de los animales del grupo de 0,3 mg/kg fueron sobrevivientes del final del estudio con un MTV de 708 mm³. Ocho de los animales del grupo de 1,0 mg/kg fueron sobrevivientes del final del estudio con un MTV de 650 mm³. Los resultados se ilustran en la Figura 3.

Ratones xenoinjertados JIMT-1

Ratones

Los ratones hembra con inmunodeficiencia combinada grave (Fox Chase SCID®, CB17/lcr-Prkdcscid/lcrIcoCrl, Charles River) tuvieron diez semanas de edad con un intervalo de peso corporal (PC) de 15,1 a 22,2 g en el Día 1 del estudio.

Cultivo de células tumorales

Se cultivaron células de carcinoma de mama humano JIMT-1 en DMEM con suero bovino fetal al 10 %, 100 unidades/m de penicilina G de sodio, 100 µg/ml de sulfato de estreptomina, 25 µg/ml de gentamicina y 2 mM de glutamina. Los cultivos celulares se mantuvieron en frascos de cultivo de tejido en una incubadora humidificada a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % y aire al 95 %.

Implante in vivo y crecimiento tumoral

Las células JIMT-1 utilizadas para el implante se recolectaron durante el crecimiento exponencial y se resuspendieron en Matrigel™ al 50 % (BD Biosciences); solución salina amortiguada por fosfato al 50 % en una concentración de 5 x 10⁷ células/ml. En el día del implante tumoral, cada ratón de prueba se inyectó de forma subcutánea en el flanco derecho con células 1 x 10⁷ (suspensión celular 0,2 ml) y el crecimiento tumoral se monitoreó a medida que el tamaño promedio alcanzó el intervalo diana de 100 a 150 mm³. Los tumores se midieron en dos dimensiones mediante el uso de calibres y el volumen se calculó mediante el uso de la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \cdot l}{2}$$

donde w = ancho y l = longitud, en mm, del tumor. El peso tumoral puede estimarse con la asunción que 1 mg es equivalente a 1 mm³ de volumen tumoral.

5

Tratamiento

El tratamiento comienza el día 1 en grupos de 10 ratones (n = 10) con tumores subcutáneos establecidos JIMT-1 con intervalo de volumen (88-196 mm³) y un grupo de volumen tumoral medio de 120 a 122 mm³. Se administró trastuzumab-10 (Conj A) de forma intravenosa una vez en el día 1 (qd x 1). Un grupo tratado con un vehículo funcionó como el grupo de control para el análisis de eficacia. Los tumores se midieron dos veces por semana hasta que el estudio finalizó en el día 59. Cada ratón se sometió a eutanasia cuando su tumor alcanzó un volumen de referencia de 1000 mm³ o en el día final, lo que haya sucedido primero. El tiempo hasta la referencia (TTE, por sus siglas en inglés) se calculó para cada ratón.

15

El resultado del tratamiento se determinó a partir del porcentaje de demora del crecimiento tumoral (% TGD, por sus siglas en inglés), definido como el aumento del porcentaje de la mediana de TTE para los ratones tratados con respecto a los de control, con diferencias entre grupos considerados estadísticamente diferentes en P ≤ 0,05 mediante el uso de un análisis de supervivencia logrank. Los ratones se monitorearon para determinar respuestas a la regresión total (RT) y regresión parcial (RP).

20

La tolerabilidad al tratamiento fue evaluada mediante mediciones de peso corporal y una observación frecuente para los signos de los efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Todos los regímenes fueron tolerados de forma satisfactoria. El TTE de mediana para los controles tratados con vehículo fue de 48,4 días, lo que establece un TGD máximo posible de 10,6 días (22 %) durante el estudio de 59 días. Todos los regímenes de ADC evaluados produjeron un beneficio de supervivencia en comparación con los controles tratados con vehículo (P<0,01).

25

Se definió la dosis eficaz mínima como la dosificación mínima exigida para producir la estasis tumoral durante veintiocho días luego de la administración del artículo de evaluación. En función de la inspección visual de las gráficas de volumen tumoral media y mediana y el cambio de porcentaje del volumen tumoral del día 1, el trastuzumab-10 (Conj A) a 1,0 mg/kg pareció ser la dosificación que logró una respuesta consistente con la dosis eficaz mínima.

30

Se observó un efecto dependiente de la dosis donde el volumen tumoral medio del grupo de 0,3 mg/kg aumentó lentamente a lo largo del día 34 luego evolucionó posteriormente, mientras que el grupo de 1,0 mg/kg mostró un volumen tumoral medio estático a lo largo del día 38 que evolucionó posteriormente. El TTE medio para el grupo de 0,3 mg/kg fue de 56,9 días correspondientes a un TGD significativo de 8,5 días (18 %) con respecto al control (P < 0,05). El grupo de 0,3 mg/kg no tuvo respuestas de regresión objetivas. Cinco de los animales del grupo de 0,3 mg/kg fueron sobrevivientes del final del estudio con un MTV de 486 mm³.

35

La mediana del TTE para el grupo de 1,0 mg/kg fue de 59,0 días máximo correspondiente a un TGD significativo de 10,6 días (22 %) con respecto al control (P < 0,001). El grupo de 1,0 mg/kg no tuvo respuestas de regresión objetivas. Nueve de los animales del grupo de 1,0 mg/kg fueron sobrevivientes del "final del estudio" con un MTV de 446 mm³. Los grupos de 0,3 y 1,0 mg/kg fueron significativamente diferentes entre sí (P < 0,05).

40

Los resultados se ilustran en la Figura 4.

45

Ejemplo 12 - Estudios de toxicidad/índice terapéutico

Estudio en ratas:

50

Se utilizó un estudio de toxicidad de dosis única para determinar la dosis máxima tolerada (MTD, por sus siglas en inglés) y el perfil de seguridad de Trastuzumab-10 (Conj A). Se dosificaron ratas Sprague Dawley macho (ENVIGO) una vez mediante inyección en bolo intravenosa lenta a través de la vena de la cola con el control de vehículo (Histidina 25 mM, sacarosa 200 mM pH 6,0) o material de prueba (Conj A). Los parámetros evaluados durante el estudio incluyeron mortalidad, exámenes físicos, observaciones en jaulas, pesos corporales, cambios en el peso corporal, patología clínica (química clínica, hematología y coagulación) y hallazgo de macropatologías. Todos los animales en los grupos 1-6 se sacrificaron en el día de estudio (DE) 29, salvo un animal del grupo 6 que fue sacrificado en el día de estudio (DE) 25.

55

Grupo	Tratamiento	Dosis Vía	Dosis (mg/kg)	Frecuencia	Ratas macho
					Estudio principal N
1	Control	IV	0	Única	5
2	Conj A	IV	4	Única	5
3	Conj A	IV	6	Única	5
4	Conj A	IV	8	Única	5
5	Conj A	IV	12	Única	5
6	Conj A	IV	14	Única	5

Control = Histidina-HCl 25 mM, sacarosa 200 mM, pH 6,0.

5 La tolerabilidad se determinó en función de las referencias de toxicidad, que incluyen disminución de reticulocitos absolutos, glóbulos blancos y componentes celulares, así como también lesiones macroscópicas y microscópicas en los pulmones. El hallazgo mayor en niveles de dosis de ≥ 4 mg/kg fueron observaciones histopatológicas de las lesiones pulmonares. En la dosis de 4 mg/kg, los hallazgos fueron leves y se consideraron reversibles. A medida que la dosis aumentaba, las lesiones pulmonares tuvieron un aumento de la gravedad y no se consideraron reversibles. En función de este hallazgo, la dosis máxima tolerada (MTD) en la rata luego de una dosis única del Conj A fue
10 determinada en 6 mg/kg.

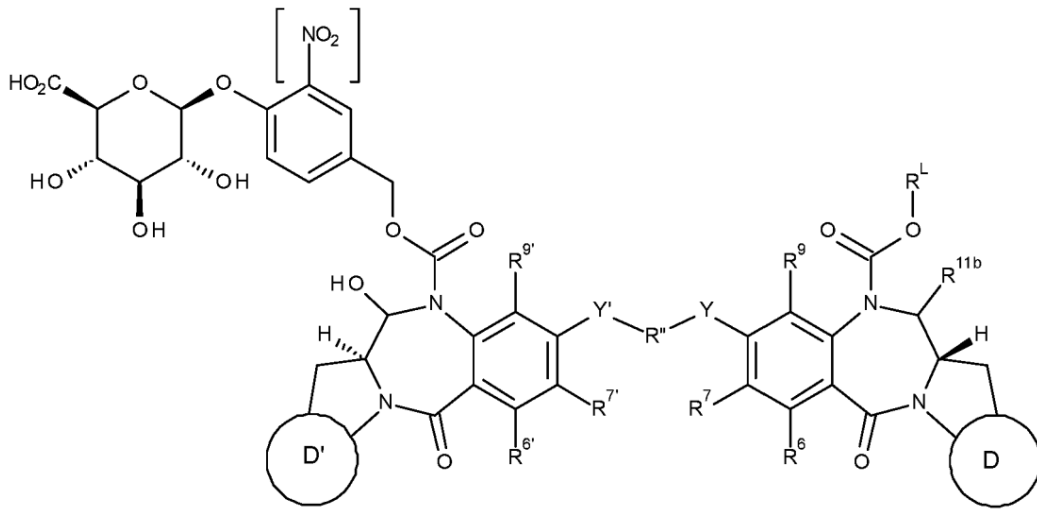
Índice terapéutico

15 El índice terapéutico puede calcularse dividiendo la dosis única máxima tolerada (MTD) de ADC no diana en ratas, mediante la dosis única mínima eficaz (MED) de un ADC diana. El MED es la dosis necesaria única para lograr la estasis tumoral en un modelo in vivo en 28 días (para un xenoinjerto NCI-N87).

20 Por lo tanto, los conjugados del compuesto 10, el índice terapéutico es el MTD de 6 mg/kg dividido entre el MED que es 1,0 mg/kg (ver anteriormente), lo que proporciona un índice terapéutico 6.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:

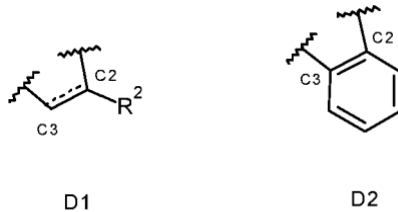


5

y sales y solvatos del mismo, en donde:

los corchetes indican que el grupo NO₂ es opcional;
D representa el grupo D1 o el grupo D2:

10



;

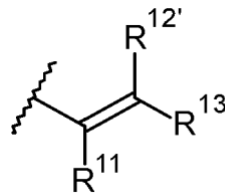
la línea punteada indica la presencia opcional de un enlace doble entre C2 y C3,

15

cuando existe un enlace doble entre C2 y C3, R² se selecciona del grupo que consiste en:

- (ia) grupo arilo C₅₋₁₀, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que comprende: halo, nitro, ciano, éter, carboxi, éster, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₇ y bis-oxi-alquilenos C₁₋₃;
- (ib) alquilo C₁₋₅ alifático saturado;
- (ic) cicloalquilo C₃₋₆ saturado;
- (id)

20



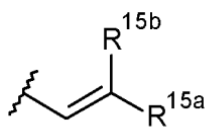
,

25

en donde cada uno de R¹¹, R¹² y R¹³ se selecciona de forma independiente de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alquilenilo C₂₋₃, alquilenilo C₂₋₃ y ciclopropilo, donde la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R² es no mayor de 5;

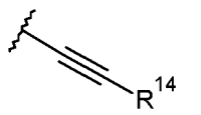
30

(ie)



5

en donde uno de R^{15a} y R^{15b} es H y el otro se selecciona de: fenilo, estando el fenilo opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo, y (if)

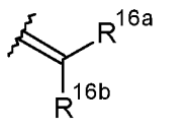


10

donde R¹⁴ se selecciona de: H; alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃, ciclopropilo; fenilo, estando el fenilo opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo,

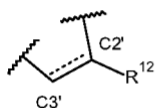
cuando existe un enlace simple entre C2 y C3, R² se selecciona de H, OH, F, diF y

15

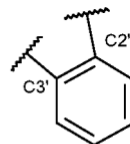


20

donde R^{16a} y R^{16b} se seleccionan independientemente de H, F, alquilo C₁₋₄ saturado, alqueno C₂₋₃, estando los grupos alquilo y alqueno opcionalmente sustituidos por un grupo que se selecciona de alquilamido C₁₋₄ y alquiléster C₁₋₄; o, cuando uno de R^{16a} y R^{16b} es H, el otro se selecciona de nitrilo y un alquiléster C₁₋₄; D' representa el grupo D'1 o el grupo D'2:



D'1



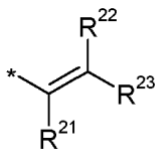
D'2

25

en donde la línea punteada indica la presencia opcional de un enlace doble entre C2' y C3', cuando existe un enlace doble entre C2' y C3', R¹² se selecciona del grupo que consiste en:

30

- (ia) grupo arilo C₅₋₁₀, opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que comprende: halo, nitro, ciano, éter, carboxi, éster, alquilo C₁₋₇, heterociclilo C₃₋₇ y bis-oxi-alqueno C₁₋₃;
- (iib) alquilo C₁₋₅ alifático saturado;
- (iic) cicloalquilo C₃₋₆ saturado;
- (iid)

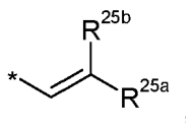


35

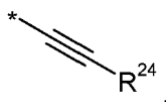
donde cada uno de R²¹, R²² y R²³ se selecciona de forma independiente de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo, donde la cantidad total de átomos de carbono en el grupo R¹² es no mayor de 5;

40

(iie)

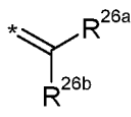


5 en donde uno de R^{25a} y R^{25b} es H y el otro se selecciona de: fenilo, estando el fenilo opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo, y (iif)



10 donde R²⁴ se selecciona de: H; alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃, ciclopropilo; fenilo, estando el fenilo opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de halo, metilo, metoxi, piridilo y tiofenilo,

15 cuando existe un enlace simple entre C2' y C3', R¹² se selecciona de H, OH, F, diF y



20 donde R^{26a} y R^{26b} se seleccionan independientemente de H, F, alquilo C₁₋₄ saturado, alqueno C₂₋₃, estando los grupos alquilo y alqueno opcionalmente sustituidos por un grupo que se selecciona de alquilamido C₁₋₄ y alquiléster C₁₋₄; o, cuando uno de R^{26a} y R^{26b} es H, el otro se selecciona de nitrilo y un alquiléster C₁₋₄;

R⁶ y R⁹ se seleccionan independientemente de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', nitro, Me₃Sn y halo; donde R y R' se seleccionan de forma independiente de los grupos alquilo C₁₋₁₂, heterociclilo C₃₋₂₀ y arilo C₅₋₂₀ opcionalmente sustituidos;

R⁷ se selecciona de H, R, OH, OR, SH, SR, NH₂, NHR, NRR', nitro, Me₃Sn y halo;

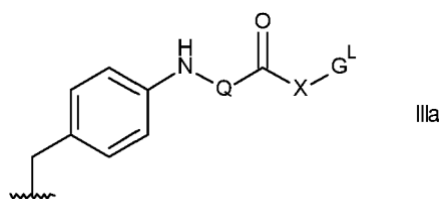
Rⁿ es un grupo alqueno C₃₋₁₂ cuya cadena puede estar interrumpida por uno o más heteroátomos, por ejemplo, O, S, NR^{N2} (donde R^{N2} es H o alquilo C₁₋₄) y/o anillos aromáticos, por ejemplo, benceno o piridina;

Y e Y' se seleccionan de O, S o NH;

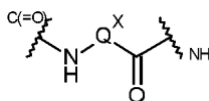
R⁶, R⁷, R⁹ se seleccionan de los mismos grupos que R⁶, R⁷ y R⁹, respectivamente;

R^{11b} se selecciona de OH, OR^A, donde R^A es alquilo C₁₋₄; y

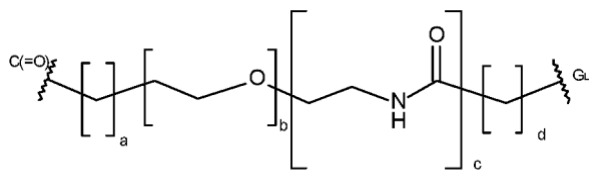
30 R^l es un enlazador para la conexión a un agente de unión celular, que se selecciona de:



35 en donde Q es:



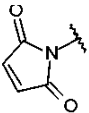
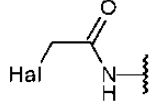
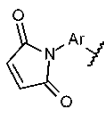
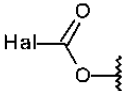
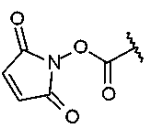
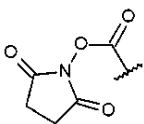
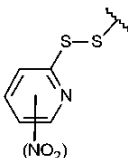

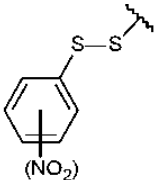

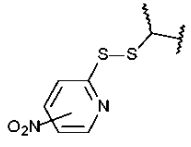

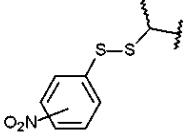
40 donde Q^X es tal que Q es un residuo de aminoácido, un residuo de dipéptido o un residuo de tripéptido; X es:



donde a = 0 a 5, b = 0 a 16, c = 0 o 1, d = 0 a 5;

G^L se selecciona de:

5

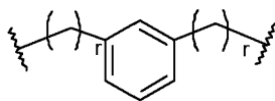
(GL1-1)		(GL ⁴)	 <p>donde Hal = I, Br, Cl</p>
(GL ¹⁻²)		(GL ⁵)	
(GL ²)		(GL ⁶)	
(GL ³⁻¹)	 <p>donde el grupo NO₂ es opcional</p>	(GL ⁷)	
(GL ³⁻²)	 <p>donde el grupo NO₂ es opcional</p>	(GL ⁸)	
(GL ³⁻³)	 <p>donde el grupo NO₂ es opcional</p>	(GL ⁹)	
(GL ³⁻⁴)	 <p>donde el grupo NO₂ es opcional</p>		

donde Ar representa un grupo arileno C₅₋₆.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

10

- a) tanto Y como Y' son O y/o
 b) R'' es alquileo C₃₋₇ o un grupo de fórmula:



5

- donde r es 1 o 2 y/o
 c) R⁹ es H y /o
 d) R⁶ es H y/o
 e) R⁷ se selecciona de H, OH y OR o un grupo alquiloxi C₁₋₄.

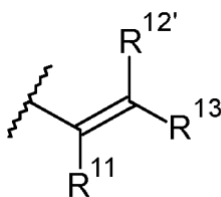
10

3. Un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde:

- a) D es D1, existe un enlace doble entre C2 y C3, y R² es un grupo arilo C₅₋₇, en donde R² opcionalmente tiene uno o tres grupos sustituyentes seleccionados de metoxi, etoxi, flúor, cloro, ciano, bis-oxi-metileno, metil-piperazinilo, morfolino y metiltiofenilo o
 b) D es D1, existe un enlace doble entre C2 y C3, y R² es un grupo arilo C₈₋₁₀, en donde R² opcionalmente tiene de uno a tres grupos sustituyentes seleccionados de metoxi, etoxi, flúor, cloro, ciano, bis-oxi-metileno, metil-piperazinilo, morfolino y metil-tiofenilo o
 c) D es D1, existe un enlace doble entre C2 y C3, y R² es metilo, etilo o propilo o
 d) existe un doble enlace entre C2 y C3 y R² es ciclopropilo o
 e) en donde D es D1, existe un enlace doble entre C2 y C3 y R² es un grupo de fórmula:

15

20



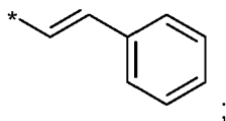
25

en donde:

- i) la cantidad total de los átomos de carbono en el grupo R² no es mayor de 4 y/o
 ii) uno de R¹¹, R^{12'} y R¹³ es H, estando los otros grupos seleccionados de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo o
 iii) dos de R¹¹, R^{12'} y R¹³ son H, estando el otro grupo seleccionado de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alqueno C₂₋₃, alquino C₂₋₃ y ciclopropilo o

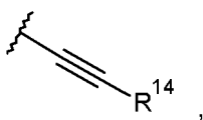
30

f) D es D1, existe un doble enlace entre C2 y C3 y R² es: el grupo:



35

o
 g) D es D1, existe un doble enlace entre C2 y C3 y R² es un grupo de fórmula:



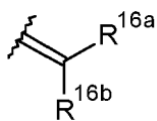
40

en donde R¹⁴ se selecciona de H, metilo, etilo, etenilo y etinilo.

4. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde

45

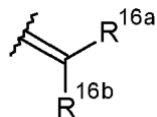
- a) D es D1, existe un enlace simple entre C2 y C3, y R² es H o
 b) D es D1, existe un enlace simple entre C2 y C3, y R² es



y R^{16a} y R^{16b} son ambos H.

c) D es D1, existe un enlace simple entre C2 y C3 y R² es

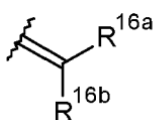
5



y R^{16a} y R^{16b} son ambos metilo o

d) D es D1, existe un enlace simple entre C2 y C3, R² es

10



uno de R^{16a} y R^{16b} es H, y el otro se selecciona de alquilo C₁₋₄ saturado, alquenilo C₂₋₃, estando los grupos alquilo y alquenilo opcionalmente sustituidos.

15

5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde:

a) D' es D'1, existe un enlace doble entre C2' y C3' y R¹² es un grupo arilo C₅₋₇, en donde R¹² tiene de uno a tres grupos sustituyentes seleccionados de metoxi, etoxi, flúor, cloro, ciano, bis-oxi-metileno, metil-piperazinilo, morfolino y metiltiofenilo o

20

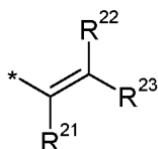
b) D' es D'1, existe un enlace doble entre C2' y C3' y R¹² es un grupo arilo C₈₋₁₀, en donde R¹² opcionalmente tiene de uno a tres grupos sustituyentes seleccionados de metoxi, etoxi, flúor, cloro, ciano, bis-oxi-metileno, metil-piperazinilo, morfolino y metiltiofenilo o

c) D' es D'1, existe un enlace doble entre C2' y C3' y R¹² es metilo, etilo o propilo o

25

d) D' es D'1, existe un enlace doble entre C2' y C3' y R¹² es ciclopropilo o

e) D' es D'1, existe un doble enlace entre C2' y C3' y R¹² es un grupo de fórmula:



30

en donde:

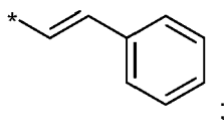
i) la cantidad total de los átomos de carbono en el grupo R¹² es no mayor de 3;

ii) uno de R²¹, R²² y R²³ es H, estando los otros dos grupos seleccionados de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alquenilo C₂₋₃, alquinilo C₂₋₃ y ciclopropilo o.

35

iii) dos de R²¹, R²² y R²³ son H, estando el otro grupo seleccionado de H, alquilo C₁₋₃ saturado, alquenilo C₂₋₃, alquinilo C₂₋₃ y ciclopropilo o

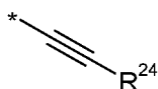
f) D' es D'1, existe un doble enlace entre C2' y C3' y R¹² es el grupo:



40

o

g) D' es D'1, existe un doble enlace entre C2' y C3' y R¹² es un grupo de fórmula:

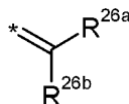


45

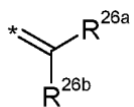
en donde R²⁴ se selecciona entre H, metilo, etilo, etenilo y etinilo.

6. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde

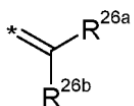
- 5 a) D' es D'1, existe un enlace simple entre C2' y C3' y R¹² es H o
 b) D' es D'1, existe un enlace simple entre C2' y C3', R¹² es



- 10 y R^{26a} y R^{26b} son ambos H o
 c) D' es D'1, existe un enlace simple entre C2' y C3' y R¹² es



- 15 y R^{26a} y R^{26b} son ambos metilo o
 d) D' es D'1, existe un enlace simple entre C2' y C3', R¹² es

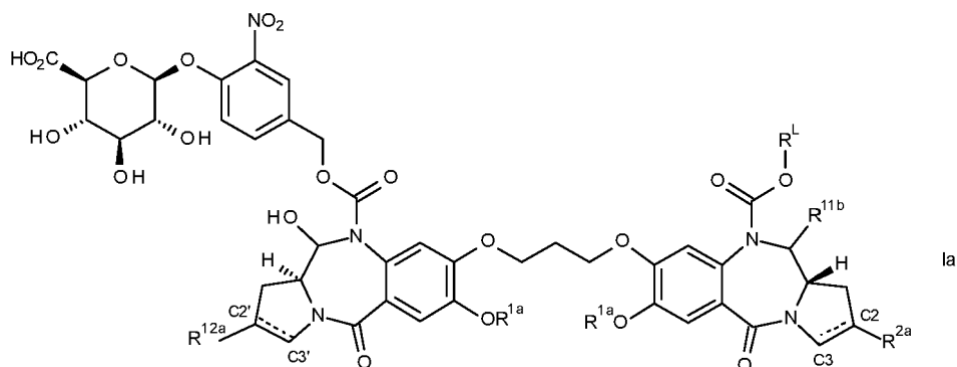


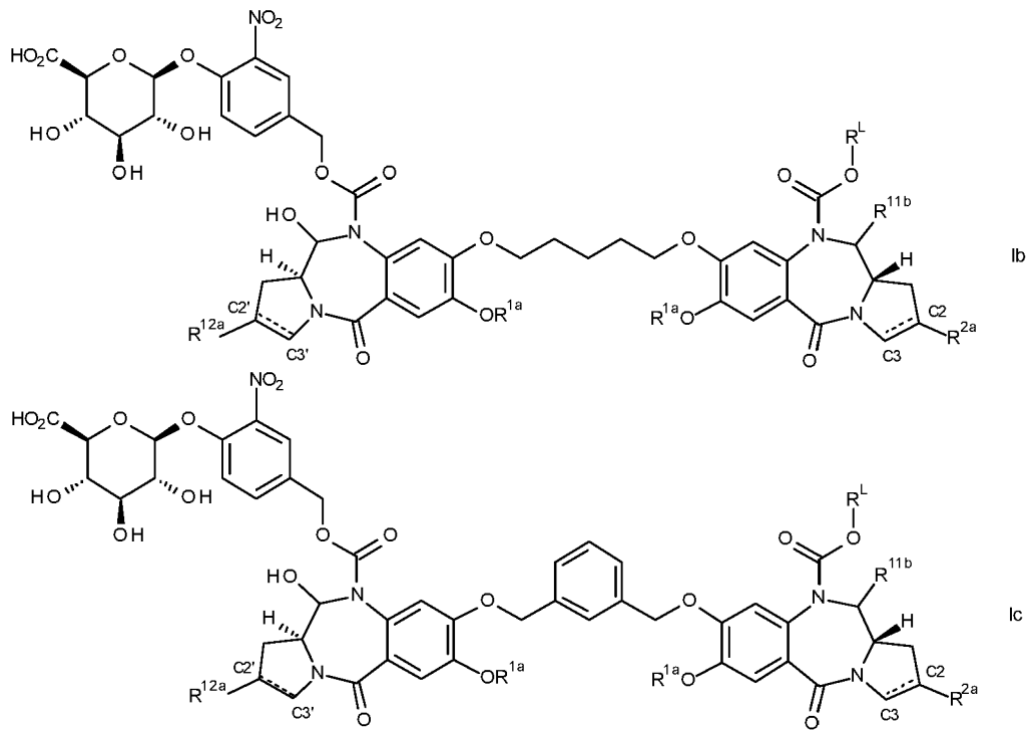
- 20 uno de R^{26a} y R^{26b} es H y el otro se selecciona de alquilo C₁₋₄ saturado, alqueno C₂₋₃, estando los grupos alquilo y alqueno opcionalmente sustituidos.

7. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde

- 25 a) R^{6'} se selecciona de los mismos grupos que R⁶, R^{7'} se selecciona de los mismos grupos que R⁷, R^{9'} se selecciona de los mismos grupos que R⁹ e Y' se selecciona de los mismos grupos que Y y/o.
 b) R^{6'} es el mismo grupo que R⁶, R^{7'} es el mismo grupo que R⁷, R^{9'} es el mismo grupo que R⁹ e Y' es el mismo grupo que Y y/o
 c) R¹² es el mismo grupo que R².

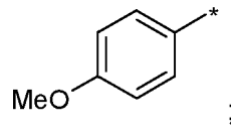
30 8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que es de fórmulas Ia-1, Ia-2 o Ia-3:





5 donde R^{2a} y R^{12a} donde son iguales y se seleccionan de:

(a)



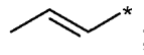
10

(b)



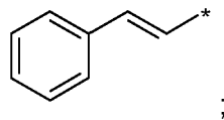
15

(c)



20

(d)

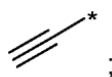


(e)



25

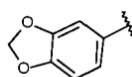
(f)



(g)

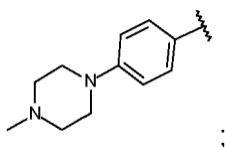
5

y



10

(h)



R^{1a} se selecciona de metilo y bencilo;
R^L y R^{11b} son como se definió en la reivindicación 1;

15

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la 2, donde tanto R² como R¹² comprenden no más de 3 átomos de carbono.

20

10. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde R^{11b} es OH o OR^A, donde R^A es alquilo C₁₋₄, donde opcionalmente R^A es metilo.

11. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde Q^X es:

25

a) un residuo de aminoácido seleccionado de Phe, Lys, Val, Ala, Cit, Leu, Ile, Arg y Trp o.

b) un residuo de dipéptido seleccionado de:

30

CO-Phe-Lys-NH,
CO-Val-Ala-NH,
CO-Val-Lys-NH,
CO-Ala-Lys-NH,
CO-Val-Cit-NH,
CO-Phe-Cit-NH,
CO-Leu-Cit-NH,
CO-Ile-Cit-NH,
CO-Phe-Arg-NH, y
CO-Trp-Cit-NH; o

35

c) un residuo tripéptido.

40

12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde

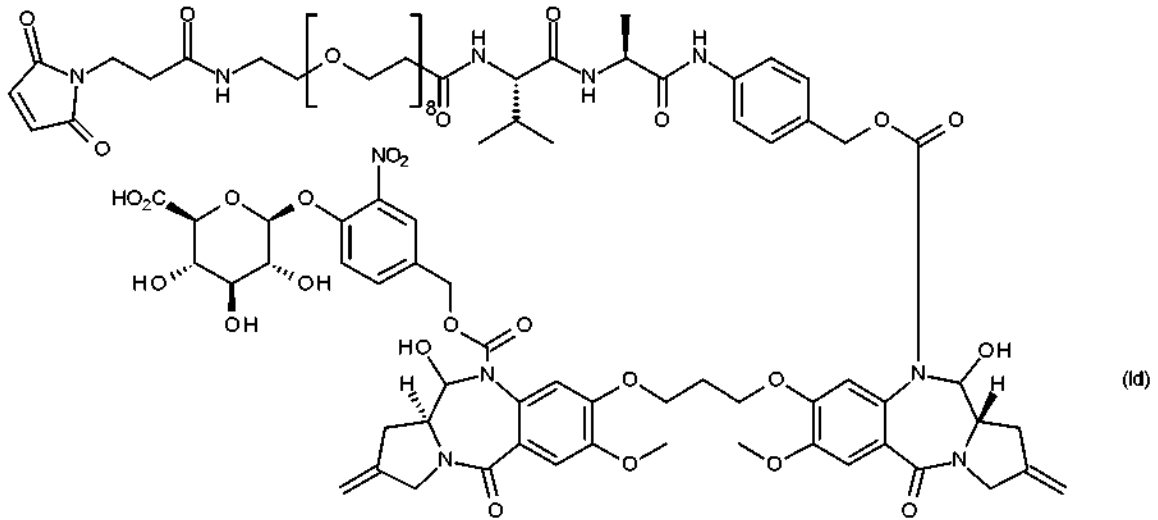
45

a) a es de 0 a 3 y/o
b) b es de 0 a 12 y/o
c) d es de 0 a 3.

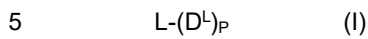
13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde a es 0, c es 1 y d es 2, y b es de 0 a 8.

50

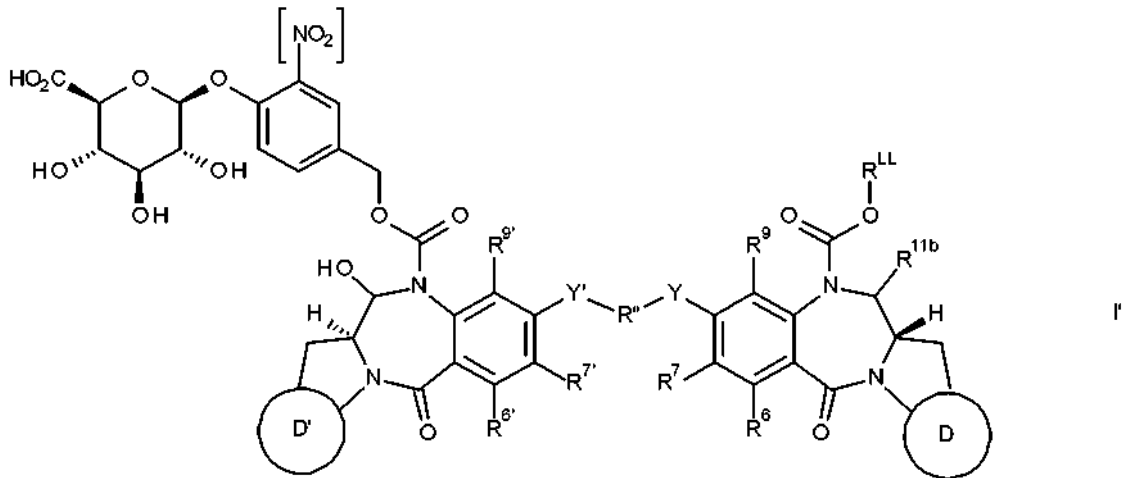
14. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto es de fórmula Id:



15. Un conjugado de fórmula I:

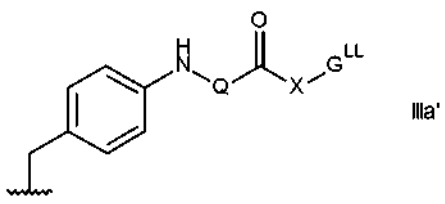


en donde L es una unidad de ligando, D^L es una unidad de enlazador del fármaco de fórmula I':

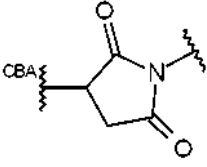
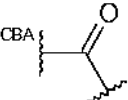
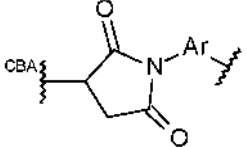
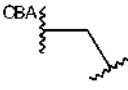


10 en donde D, R², R⁶, R⁷, R⁹, R^{11b}, Y, R'', Y', D', R^{6'}, R^{7'}, R^{9'} y R¹², que incluye la presencia o ausencia de enlaces dobles entre C2 y C3 y C2' y C3' respectivamente, son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;

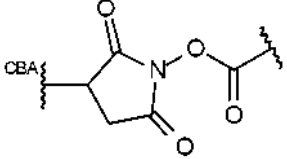
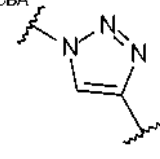
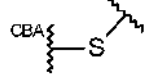
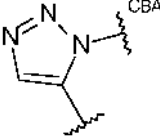
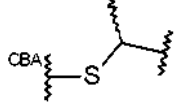
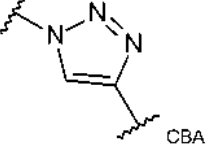
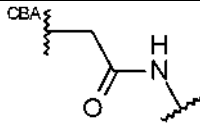
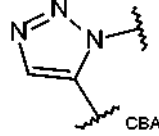
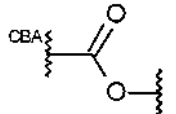
15 en donde p es un número entero de 1 a 20;
R^{LL} es un enlazador para la conexión a un agente de unión celular, que es:



20 donde Q y X son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11 a 13 y G^{LL} se selecciona de:

(G ^{LL1-1})		(G ^{LL6})	
(G ^{LL1-2})		(G ^{LL7})	

(continuación)

(G ^{LL2})		(G ^{LL8-1})	
(G ^{LL3-1})		(G ^{LL8-2})	
(G ^{LL3-2})		(G ^{LL9-1})	
(G ^{LL4})		(G ^{LL9-2})	
(G ^{LL5})			

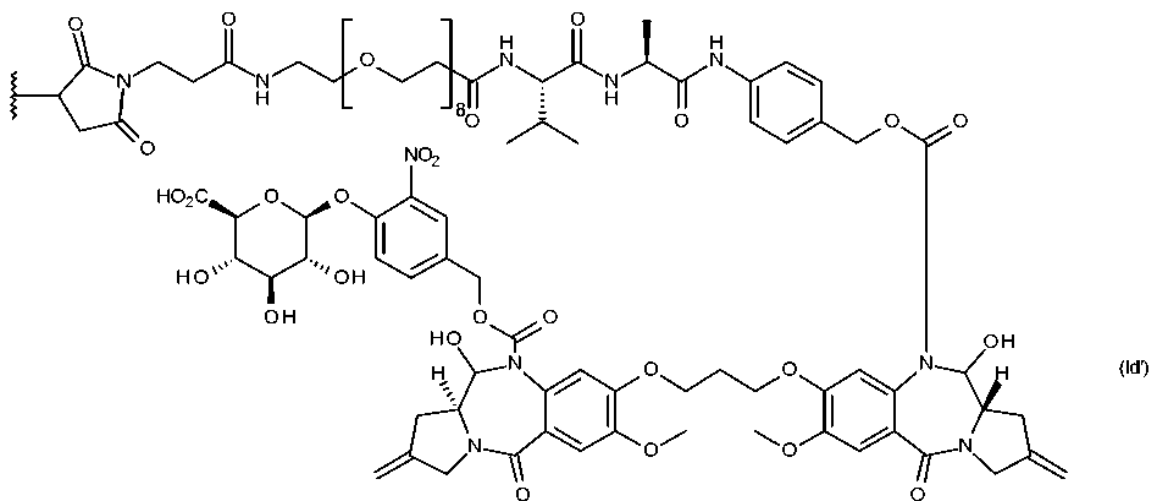
donde Ar representa un grupo arileno C₅₋₆.

5 16. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 15, en donde

- a) Ar es un grupo fenileno y/o
- b) G^{LL} se selecciona de G^{LL1-1} y G^{LL1-2}.

10

17. Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 15, en donde D^L es de fórmula (Id'):



15 18. Un conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde la unidad de ligando es un anticuerpo o un fragmento activo del mismo.

19. El conjugado de conformidad con la reivindicación 18, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo para un antígeno asociado a tumor en donde opcionalmente el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumor o receptores de la superficie celular seleccionados de (1)–(88):

- 5
- (1) BMPR1B;
 - (2) E16;
 - (3) STEAP1;
 - (4) 0772P;

10

 - (5) MPF;
 - (6) Napi3b;
 - (7) Sema 5b;
 - (8) PSCA hlg;
 - (9) ETBR;

15

 - (10) MSG783;
 - (11) STEAP2;
 - (12) TrpM4;
 - (13) CRIPTO;
 - (14) CD21;

20

 - (15) CD79b;
 - (16) FcRH2;
 - (17) HER2;
 - (18) NCA;
 - (19) MDP;

25

 - (20) IL20R-alfa;
 - (21) Brevican;
 - (22) EphB2R;
 - (23) ASLG659;
 - (24) PSCA;

30

 - (25) GEDA;
 - (26) BAFF-R;
 - (27) CD22;
 - (28) CD79a;
 - (29) CXCR5;

35

 - (30) HLA-DOB;
 - (31) P2X5;
 - (32) CD72;
 - (33) LY64;
 - (34) FcRH1;

40

 - (35) IRTA2;
 - (36) TENB2;
 - (37) PSMA - FOLH1;
 - (38) SST;

45

 - (38.1) SSTR2;
 - (38.2) SSTR5;
 - (38.3) SSTR1;
 - (38.4) SSTR3;
 - (38.5) SSTR4;

50

 - (39) ITGAV;
 - (40) ITGB6;
 - (41) CEACAM5;
 - (42) MET;

55

 - (43) MUC1;
 - (44) CA9;
 - (45) EGFRVIII;
 - (46) CD33;
 - (47) CD 19;

60

 - (48) IL2RA;
 - (49) AXL;
 - (50) CD30 - TNFRSF8;
 - (51) BCMA - TNFRSF17;
 - (52) CT Ags - CTA;

65

 - (53) CD174 (Lewis Y) - FUT3;
 - (54) CLEC14A;

- (55) GRP78 - HSPA5;
- (56) CD70;
- (57) antígenos específicos de células madre;
- (58) ASG-5;
- 5 (59) ENPP3;
- (60) PRR4;
- (61) GCC-GUCY2C;
- (62) Liv-1 - SLC39A6;
- (63) 5T4;
- 10 (64) CD56- NCMA1;
- (65) CanAg;
- (66) FOLR1;
- (67) GPNMB;
- (68) TIM-1 - HAVCR1;
- 15 (69) RG-1/Mindina diana de tumor de próstata - Mindina/RG-1;
- (70) B7-H4 - VTCN1;
- (71) PTK7;
- (72) CD37;
- (73) CD138 - SDC1;
- 20 (74) CD74;
- (75) Claudinas - CLs;
- (76) EGFR;
- (77) Her3;
- (78) RON - MST1 R;
- 25 (79) EPHA2;
- (80) CD20 - MS4A1;
- (81) Tenascina C - TNC;
- (82) FAP;
- (83) DKK-1;
- 30 (84) CD52;
- (85) CS1 - SLAMF7;
- (86) Endoglina- ENG;
- (87) Anexina A1 - ANXA1;
- (88) V-CAM (CD106) - VCAM1.

- 35 20. El conjugado de las reivindicaciones 18 a 19, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo modificado con cisteína.
- 40 21. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20 donde p es un número entero de 1 a 8.
- 22. Una composición que comprende una mezcla de conjugados de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en donde el promedio p en la mezcla de compuestos de conjugados es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8.
- 45 23. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, para usarse en terapia.
- 24. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 50 25. El conjugado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21 o la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 103, para usarse en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto, en donde opcionalmente la enfermedad tratada es cáncer.

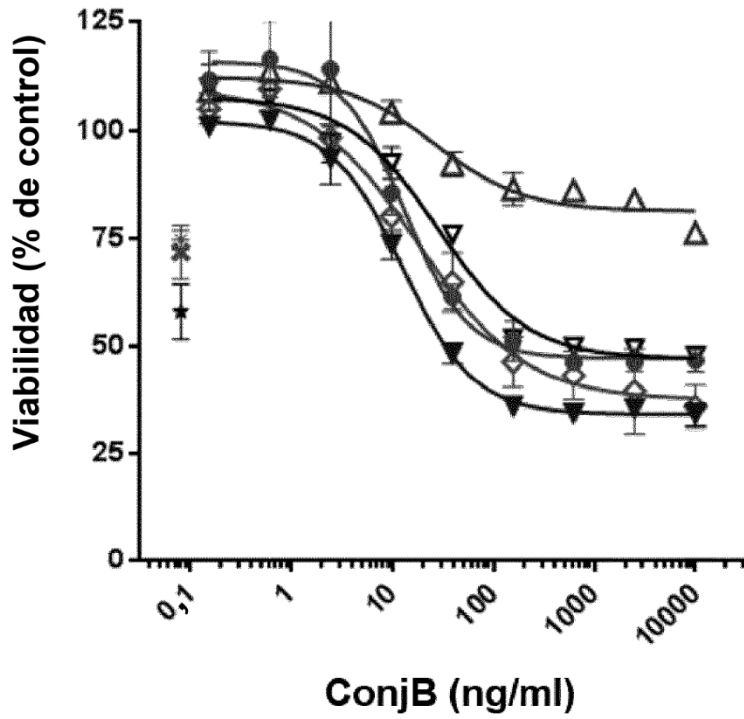


Fig. 1

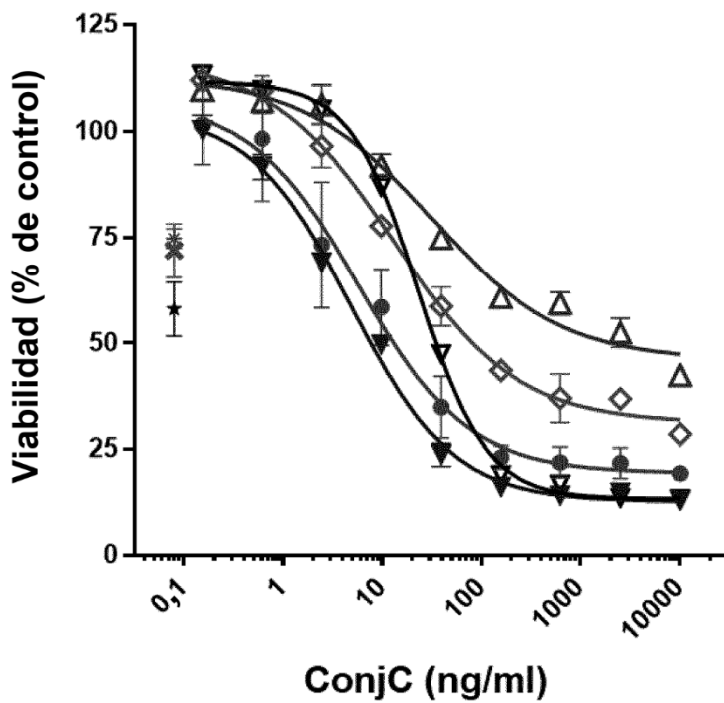


Fig. 2

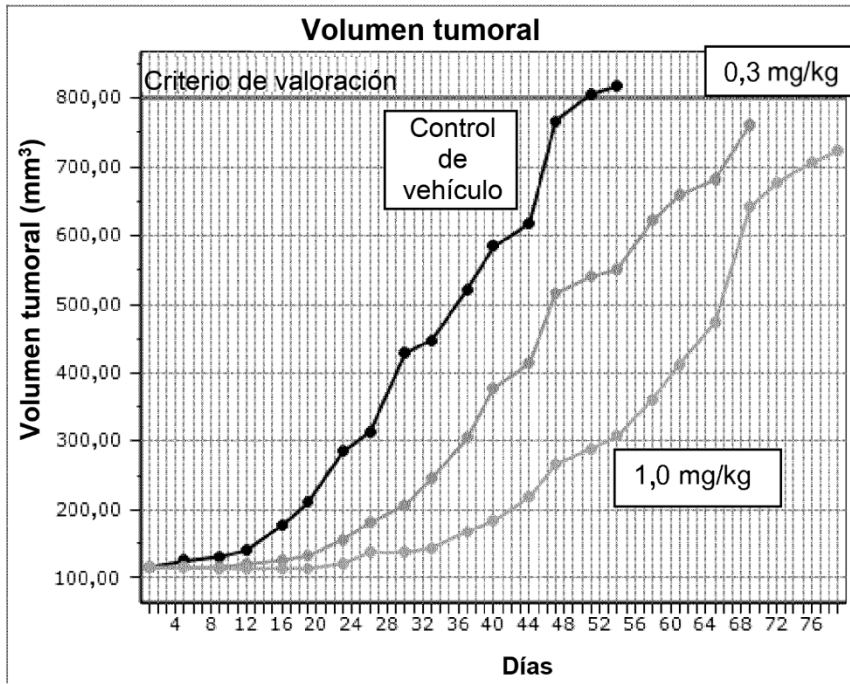


Fig. 3

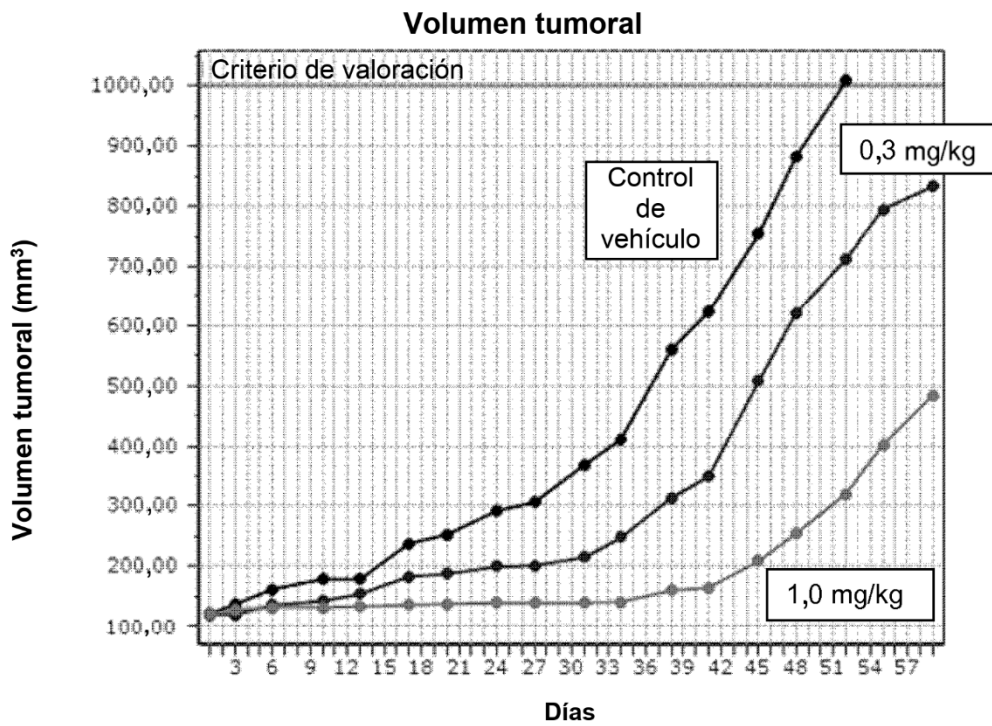


Fig. 4