

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 357**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2006 E 06786489 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 1917020**

54 Título: **Compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones de la cadena lateral de fenilalanina en el extremo C**

30 Prioridad:

**07.07.2005 US 697767 P**

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

**05.10.2016**

73 Titular/es:

**SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)  
21823 30th Drive, S.E.  
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**DORONINA, SVETLANA, O. y  
KLINE, TONI, BETH**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 585 357 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

Compuestos de monometilvalina que tienen modificaciones de la cadena lateral de fenilalanina en el extremo C

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a compuestos de fármaco, a conjugados fármaco-enlazador-ligando, compuestos de fármaco-enlazador y conjugados fármaco-ligando; así como a composiciones que incluyen los mismos y a métodos para usar los mismos para tratar el cáncer, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa y otras afecciones patológicas. La divulgación también se refiere a métodos de uso de compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco *in vitro*, *in situ* e *in vivo* para el diagnóstico o el tratamiento de células de mamíferos o afecciones patológicas asociadas.

15 **Antecedentes**

Un gran interés ha rodeado el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) para el suministro selectivo de agentes citotóxicos a las células tumorales. MMAF (N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina) es una auristatina que es relativamente atóxica, sin embargo, es altamente potente en actividad cuando se conjuga con mAb de internalización. MMAF tiene un resto de fenilalanina C-terminal cargado que atenúa su actividad citotóxica en comparación con su homólogo neutro, MMAE; esta diferencia se debe muy probablemente al acceso intracelular alterado. Sin embargo, la conjugación de MMAF con los anticuerpos de internalización, como AC10 o 1F6, a través de un enlazador escindible por proteasa dio como resultado conjugados que son > 2000 veces más potentes sobre células positivas al antígeno en comparación con el fármaco sin conjugar. La dirección activa con mAb facilita el suministro intracelular de MMAF; una vez que MMAF se libera del conjugado dentro de las células, el fármaco presumiblemente queda atrapado debido a su reducida capacidad de atravesar las membranas celulares aumentando así su concentración intracelular y por tanto la potencia del conjugado. El uso de fármacos citotóxicos con una captación intracelular pasiva alterada puede conducir potencialmente a conjugados mAb-fármaco con menor toxicidad sistémica.

30 En efecto, la escisión inespecífica del enlazador en circulación liberaría un fármaco relativamente atóxico.

Para ampliar y mejorar la clase auristatina de fármacos y los conjugados anticuerpo fármaco (ADC, del inglés *antibody drug conjugate*) correspondientes, se ha modificado la cadena lateral del resto de fenilalanina C-terminal de MMAF. Esta modificación estructural transmite propiedades inesperadas al fármaco libre resultante y al ADC.

35 El documento WO2004/073656 desvela anticuerpos anti-CD70 y derivados de los mismos conjugados con citotóxicos, inmunosupresores u otros agentes terapéuticos, así como composiciones farmacéuticas y kits que comprenden conjugados anticuerpo-fármaco y derivados de anticuerpo-fármaco. También se desvelan métodos, para el tratamiento de cánceres que expresan CD70 y trastornos inmunológicos, que comprenden administrar a un sujeto las composiciones farmacéuticas desveladas.

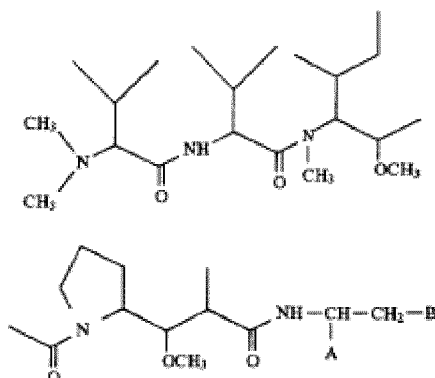
40 El documento WO2004/010957 desvela conjugados fármaco-enlazador-ligando en los que un fármaco se enlaza a un ligando a través de una unidad enlazadora a base de péptidos. En una realización, el ligando es un anticuerpo. También se desvelan compuestos de fármaco-enlazador y compuestos de fármaco. También se desvelan métodos para el tratamiento del cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa con los compuestos y composiciones de la invención.

45 El documento WO2005/001038 desvela métodos y composiciones para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, que comprenden proteínas que administran caracterizadas por su capacidad para unirse a CD30 o competir con los anticuerpos monoclonales ACIO o HeFi-1 por la unión a CD30 y ejercer un efecto citostático o citotóxico sobre células de la enfermedad de Hodgkin en ausencia de células efectoras o complemento. Dichas proteínas incluyen derivados de los anticuerpos monoclonales ACIO y HeFi-1. Las proteínas de la invención pueden ser anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos; adicionalmente, pueden conjugarse con agentes citotóxicos tales como fármacos quimioterápicos. La invención se refiere adicionalmente a ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la invención. La invención se refiere adicionalmente a un método para identificar un anticuerpo anti-CD30 útil para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Hodgkin.

50 El documento WO2005/081711 desvela péptidos auristatina, incluyendo MeVal-Val-Dil-Dap-Norefedrina (MMAE) y MeVal-Val-Dil-Dap-Phe (MMAF), unidos a ligandos a través de diversos enlazadores, incluyendo maleimidocaproil-val-cit-PAB.

55 El documento WO01/18032 desvela compuestos de fórmula (I) donde R<sub>1</sub>-R<sub>5</sub> son cada uno, independientemente, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> normal o ramificado; A es un resto de metionilo, fenilalanilo o fenilglicilo; n es 0 o 1; R<sub>6</sub> es un átomo de hidrógeno 0; y R<sub>7</sub> es un grupo carbocíclico, un grupo aromático, un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, un grupo piridilalquilo o un grupo heterocíclico. En otra realización, R<sub>6</sub> es bencilo o -C(O)OR<sub>8</sub>, donde R<sub>8</sub> es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y R<sub>1</sub> es un grupo heteroaromático, tal como un grupo 2-tiazolilo.

El documento US5767237 desvela un derivado peptídico representado por la siguiente fórmula o una sal de la misma:



5

en la que A y B representan cada uno cualquiera de los siguientes (a) y (b);

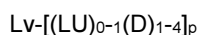
- 10 (a) A representa un átomo de hidrógeno y B representa un grupo fenilo sustituido con un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo inferior o un grupo alcoxi inferior, o un grupo heteroarilo;  
 (b) A representa -CONH-R<sup>1</sup>, -CSNH-R<sup>1</sup>, un grupo hidroximetilo, un grupo alcoxycarbonilo inferior o un grupo carboxilo,

- 15 en la que R<sup>1</sup> representa un grupo alquilo inferior o un grupo heteroarilo y B representa un grupo fenilo opcionalmente sustituido con un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo inferior o un grupo alcoxi inferior; y en la que el derivado peptídico tiene una actividad antitumoral más fuerte que la de la dolastatina 10 y es útil como un agente antineoplásico o antitumoral.

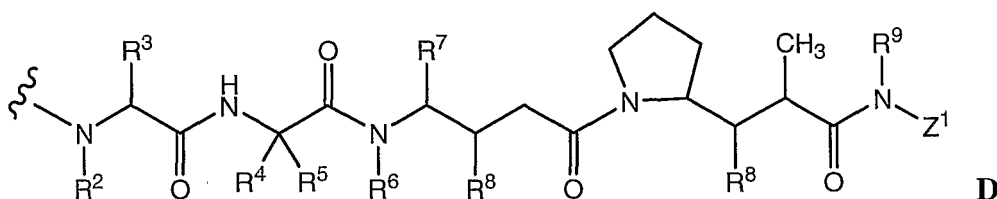
- 20 La enumeración de cualquier referencia en la presente solicitud no es una admisión de que la referencia sea la técnica anterior a la presente solicitud.

### Sumario

- 25 En un aspecto, la presente divulgación proporciona compuestos y conjugados representados por la fórmula general



- 30 en la que L es H o una unidad de ligando; LU es una unidad de enlazador; v es 0 o 1; p es un número entero de 1 a 20; y D es un resto de fármaco que tiene la fórmula:



- 35 en la que R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>4</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo; o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6; R<sup>6</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>7</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>); en la que cada X<sup>1</sup> es un alquilenno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> y el radical -NR<sup>9</sup>Z<sup>1</sup> es un bioisómero de fenilalanina con una cadena lateral de aminoácido modificado; o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 45 Los compuestos de las fórmulas anteriores son útiles para tratar trastornos, como el cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa, en un paciente, o útil como un intermedio para la síntesis de un compuesto de fármaco-enlazador o un conjugado fármaco-enlazador-ligando (por ejemplo, un conjugado fármaco-enlazador-anticuerpo, un conjugado de fármaco-ligando o un conjugado fármaco-ligando que tiene una unidad de fármaco escindible).

En otro aspecto, se proporcionan composiciones que incluyen una cantidad eficaz de un compuesto de las fórmulas anteriores y un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

5 En otro aspecto más, se proporcionan métodos para destruir o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa. En otro aspecto más, se proporcionan métodos para tratar el cáncer. En otro aspecto más, se proporcionan métodos para destruir o inhibir la replicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune. En aún otro aspecto más, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad autoinmune. En otro aspecto más, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad infecciosa. En otro aspecto más, se proporcionan métodos para prevenir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa. En otro aspecto más, se proporcionan métodos para prevenir el cáncer. En otro aspecto más, se proporcionan métodos para prevenir la multiplicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmune. En otro aspecto más, se proporcionan métodos para prevenir una enfermedad autoinmune. En otro aspecto más, se proporcionan métodos para prevenir una enfermedad infecciosa.

15 En otro aspecto, se proporciona un compuesto de fármaco que puede usarse como intermedio para la síntesis de un compuesto de fármaco-enlazador que tenga una unidad de fármaco escindible. En otro aspecto, se proporciona un compuesto de fármaco-enlazador que puede usarse como intermedio para la síntesis de un conjugado fármaco-enlazador-ligando.

20 En otro aspecto, se proporciona un ensayo para detectar células cancerosas, incluyendo el ensayo:

(a) exponer las células a un compuesto de conjugado anticuerpo fármaco; y

(b) determinar el grado de unión del compuesto de conjugado anticuerpo fármaco a las células.

25 La divulgación se entenderá mejor por referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones a modo de ejemplo, tomadas junto con los dibujos, figuras y esquemas adjuntos. El análisis a continuación es descriptivo, ilustrativo y a modo de ejemplo y no debe tomarse como limitante.

### 30 Descripción detallada

#### Definiciones y abreviaturas

35 A menos que se indique lo contrario, se pretende que los siguientes términos y frases como se usan en el presente documento tengan los siguientes significados. Cuando se usan nombres comerciales en el presente documento, el nombre comercial incluye la formulación del producto, el fármaco genérico y el principio o principios activos farmacéuticos del producto de nombre comercial, a menos que se indique lo contrario por el contexto.

40 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, que presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo intacto tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable se une a e interactúa con un antígeno diana. La región variable incluye una región determinante complementaria (RDC) que reconoce y se une a un sitio de unión específico en un antígeno particular. La región constante puede ser reconocido por, e interactuar con, el sistema inmunitario (véase, por ejemplo, Janeway *et al.*, 2001, *Immuno. Biology*, 5ª edición., Garland Publishing, Nueva York). Un anticuerpo 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. El anticuerpo puede derivarse de cualquier especie adecuada. En un aspecto, sin embargo, el anticuerpo es de origen humano, murino o de conejo. Un anticuerpo puede ser, por ejemplo, humano, humanizado o quimérico, un anticuerpo de una sola cadena, un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab'), un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento o fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores que se unen inespecíficamente a un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de célula de cáncer, un antígeno viral o un antígeno microbiano).

55 Las expresiones "se une específicamente" y "unión específica" se refieren a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

60 La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo sitio antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo al obtenerse de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo

mediante cualquier método particular.

La expresión "anticuerpos monoclonales" incluye específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región variable o de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, scFv, scFv-Fc y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento o fragmentos de anticuerpos.

Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (C<sub>L</sub>) y dominios constantes de cadena pesada, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> y C<sub>H4</sub>, según corresponda a la clase de anticuerpos. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, los dominios constantes de secuencia humana nativa de) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos.

Un anticuerpo intacto puede tener uno o más "funciones efectoras", que se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (por ejemplo, una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión a C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión al receptor de Fc; la citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (CDAC); la fagocitosis; la regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B; BCR), etc.

Un polipéptido de "secuencia nativa" es aquel que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido, por ejemplo, un receptor de antígeno asociado a tumor, derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o de síntesis. Por tanto, un polipéptido de secuencia nativa puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido humano de origen natural, de un polipéptido murino o de un polipéptido de cualquier otra especie de mamífero.

La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren hasta cierto punto de un polipéptido de secuencia nativa. Habitualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos poseerán al menos aproximadamente un 70 % de homología con al menos un dominio de unión al receptor de un ligando nativo, o con al menos un dominio de unión al ligando de un receptor nativo, tal como un antígeno asociado a tumor. En otros aspectos, que serán homólogos al menos aproximadamente al 80 %, al menos aproximadamente al 90 % o al menos al 95 % con dichos dominios de unión al receptor o al ligando. Las variantes de secuencia de aminoácidos poseen sustituciones, deleciones y/o inserciones en ciertas posiciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa.

La "identidad de secuencia" se define como el porcentaje de restos en la variante de secuencia de aminoácidos que son idénticos después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Un ejemplo preferido, no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a la proteína de interés. Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, puede usarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Como alternativa, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda por iteraciones que detecta relaciones remotas entre moléculas (Id.). Cuando se usan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo preferido, no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Un algoritmo de este tipo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se usa el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, pueden usarse una tabla de restos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Se conocen en la técnica algoritmos adicionales para el análisis de secuencias e incluyen ADVANCE y ADAM como se describen en Torellis y Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Si ktup = 2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se comparan examinado pares de restos alineados; si ktup

= 1, se examinan aminoácidos alineados individuales. ktup puede ajustarse a 2 o 1 para secuencias de proteínas o de 1 a 6 para secuencias de ADN. El valor por defecto, o si no se especifica ktup, es de 2 para proteínas y de 6 para el ADN. Como alternativa, el alineamiento de secuencia de proteínas puede realizarse usando el algoritmo CLUSTAL W, como se describe por Higgins *et al.*, 1996, *Methods Enzymol.* 266:383-402. En algunas realizaciones, las dos secuencias que se comparan tienen la misma longitud después de que se introducen huecos en las secuencias, según sea apropiado (por ejemplo, excluyendo la secuencia adicional que se prolonga más allá de las secuencias que se comparan).

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "CDAC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, los linfocitos citolíticos naturales (NK), los neutrófilos y los macrófagos) reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana. Las células principales que median la CDAC, los NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, 1991, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92. Para evaluar la actividad CDAC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de CDAC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de los EE.UU. N.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o adicionalmente, la actividad CDAC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656.

Las expresiones "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia nativa de FcR humano. Además, un FcR preferido es uno que se une un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas con empalme alternativo de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo inmunoreceptor con activación basada en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene motivo inmunoreceptor con inhibición basada en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Véase revisión en M. Daeron, 1997, *Annu Rev. Immunol.* 15:203-234). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, 1991, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel *et al.*, 1994, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, 1995, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41. Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están incluidos en el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (véase, por ejemplo, Guyer *et al.*, 1976, *J. Immunol* 117: 587; y Kim *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 24:249).

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula de lisar una diana en presencia del complemento. La vía de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, 1996, *J. Immunol. Methods* 202:163.

El término "variable" se refiere a ciertas porciones de los dominios variables de los anticuerpos que difieren ampliamente en la secuencia y se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Esta variabilidad se concentra en tres segmentos denominados "regiones hipervariables" en los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones marco conservadas (RMC). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro RMC conectadas por tres regiones hipervariables.

La expresión "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "RDC" (por ejemplo, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat *et al.* (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol Biol.* 196:901-917) Los restos de "región marco conservada" o "RMC" son los restos del dominio variable diferentes de los restos de la región hipervariable como se definen en el presente documento.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena única" "scFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Normalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, ver Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

- El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio pesado variable (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio ligero variable (V<sub>L</sub>) en la misma cadena polipeptídica. Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más en detalle en, por ejemplo, el documento EP 0 404 097; el documento WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.
- Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que restos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de región marco conservada (RMC) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las RMC son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332:323-329; y Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596.
- Como se usa en el presente documento, "aislado" significa separado de otros componentes de (a) una fuente natural, tal como una célula vegetal o animal o cultivo celular o (b) una mezcla de reacción química de síntesis orgánica. En el presente documento, "purificado" significa que cuando se aísla, el aislado contiene al menos el 95 % y en otro aspecto, al menos el 98 %, de un compuesto (por ejemplo, un conjugado) en peso del aislado.
- Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo como se determina por el método de Lowry y más preferentemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando Coomassie azul o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés es aquel capaz de unirse a ese antígeno con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil en la selección de una célula que exprese el antígeno.
- Un anticuerpo que "induce apoptosis" es aquel que induce la muerte celular programada como se determina mediante la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, la contracción celular, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. Hay disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados a la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de fosfatidil serina (PS) puede medirse mediante la unión de anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse a través del encadenamiento de ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación del ADN pueden evaluarse mediante cualquier incremento en las células hipodiploides.
- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierto grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia puede, por ejemplo, medirse mediante la evaluación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TPE) y/o la determinación de la tasa de respuesta (TR).
- La expresión "cantidad sustancial" se refiere a una mayoría, es decir, > 50 % de una población, de una colección o una muestra.

La expresión "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto resultante de un proceso o una reacción metabólicos dentro de una célula sobre un conjugado fármaco-enlazador-ligando (por ejemplo, un conjugado anticuerpo fármaco (ADC)). El proceso o reacción metabólicos pueden ser un proceso enzimático, tal como la escisión proteolítica de un enlazador peptídico del ADC, por hidrólisis de un grupo funcional tal como una hidrazona, éster o amida o por la degradación proteolítica del conjugado fármaco-enlazador-ligando (por ejemplo, liberando un fragmento de cistilo-enlazador-fármaco). Los metabolitos intracelulares incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y fármaco libre que han experimentado escisión intracelular después de la entrada, la difusión, la absorción o el transporte en una célula.

Las expresiones "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso o una reacción metabólicos dentro de una célula sobre un conjugado fármaco-ligando, un conjugado fármaco-enlazador-ligando, un conjugado anticuerpo fármaco (ADC) o similares, con lo que la unión covalente, por ejemplo, el enlazador, entre el resto de fármaco (D, del inglés *drug*) y el anticuerpo (Ab, del inglés *antibody*) se rompe, dando como resultado el fármaco libre, un compuesto de fármaco-enlazador u otro metabolito del conjugado disociado del anticuerpo dentro de la célula. Los restos escindidos del conjugado fármaco-ligando, un conjugado fármaco-enlazador-ligando o el ADC son por tanto metabolitos intracelulares.

El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, concentraciones sanguíneas/plasmáticas) de una cantidad dada de fármaco administrado a un paciente. Biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición tanto del tiempo (velocidad) como de la cantidad total (alcance) del fármaco que alcanza la circulación general desde una forma de dosificación administrada.

La expresión "actividad citotóxica" se refiere a un efecto de destrucción celular, citostático o anti-proliferativo de un compuesto de conjugado anticuerpo fármaco o un metabolito intracelular de un compuesto de conjugado anticuerpo fármaco. La actividad citotóxica puede expresarse como el valor de  $CI_{50}$  que es la concentración (molar o masa) por unidad de volumen a la que la mitad de las células sobreviven.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento. Esto incluye enfermedades o trastornos crónicos y agudos incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se tratan en la presente invención incluyen los tumores benignos y malignos; la leucemia y los tumores malignos linfoides, en particular de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas, próstata o cáncer de vejiga; trastornos neuronales, gliales, astrocitarios, hipotalámicos y de otras glándulas, macrófágicos, epiteliales, estromales y blastocélulas; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección o trastorno fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular desregulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, el carcinoma, el linfoma, el blastoma, el sarcoma y la leucemia o las neoplasias malignas linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas (por ejemplo, el cáncer de células escamosas epiteliales), el cáncer de pulmón incluyendo el cáncer de pulmón microcítico, el cáncer de pulmón no microcítico ("CPNM"), el adenocarcinoma del pulmón y el carcinoma de células escamosas del pulmón, el cáncer del peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gástrico o de estómago incluyendo el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer rectal, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón o renal, el cáncer de próstata, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, el carcinoma anal, el carcinoma de pene, así como el cáncer de cabeza y cuello.

La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo,  $^{211}A$ ,  $^{131}I$ ,  $^{125}I$ ,  $^{90}Y$ ,  $^{186}Re$ ,  $^{188}Re$ ,  $^{153}Sm$ ,  $^{212}Bi$ ,  $^{32}P$ ,  $^{60}C$  y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterápicos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo los análogos de síntesis y los derivados de los mismos. En un aspecto, el término no incluye ningún isótopo o isótopos radiactivos.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citocinas las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen las hormonas de crecimiento tales como la hormona del crecimiento humano, la N-metionil hormona del crecimiento humano y la hormona de crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorelaxina; las hormonas de glicoproteínas, tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento vascular endotelial; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- $\beta$ ; el factor de crecimiento plaquetario; los factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; el factor de crecimiento similar a la



5 insulina I y II; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductores; los interferones tales como el interferón- $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$ ; los factores estimulantes de colonias (CSF) tales como los CSF de macrófagos (M-CSF); los CSF de granulocitos macrófagos (GM-CSF); y los CSF de granulocitos (G-CSF); las interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 e IL-12; un factor de necrosis tumoral como el TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos que el incluyen LIF y el ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

10 El término "profármaco" como se usa en la presente solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de activarse o convertirse enzimáticamente o hidrolíticamente en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "*Prodrugs in Cancer Chemotherapy*" *Biochemical Society Transactions*, 14, págs. 375-382, 615<sup>a</sup> Reunión, Belfast (1986) y Stella *et al.*, "*Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery*", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), págs. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco incluyen, pero no se limitan a, los agentes quimioterápicos descritos anteriormente.

25 Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco (tal como, por ejemplo, anti-CD20, CD30, CD33, CD40, CD70, BCMA o anticuerpos Y de Lewis y, opcionalmente, un agente quimioterápico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

30 El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de la indicación o indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias concernientes al uso de dichos productos terapéuticos.

35 Una molécula "aislada" de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante a la que está asociada normalmente en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula aislada de ácido nucleico es distinta en la forma o la configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas aisladas de ácido nucleico se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula aislada de ácido nucleico incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el ácido nucleico donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

40 La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante enlazada operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procarionotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

45 Un ácido nucleico está "enlazado operativamente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está enlazado operativamente al ADN que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado operativamente a una secuencia codificante, por ejemplo, si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está enlazado operativamente a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilita la traducción. En general, "enlazado operativamente" significa que las secuencias de ADN que se enlazan están contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. El enlazamiento puede conseguirse mediante el ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores de oligonucleótidos de síntesis o enlazadores pueden usarse de acuerdo con la práctica convencional.

60 Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula", "estirpe celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente y todas las designaciones de este tipo incluyen la progenie. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula primaria sujeto y cultivos derivados de la misma independientemente del número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se detecta en la célula originalmente transformada. Donde se pretendan designaciones diferentes, quedará claro a partir del contexto.

65

Una "enfermedad autoinmune" en el presente documento es una enfermedad o trastorno que surge de y se dirige contra los propios tejidos de un individuo o un co-segregado o manifestación de la misma o afección resultante de ello. Los ejemplos de enfermedades o trastornos autoinmunes incluyen, pero no se limitan a la artritis (artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante), la psoriasis, la dermatitis incluyendo la dermatitis atópica; la urticaria idiopática crónica, incluyendo la urticaria crónica autoinmune, la polimiositis/dermatomiositis, la necrólisis epidérmica tóxica, la esclerodermia y la esclerosis sistémicas, las respuestas asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa) y la EII con co-segregado de pioderma gangrenoso, el eritema nodoso, la colangitis esclerosante primaria, y/o la episcleritis), el síndrome de dificultad respiratoria, incluyendo el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), la meningitis, las enfermedades mediadas por IgE tales como la anafilaxia y la rinitis alérgica, la encefalitis, tal como la encefalitis de Rasmussen, la uveítis, la colitis tal como la colitis microscópica y la colitis colagenosa, la glomerulonefritis (GN) tal como la GN membranosa, la GN membranosa idiopática, la GN membranosa proliferativa (GNMP), incluyendo la de Tipo I y la de Tipo II y la GN rápidamente progresiva, las afecciones alérgicas, el eczema, el asma, las afecciones que implican la infiltración de linfocitos T y las respuestas inflamatorias crónicas, la aterosclerosis, la miocarditis autoinmune, la deficiencia de adhesión de los leucocitos, el lupus eritematoso sistémico (LES) tal como el LES cutáneo, el lupus (incluyendo la nefritis, la cerebritis, el pediátrico, el no renal, el discoide, la alopecia), la diabetes de inicio juvenil, la esclerosis múltiple (EM), tal como la EM espino-óptica, la encefalomielitis alérgica, las respuestas inmunológicas asociadas a la hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, la tuberculosis, la sarcoidosis, la granulomatosis, incluyendo la granulomatosis de Wegener, la agranulocitosis, la vasculitis (incluyendo la vasculitis de vasos grandes (incluyendo la polimialgia reumática y la arteritis de células gigantes (de Takayasu)), la vasculitis de vasos medianos (incluyendo la enfermedad de Kawasaki y la poliarteritis nodosa), la vasculitis del SNC y la vasculitis asociada a ANCA, tal como la vasculitis o el síndrome de Churg-Strauss (SCS)), la anemia aplásica, la anemia de Coombs positiva, la anemia de Diamond Blackfan, la anemia hemolítica inmunitaria incluyendo la anemia hemolítica autoinmune (AHA), la anemia perniciosa, la aplasia pura de células rojas (APCR), la deficiencia del factor VIII, la hemofilia A, la neutropenia autoinmune, la pancitopenia, la leucopenia, las enfermedades que implican diapédesis de leucocitos, los trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, el síndrome de lesión de múltiples órganos, la miastenia grave, las enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo, la enfermedad de la membrana basal anti-glomerular, el síndrome de los anticuerpos antifosfolípidos, la neuritis alérgica, la enfermedad de Bechet, el síndrome de Castleman, el síndrome de Goodpasture, el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, el síndrome de Raynaud, el síndrome de Sjorgen, el síndrome de Stevens-Johnson, el rechazo del trasplante de órganos sólidos (incluyendo el tratamiento previo para los títulos de anticuerpos reactivos de panel alto, el depósito de IgA en los tejidos y el rechazo que surge del trasplante renal, el trasplante de hígado, el trasplante intestinal, el trasplante cardíaco, etc.), la enfermedad del injerto contra hospedador (EICH), el penfigoide ampollar, el pénfigo (incluyendo el vulgar, el foliáceo y la mucosidad penfigosa-pénfigo de membrana), las poliendocrinopatías autoinmunes, la enfermedad de Reiter, el síndrome del hombre rígido, la nefritis por complejos inmunes, las polineuropatías por IgM o la neuropatía mediada por IgM, la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), la trombocitopenia (desarrollada por los pacientes con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo la trombocitopenia autoinmune, la enfermedad autoinmune del testículo y el ovario incluyendo la orquitis y la ooforitis autoinmunes, el hipotiroidismo primario; las enfermedades endocrinas autoinmunes incluyendo la tiroiditis autoinmune, la tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), la tiroiditis subaguda, el hipotiroidismo idiopático, la enfermedad de Addison, la enfermedad de Grave, los síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), la diabetes de tipo I también conocida como diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), incluyendo la IDDM pediátrica y el síndrome de Sheehan; la hepatitis autoinmune, la neumonitis intersticial linfoide (VIH), la bronquiolitis obliterante (no trasplantados) vs NSIP, el síndrome de Guillain-Barré, la enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), la cirrosis biliar primaria, el esprúe celiaco (enteropatía por gluten), el esprúe refractario con co-segregado de dermatitis herpetiforme, la crioglobulinemia, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehrig), la arteriopatía coronaria, la enfermedad autoinmune del oído interno (EAOI), la pérdida de la audición autoinmune, el síndrome de mioclonía opsoclonía (SMO), la policondritis tal como la policondritis refractaria, la proteinosis alveolar pulmonar, la amiloidosis, la hepatitis de células gigantes, la escleritis, la gammapatía monoclonal de significado incierto/desconocido (GMSI), la neuropatía periférica, el síndrome paraneoplásico, las canalopatías tales como la epilepsia, la migraña, las arritmias, los trastornos musculares, la sordera, la ceguera, la parálisis periódica y las canalopatías del sistema nervioso central; el autismo, la miopatía inflamatoria y la glomerulosclerosis segmentaria focal (GSF).

El término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene del número indicado de átomos de carbono (por ejemplo, "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 átomos de carbono). Cuando no se indica el número de átomos de carbono, el grupo alquilo tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos "alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" representativos de cadena lineal incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo y n-octilo; mientras que los alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> ramificados incluyen, pero no se limitan a, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo y 2-metilbutilo; los alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> insaturados incluyen, pero no se limitan a, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo y -3-metil-1-butinilo. Un grupo alquilo puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero no limitados a, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -OH, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -SR', -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN;

donde cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> sin sustituir y arilo.

"Alquenilo" se refiere a un hidrocarburo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace *sp*<sup>2</sup> carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: etileno o vinilo (-CH=CH<sub>2</sub>), alilo (-CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), ciclopentenilo (-C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>), y 5-hexenilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>).

"Alquinilo" se refiere a un hidrocarburo C<sub>2</sub>-C<sub>18</sub> que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace *sp* carbono-carbono. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: acetilénico (-C≡CH) y propargilo (-CH<sub>2</sub>C≡CH).

"Alquileno" se refiere a un radical hidrocarbonado saturado de cadena ramificada o lineal, o cíclico, de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de dos átomos de carbono diferentes de un alcano parental. Los radicales alquileno típicos incluyen, pero no se limitan a: metileno (-CH<sub>2</sub>-), 1,2-etilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,3-propilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-butilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) y similares. Un "alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>" es un grupo hidrocarbonado saturado de cadena lineal, de fórmula -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-. Los ejemplos de un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

"Alquenileno" se refiere a un radical hidrocarbonado insaturado de cadena ramificada o lineal, o cíclico, de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de dos átomos de carbono diferentes de un alqueno parental. Los radicales alquenileno típicos incluyen, pero no se limitan a: 1,2-etileno (-CH=CH-).

"Alquinileno" se refiere a un radical hidrocarbonado insaturado de cadena ramificada o lineal, o cíclico, de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de dos átomos de carbono diferentes de un alquino parental. Los radicales alquinileno típicos incluyen, pero no se limitan a: acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH<sub>2</sub>C≡C-) y 4-pentinilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡CH-).

"Arilo" significa un radical hidrocarbonado aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático parental. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares. Un grupo aromático carbocíclico (arilo) o un grupo aromático heterocíclico (heteroarilo) puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero no limitados a alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>-NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en la que cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo sin sustituir.

"Arilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o *sp*<sup>3</sup>, está reemplazado por un radical arilo. Los grupos arilalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares. El grupo arilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo arilalquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el resto arilo tiene de 6 a 14 átomos de carbono.

"Heteroarilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o *sp*<sup>3</sup>, está reemplazado por un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo típicos incluyen, pero no se limitan a, 2-bencimidazolilmetilo, 2-furiletilo y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende de 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilo tiene de 5 a 14 átomos en el anillo, por lo general de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S, siendo el resto átomos de carbono. El resto heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 miembros en el anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S) o un biciclo que tenga de 7 a 10 miembros en el anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

"Alquilo sustituido", "arilo sustituido" y "arilalquilo sustituido" significan alquilo, arilo y arilalquilo respectivamente, en los que uno o más átomos de hidrógeno están reemplazados cada uno independientemente por un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, pero no se limitan a, -X, -R, -O<sup>-</sup>, -OR, -SR, -S<sup>-</sup>, -NR<sub>2</sub>, -NR<sub>3</sub>, =NR, -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NRC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R, -OS(=O)<sub>2</sub>OR, -S(=O)<sub>2</sub>NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -AsO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO<sub>2</sub>R, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=S)NR<sub>2</sub> o -C(=NR)NR<sub>2</sub>, donde cada X es independientemente un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>, un grupo protector o un resto de profármaco. Los grupos alquileno, alquenileno y alquinileno como se han descrito anteriormente también pueden estar sustituidos de manera similar.

"Heteroarilo" y "heterociclo" se refieren a un sistema de anillo en el que uno o más átomos del anillo son un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre. El radical heterociclo comprende de 1 a 20 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tenga de 3 a 7 miembros en el anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S) o un biciclo que tenga de 7 a 10 miembros en el anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6].

Se describen heterociclos en Paquette, Leo A.; *"Principles of Modern Heterocyclic Chemistry"* (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; *"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs"* (John Wiley & Sons, Nueva York, desde 1950 hasta el presente), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y *J. Am. Chem. Soc.* (1960) 82:5566

Los ejemplos de heterociclos incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo con azufre oxidado, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo,  $\beta$ -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoilo.

A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, la posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, la posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, la posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, la posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, la posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, la posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol, la posición 2 o 3 de una aziridina, la posición 2, 3 o 4 de una azetidina, la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de un quinolina o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Aún más normalmente, los heterociclos unidos a carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo o 5-tiazolilo.

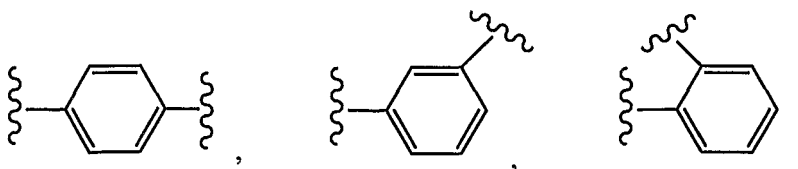
A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, la posición 2 de un isoindol o isoindolina, la posición 4 de una morfolina y la posición 9 de un carbazol o  $\beta$ -carbolina. Aún más normalmente, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

Un "heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> aromático o no aromático en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo están reemplazados independientemente por un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Los ejemplos representativos de un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> incluyen, pero no se limitan a, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> puede estar sin sustituir o sustituido con hasta siete grupos incluyendo, pero no limitados a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo. "Heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un grupo heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo está reemplazado por un enlace. Un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> puede estar sin sustituir o sustituido con hasta seis grupos, incluyendo, pero no limitados a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en los que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

"Carbociclo" significa un anillo saturado o insaturado que tiene de 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o de 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos en el anillo, aún más normalmente 5 o 6 átomos en el anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos en el anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos de anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Un "carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" es un anillo carbocíclico no aromático saturado o insaturado de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros. Los carbociclos C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> representativos incluyen, pero no se limitan a, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-

ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo y -ciclooctadienilo. Un grupo carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más grupos incluyendo, pero no limitados a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo. Un "carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" se refiere a un grupo carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno de los grupos carbociclo está reemplazado por un enlace.

Un "arileno" es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y pueden estar en las configuraciones orto, meta o para como se muestra en las siguientes estructuras:



en las que el grupo fenilo puede estar sin sustituir o sustituido con hasta cuatro grupos, incluyendo, pero no limitados a, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> y -CN; en la que cada R' se selecciona independientemente entre H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y arilo.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles sobre su compañero de imagen especular.

El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

"Diastereoisómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros pueden separarse con procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

Las definiciones y convenciones estereoquímicas utilizadas en el presente documento generalmente siguen S.P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms*, McGraw-Hill Book Company, Nueva York (1984); y Eliel y Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994). Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de luz polarizada en un plano. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l, o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación en el plano de la luz polarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto porque son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede definirse como enantiómero y una mezcla de dichos isómeros con frecuencia se llama mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina como mezcla racémica o racemato, lo cual puede producirse cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Las expresiones "mezcla racémica" y "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, carentes de actividad óptica.

Ejemplos de un "grupo protector de hidroxilo" incluyen, pero no se limitan a, metoximetil éter, 2-metoxietoximetil éter, tetrahidropiraniil éter, bencil éter, p-metoxibencil éter, trimetilsilil éter, trietilsilil éter, triisopropil silil éter, t-butildimetil silil éter, trifenilmetil silil éter, éster de acetato, ésteres de acetato sustituidos, pivaloato, benzoato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato.

"Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que puede estar sustituido por otro grupo funcional. Dichos grupos salientes son bien conocidos en la técnica y los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluenosulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato) y trifluorometilsulfonato.

Los ejemplos de "paciente" incluyen, pero no se limitan a, un ser humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro, gato, pájaro y ave. En una realización a modo de ejemplo, el paciente es un ser humano.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto (por ejemplo, un fármaco, un compuesto de fármaco-enlazador o un compuesto de fármaco-enlazador-ligando). El compuesto contiene normalmente al menos un grupo

amino y, en consecuencia, pueden formarse sales de adición de ácido con este grupo amino. Las sales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga sobre el compuesto parental. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

"Solvato farmacéuticamente aceptable" o "solvato" se refieren a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un compuesto, por ejemplo, un compuesto a modo de ejemplo o un conjugado a modo de ejemplo. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: AE es auristatina E, Boc es N-(*t*-butoxicarbonilo), cit es citrulina, dap es dolaproína, DCC es 1,3-diclorohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilazodicarboxilato, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleuína, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es etilenglicol dimetil éter (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es *N,N*-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTPA es el ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditiotreitól, EDCI es clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, EN-EM es espectrometría de masas con electronebulización, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, Ile es isoleucina, Lys es lisina, MeCN (CH<sub>3</sub>CN) es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmetil (o 4-metoxitritilo), nor es (1*S*,2*R*)-(+)-norefedrina, PAB es p-aminobencilo, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, PNP es p-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo *tris*-pirrolidino fosfonio, SEC es cromatografía de exclusión por tamaño, Su es succinimida, TBTU es tetrafluoroborato de *O*-benzotriazol-1-il-*N,N,N,N*-tetrametiluronio, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía de capa fina, UV es ultravioleta y Val es valina.

Las siguientes abreviaturas de enlazadores se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: Val Cit o vc es un sitio de dipéptido valina-citrulina de enlazador escindible por proteasa; PAB es p-aminobencilcarbamoilo; (Me)vc es N-metil-valina-citrulina, donde el enlace peptídico enlazador ha sido modificado para impedir su escisión por catepsina B; MC(PEG)<sub>6</sub>-OH es maleimidocaproil-polietilenglicol; SPP es 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo; y SMCC es 1-carboxilato de N-succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano.

Los términos "tratar" o "tratamiento", a menos que se indique otra cosa por el contexto, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, tal como el desarrollo o la propagación del cáncer. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de los síntomas, la disminución del alcance de la enfermedad, la estabilización (es decir, el no empeoramiento) del estado de la enfermedad, el retardo o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o la paliación de la patología y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la afección o trastorno así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se ha de prevenir la afección o trastorno.

En el contexto del cáncer, el término "tratar" incluye cualquiera o todos de: prevenir el crecimiento de las células tumorales, de las células de cancerosas o de un tumor; prevenir la replicación de las células tumorales o las células cancerosas, la disminución de la carga tumoral global o disminuir el número de células cancerosas y mejorar uno o más síntomas asociados a la enfermedad.

En el contexto de una enfermedad autoinmune, el término "tratar" incluye cualquiera o todos de: prevenir la replicación de las células asociadas a una patología autoinmune, incluyendo, pero no limitadas a, las células que producen un anticuerpo autoinmune, disminuir la carga de anticuerpos autoinmunes y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.

En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término "tratar" incluye cualquiera o todos de: prevenir el crecimiento, la multiplicación o la replicación del patógeno que causa la enfermedad infecciosa y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa

Las siguientes abreviaturas de fármacos citotóxicos se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: "MMAF" es N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina (PM 731,5); "MMAZ" es N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína con un análogo de fenilalanina en el extremo C. Z es -NR<sup>9</sup>Z<sup>1</sup>.

## 5 Realizaciones

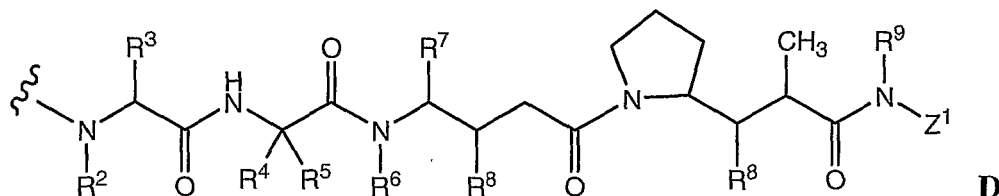
### Compuestos y conjugados

Como se señaló en el sumario, la presente divulgación se dirige a una serie de compuestos y conjugados que contienen un compuesto de fármaco (D, del inglés *drug*). Los compuestos de fármaco son útiles como entidades individuales o pueden conjugarse con ligandos (L, en algunas realizaciones, anticuerpos), ya sea directamente o a través de una unidad de enlazador (LU, del inglés *linker unit*). La unidad de enlazador puede funcionar para proporcionar una liberación adecuada de D o el espaciamiento entre D y L. Además, algunas unidades de enlazador puede tener múltiples fármacos unidos (por ejemplo, de uno a cuatro fármacos adjuntos pueden representarse como -LU-(D)<sub>1-4</sub>).

En un grupo de realizaciones, se describen compuestos que tienen la fórmula:

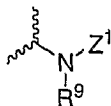


o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que L es una unidad de ligando; p es un número entero de 1 a aproximadamente 20; y D es un resto de fármaco que tiene la Fórmula D:

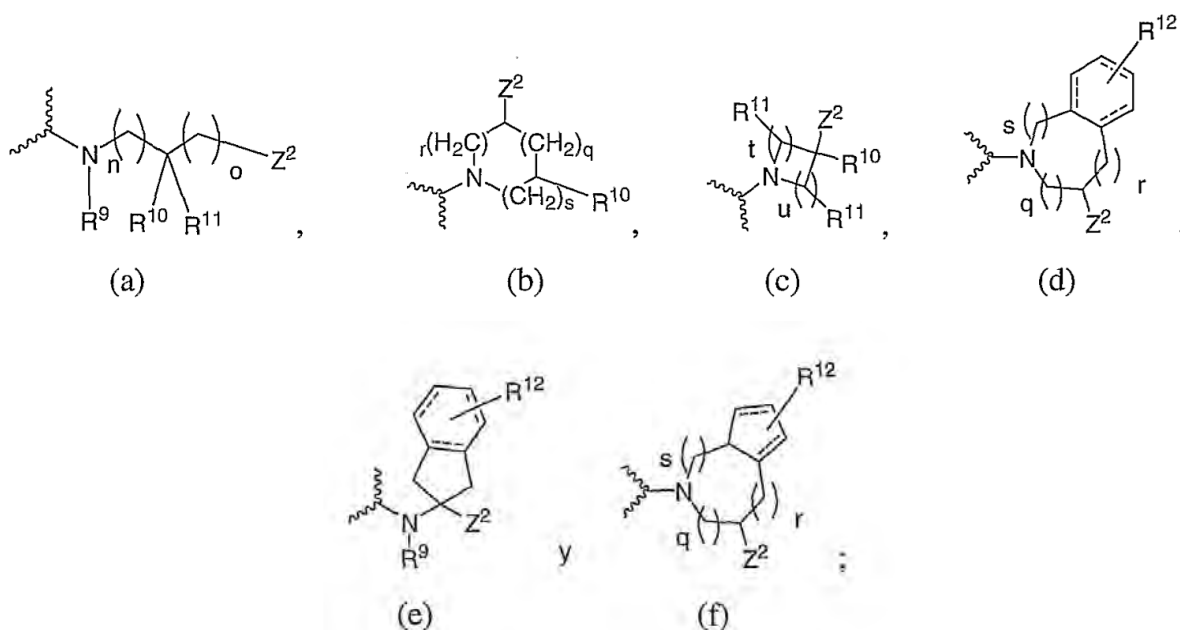


en la que: R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo; o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6; R<sup>6</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>7</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>); cada X<sup>1</sup> es independientemente alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>; y el resto -NR<sup>9</sup>Z<sup>1</sup> es un bioisómero de fenilalanina con una cadena lateral de aminoácido modificado.

En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina



se selecciona entre el grupo que consiste en:



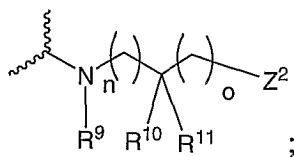
en las que  $\text{---}$  representa un enlace sencillo o doble;

- 5  $R^9$  se selecciona entre el grupo que consiste en H y un grupo protector de amino;  
 $R^{10}$  se selecciona entre el grupo que consiste en H y  $-(CR^{13}R^{14})_xR^{15}$ ;  
 cada  $R^{11}$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , halógeno, arilo, aril-  
 alquilo  $C_1-C_{20}$ , haloalquilo  $C_1-C_{10}$ ,  $OR^{16}$  y  $N(R^{16})_2$ ;  
 $R^{12}$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , halógeno, arilo, aril-alquilo  $C_1-C_{20}$ , aril-  
 alqueno  $C_2-C_{20}$ , aril-alquino  $C_2-C_{20}$ ,  $OR^{16}$ ,  $N(R^{16})_2$  y  $-C(O)R^{16}$ ;  
 10 cada  $R^{13}$  y  $R^{14}$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , halógeno,  
 arilalquilo, haloalquilo  $C_1-C_{10}$ ,  $OR^{16}$ ,  $SR^{16}$ ,  $N(R^{16})_2$ ,  $-OC(O)R^{16}$ ,  $-N(R^{16})C(O)R^{16}$ ,  $-COOR^{16}$ ,  $-CON(R^{16})_2$ ,  $X^1-SO_3H$ ,  
 $X^1-SO_3$ -alquilo  $C_1-C_{20}$ ,  $X^1-OSO_3H$ ,  $X^1-OSO_3$ -alquilo  $C_1-C_{20}$ ,  $X^1-SO_2$ -alquilo  $C_1-C_{20}$ ,  $X^1-SO$ -alquilo  $C_1-C_{20}$ ,  $-$   
 $OP(O)(OR^{16})_2$ ,  $-OP(O)(NR^{16})_2$ ,  $-OP(O)N(R^{16})_2O^{16}$ ,  $-OP(O)(R^{16})OR^{16}$ ,  $-OP(O)(R^{16})N(R^{16})_2$ ,  $-P(O)(OR^{16})_2$ ,  $-$   
 15  $P(O)(NR^{16})_2$ ,  $-P(O)N(R^{16})_2OR^{16}$ , alquilo  $C_1-C_{20}$ , carbociclo  $C_3-C_8$ , arilo,  $X^1$ -arilo,  $X^1$ -carbociclo  $C_3-C_8$ , heterociclo  
 $C_3-C_{20}$  y  $X^1$ -heterociclo  $C_3-C_8$ ;  
 o  $R^{13}$  y  $R^{14}$  se combinan entre sí para formar un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en  $=O$ ,  $=N-$   
 $NH-R^{17}$ ,  $=N-NH-C(O)-R^{17}$  y un carbociclo  $C_3-C_8$ ;  
 cada  $R^{15}$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , carbociclo  $C_3-C_8$ ,  
 arilo,  $X^1$ -arilo, alquil  $C_1-C_{20}$ -carbociclo  $C_3-C_8$ , heterociclo  $C_3-C_{20}$ ,  $X^1$ -heterociclo  $C_3-C_8$ ,  $-COOR^{16}$ ,  $-CON(R^{16})_2$ ,  $-$   
 20  $C(O)R^{16}$  e  $Y^1(CR^{13}R^{14})_xR^{18}$ ; y las porciones de carbociclo, arilo y heterociclo están opcionalmente sustituidas con  
 de uno a tres grupos  $R^{12}$ .  
 cada  $R^{16}$  es independientemente H o alquilo  $C_1-C_{20}$ ;  
 $R^{17}$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , carbociclo  $C_3-C_8$ , arilo,  $X^1$ -arilo, alquil  $C_1-C_{20}$ -  
 carbociclo  $C_3-C_8$ , heterociclo  $C_3-C_8$  y  $X^1$ -heterociclo  $C_3-C_8$ ;  
 25 cada  $R^{18}$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , carbociclo  $C_3-C_8$ ,  
 arilo,  $X^1$ -arilo,  $X^1$ -carbociclo  $C_3-C_8$ , heterociclo  $C_3-C_{20}$ ,  $X^1$ -heterociclo  $C_3-C_8$ ,  $-COOR^{16}$ ,  $-CON(R^{16})_2$  y  $-C(O)R^{16}$ ;  
 $Y^1$  es O, S,  $NR^{16}$ , SO,  $SO_2$  o Se;  
 cada  $X^1$  es independientemente alqueno  $C_1-C_{10}$ ;  
 el subíndice x es un número entero de 0 a 10;  
 30 los subíndices n, o, q, r, s, t y u son independientemente números enteros de 0 a 2;  
 $Z^2$  es  $COZ^3R^{19}$ ;  
 $Z^3$  es O, S, NH o  $NR^{20}$ , en el que  $R^{20}$  es alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 $R^{19}$  se selecciona entre H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , arilo, heterociclo  $C_3-C_8$ ,  $-(X^1O)_v-R^{22}$ ,  $OR-(X^1O)_v-CH(R^{23})_2$ ;  
 v es un número entero que varía de 1 a 1000;  
 35  $R^{22}$  es H o alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 cada  $R^{23}$  es independientemente H,  $COOH$ ,  $-(CH_2)_1-N(R^{24})_2$ ,  $-(CH_2)_1-SO_3H$  o  $-(CH_2)_1-SO_3$ -alquilo  $C_1-C_8$ ; y  
 cada  $R^{24}$  es independientemente H, alquilo  $C_1-C_8$  o  $-(CH_2)_1-COOH$ ; donde; 1 es un número entero que varía de 0  
 a 6; a condición de que cuando n y o sean 0 y  $R^{11}$  es H, entonces  $R^{10}$  sea distinto de arilo- $CH_2$  o  $CH_2$ -heterociclo  
 40  $C_3-C_8$ .

En una realización,  $R^9$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_{20}$ , carbociclo  $C_3-C_8$ ,  $X^1$ -arilo,  $X^1$ -  
 (carbociclo  $C_3-C_8$ ) y  $X^1$ -heterociclo  $C_3-C_8$ . En otra realización  $R^9$  es H.

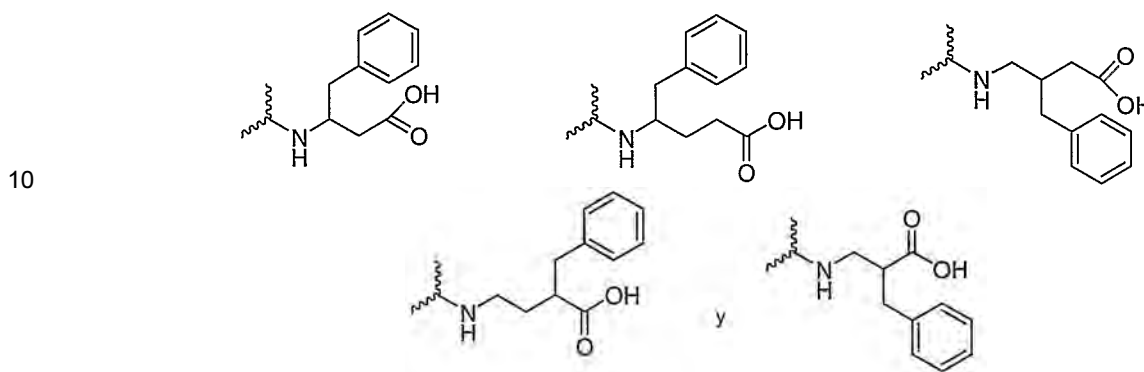


En una realización, el resto de bioisótero de fenilalanina es



- 5 en la que R<sup>9</sup> es H; R<sup>10</sup> es bencilo; R<sup>11</sup> es H; Z<sup>2</sup> es CO<sub>2</sub>H; el subíndice n es un número entero de 0 a 2; y el subíndice o es un número entero de 0 a 1 a condición de que n + o sea al menos 1.

En una realización, el resto de bioisótero de fenilalanina se selecciona entre el grupo que consiste en

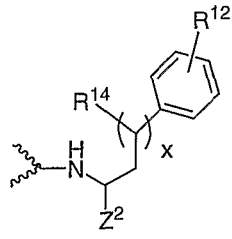


En una realización, el resto de bioisótero de fenilalanina es



- 20 en la que R<sup>9</sup> es H o un grupo protector de amino; R<sup>10</sup> es H y -(CR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>)<sub>x</sub>R<sup>15</sup>; cada R<sup>11</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, halógeno, arilo, aril-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, OR<sup>16</sup> y N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>; R<sup>12</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, halógeno, arilo, aril-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, aril-alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, aril-alquino C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>, OR<sup>16</sup>, N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub> y -C(O)R<sup>16</sup>; cada R<sup>13</sup> y R<sup>14</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, halógeno, arilalquilo, haloalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, OR<sup>16</sup>, SR<sup>16</sup>, N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -OC(O)R<sup>16</sup>, -N(R<sup>16</sup>)C(O)R<sup>16</sup>, -COOR<sup>16</sup>, -CON(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -X<sup>1</sup>-SO<sub>3</sub>H, -X<sup>1</sup>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -X<sup>1</sup>-OSO<sub>3</sub>H, -X<sup>1</sup>-OSO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -X<sup>1</sup>-SO<sub>2</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -X<sup>1</sup>-SO-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -OP(O)(OR<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -OP(O)(NR<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -OP(O)(R<sup>16</sup>)OR<sup>16</sup>, -OP(O)(R<sup>16</sup>)N(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(OR<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(NR<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -P(O)(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>O<sup>16</sup>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, -X<sup>1</sup>-arilo, -X<sup>1</sup>-carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y -X<sup>1</sup>-heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>; o R<sup>13</sup> y R<sup>14</sup> se combinan entre sí para formar un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en =O, =N-NH-R<sup>17</sup>, =N-NH-C(O)-R<sup>17</sup> y un carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>; cada R<sup>15</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, -X<sup>1</sup>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -X<sup>1</sup>-heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -COOR<sup>16</sup>, -CON(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub>, -C(O)R<sup>16</sup> y -Y<sup>1</sup>(CR<sup>13</sup>R<sup>14</sup>)<sub>x</sub>R<sup>18</sup> en el que las porciones carbociclo, arilo y heterociclo están opcionalmente sustituidas con de uno a tres grupos R<sup>12</sup>, cada R<sup>16</sup> es independientemente H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>; R<sup>17</sup> es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>; cada R<sup>18</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, X<sup>1</sup>-heterociclo C<sub>3</sub>-C, -COOR<sup>16</sup>, -CON(R<sup>16</sup>)<sub>2</sub> y -C(O)R<sup>16</sup>; Y<sup>1</sup> es O, S, NR<sup>16</sup>, SO, SO<sub>2</sub> o Se; cada X<sup>1</sup> es independientemente alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>; el subíndice x es un número entero de 0 a 10; los subíndices n, o, q, r, s, t y u son independientemente números enteros de 0 a 2 a condición de que n + o sea al menos 1; Z<sup>2</sup> es COZ<sup>3</sup>R<sup>19</sup>; Z<sup>3</sup> es O, S, NH o NR<sup>20</sup>, en el que R<sup>20</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>19</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, arilo, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -(X<sup>1</sup>O)<sub>v</sub>-R<sup>22</sup>, o -(X<sup>1</sup>O)<sub>v</sub>-CH(R<sup>23</sup>)<sub>2</sub>; v es un número entero de 1 a 1000; R<sup>22</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; y cada R<sup>23</sup> es independientemente H, COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-N(R<sup>24</sup>)<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>3</sub>H o -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-SO<sub>3</sub>-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; cada R<sup>24</sup> es independientemente H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> o -(CH<sub>2</sub>)<sub>1</sub>-COOH; donde; 1 es un número entero que varía de 0 a 6; a condición de cuando n y o sean 0, R<sup>11</sup> sea H, el R<sup>10</sup> sea distinto de arilo-CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>-heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>.

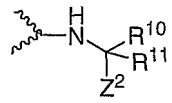
- 40 En una realización, el resto de bioisótero de fenilalanina es



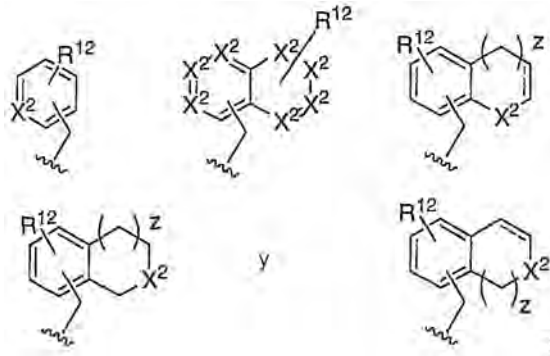
en la que  $R^{12}$  y  $R^{14}$  son como se ha descrito anteriormente;  $Z^2$  es  $CO_2H$ ; y el subíndice  $x$  es un número entero de 0 a 2.

5

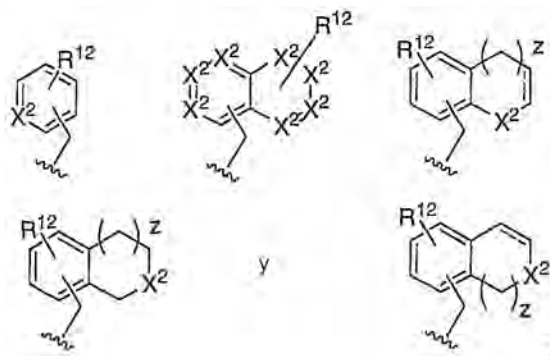
En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina es



10 en la que  $R^{10}$  es  $CH_2$ -heterociclo  $C_3-C_8$  o arilo- $CH_2$ ;  $R^{11}$  es H; y  $Z^2$  es como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones,  $R^{10}$  se selecciona entre el grupo que consiste en:

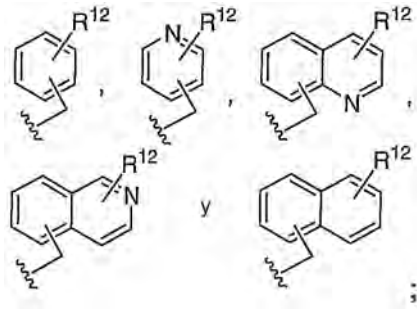


15 en la que  $R^{12}$  es como se ha descrito anteriormente; cada  $X^2$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en N,  $NR^{16}$ , S, O,  $CR^{16}$  y  $CHR^{16}$ ; y el subíndice  $z$  es un número entero de 0 a 2. En otras realizaciones,  $R^{10}$  se selecciona entre el grupo que consiste en:



20 en la que  $R^{12}$  es como se ha descrito anteriormente; cada  $X^2$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en N,  $NR^{16}$ , S, O,  $CR^{16}$  y  $CHR^{16}$ ; y el subíndice  $z$  es un número entero de 0 a 2; y no más de dos grupos  $X^2$  adyacentes son distintos de  $CR^{16}$  o  $CDH^{16}$ . En otras realizaciones más,  $R^{10}$  se selecciona entre el grupo que consiste en:

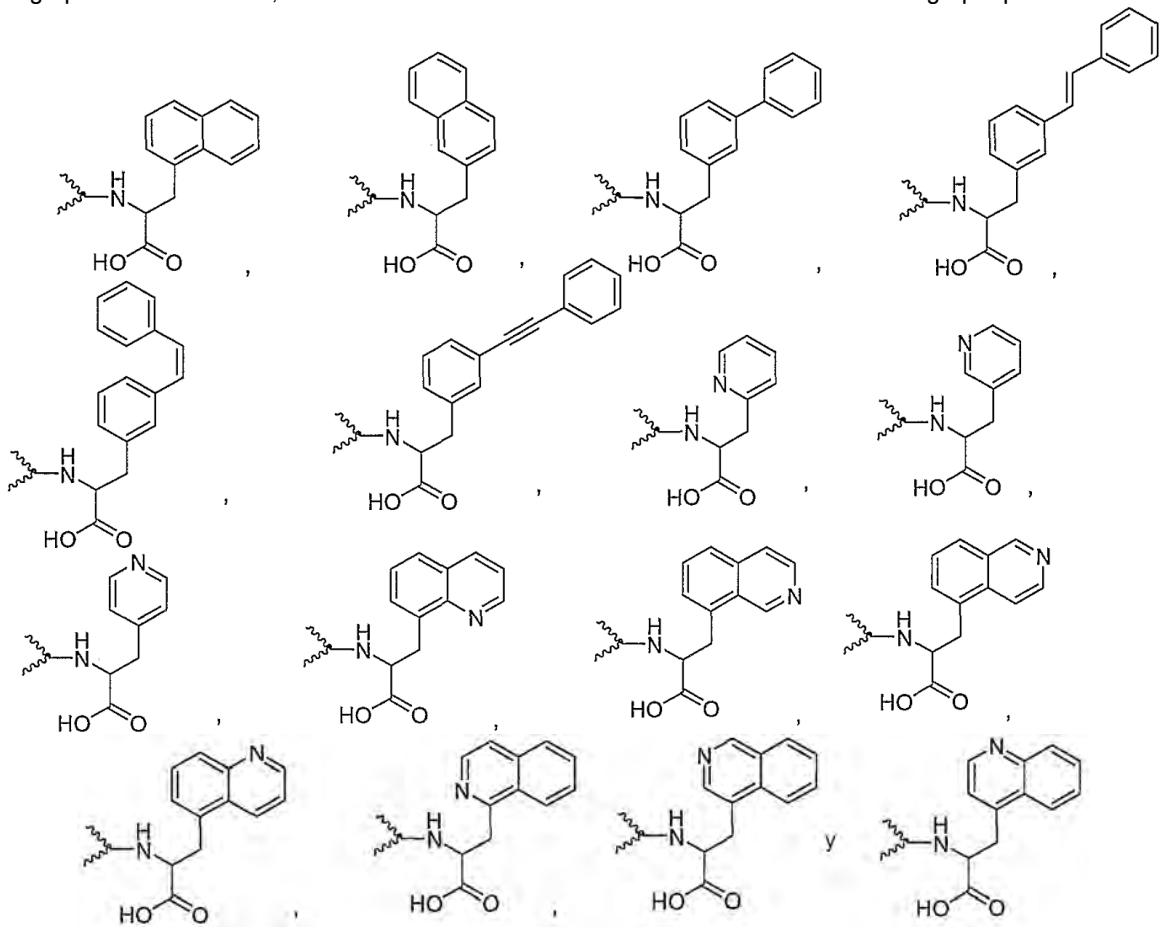
25



en la que  $R^{12}$  se selecciona entre el grupo: H, alquilo, halógeno, amino, carboxi, amido, carboetoxi, formilo, fenilo, E-2-feniletlenilo, Z-2-feniletlenilo y 2-feniletinilo.

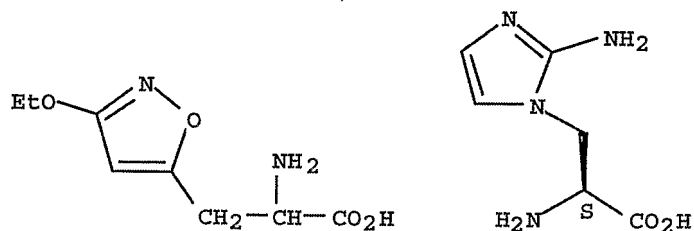
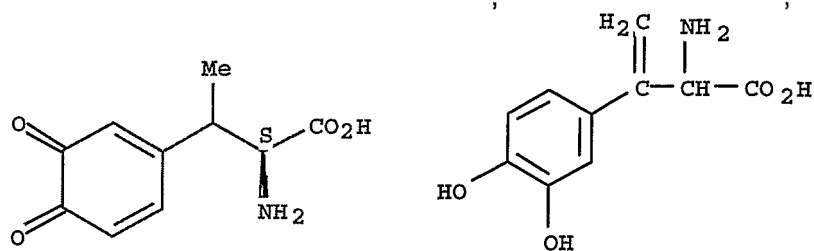
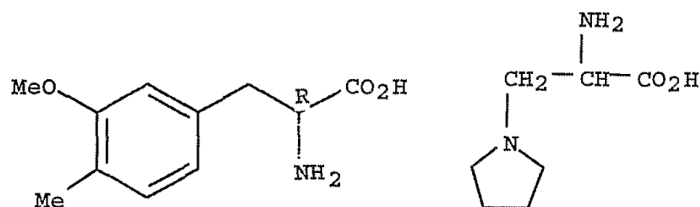
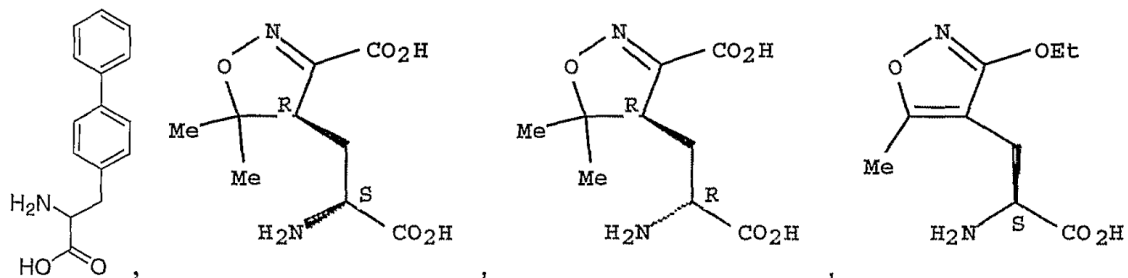
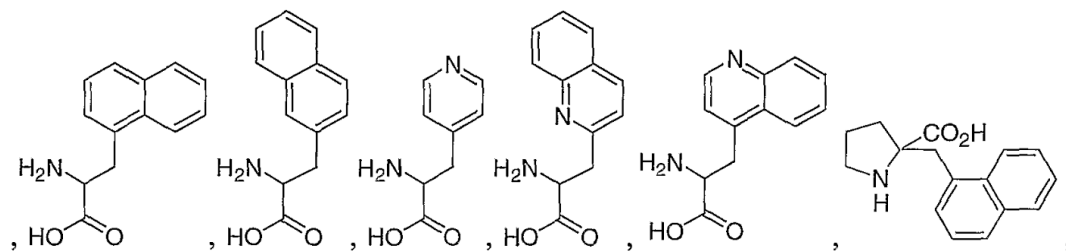
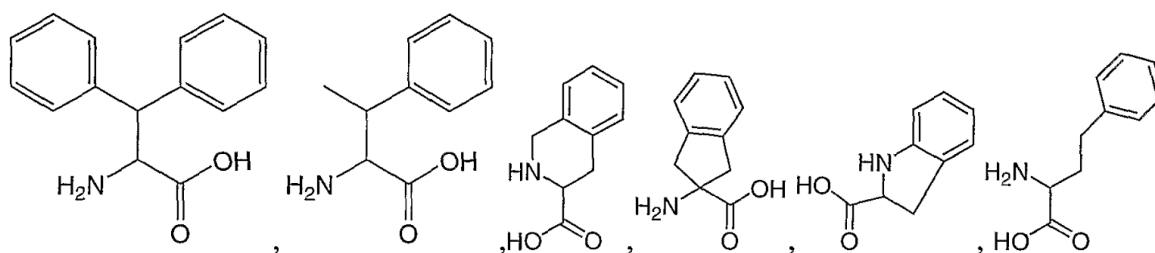
5

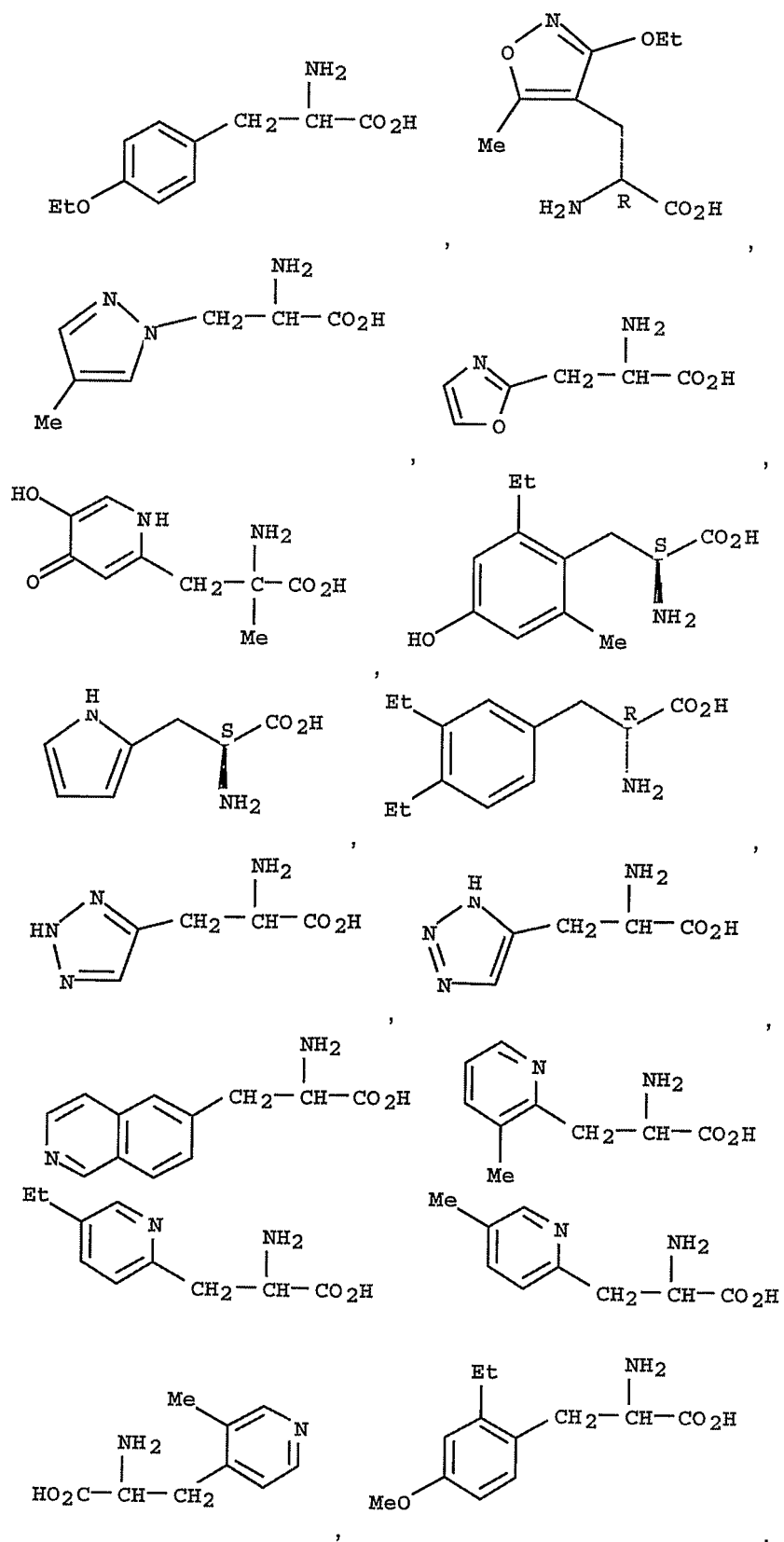
En un grupo de realizaciones, el resto de bioisótero de fenilalanina se selecciona entre el grupo que consiste en:



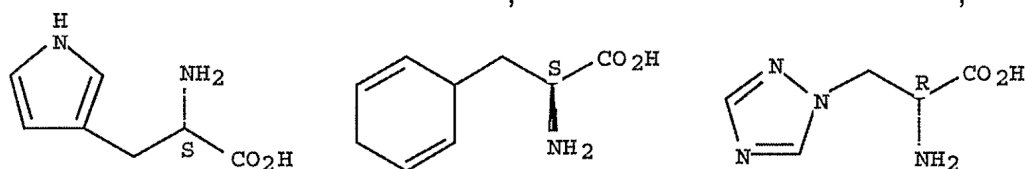
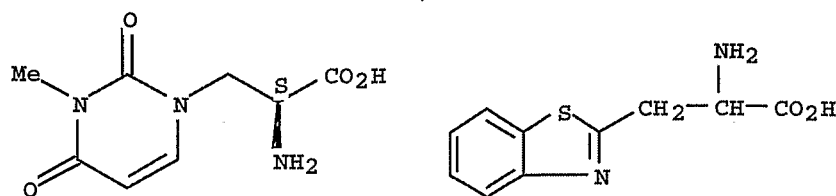
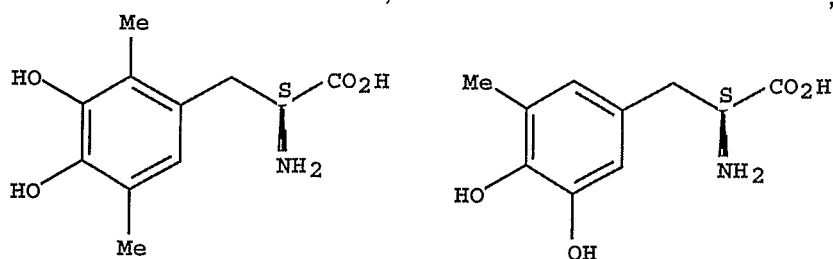
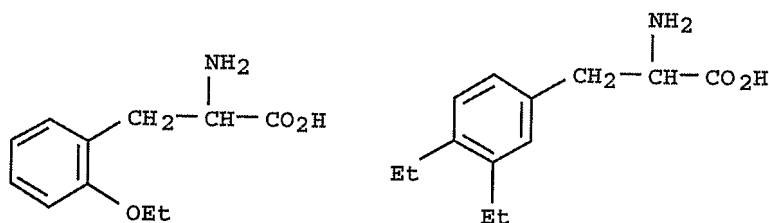
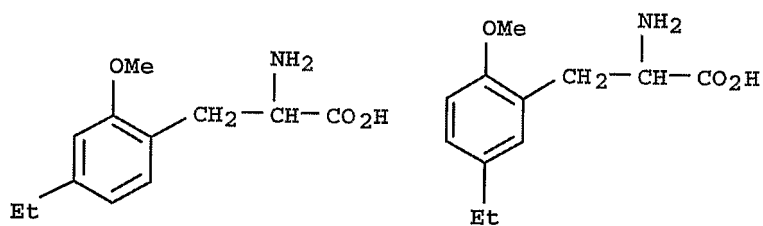
10 En una realización, el resto de bioisótero de fenilalanina se selecciona entre el grupo que consiste en:



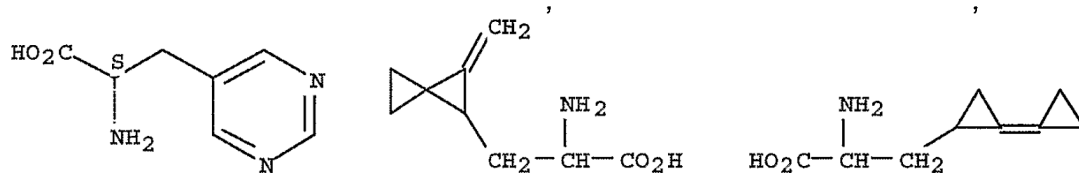
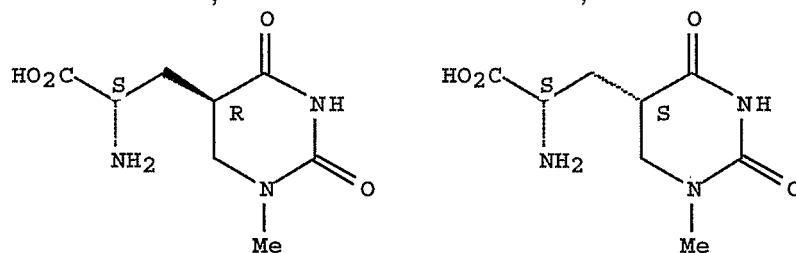


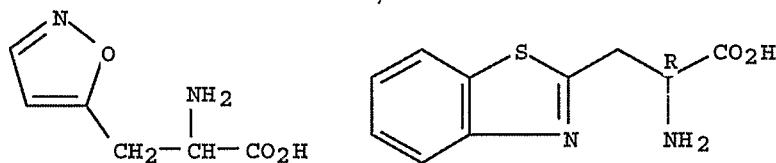
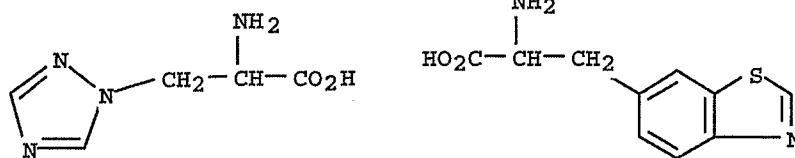
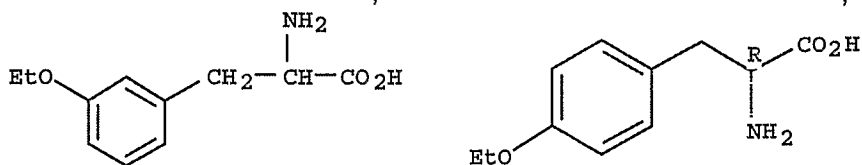
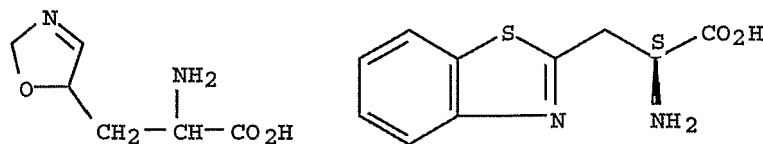
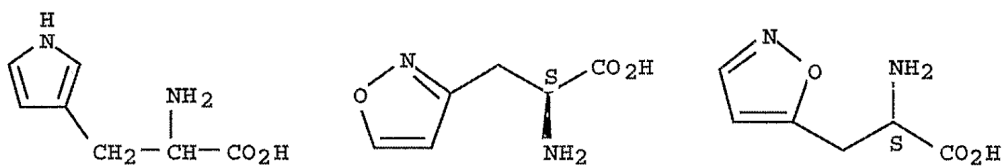


5

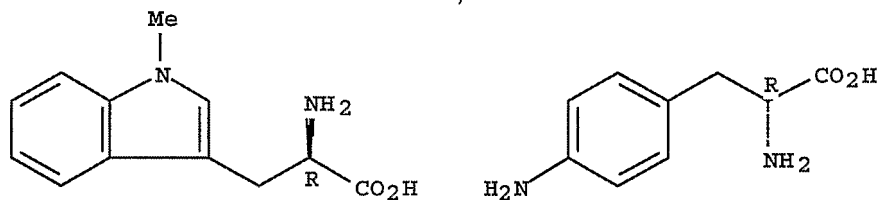
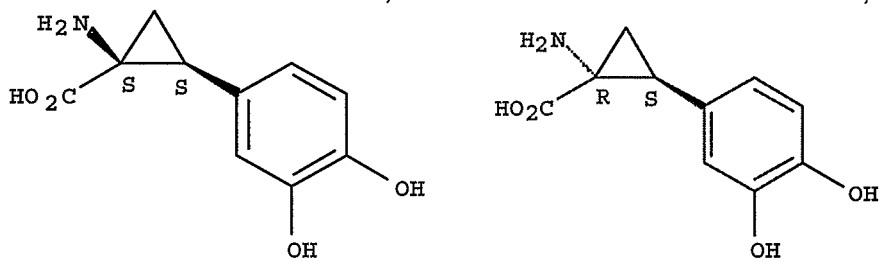


5

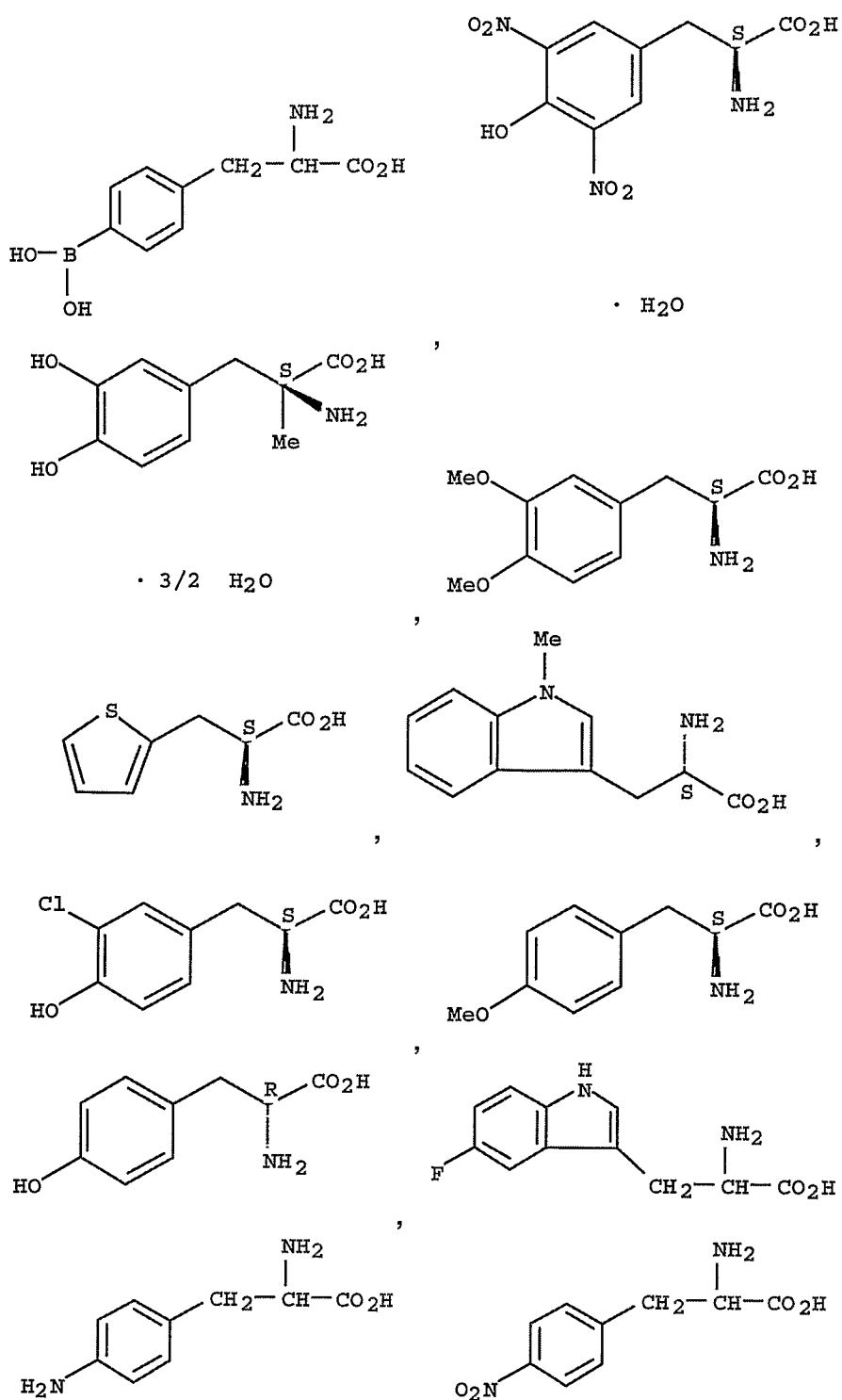


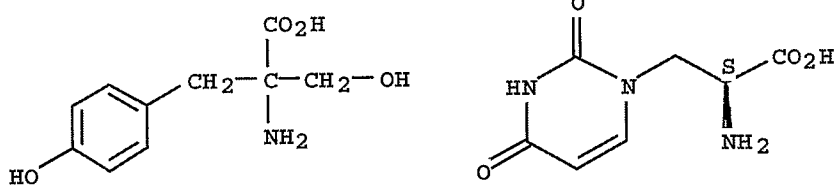
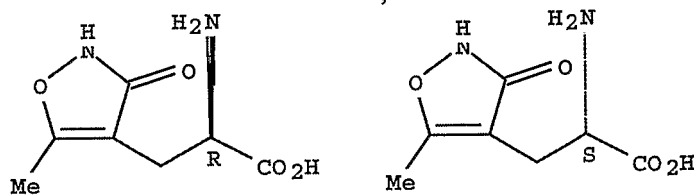
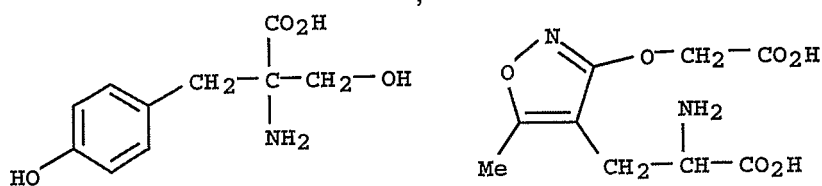
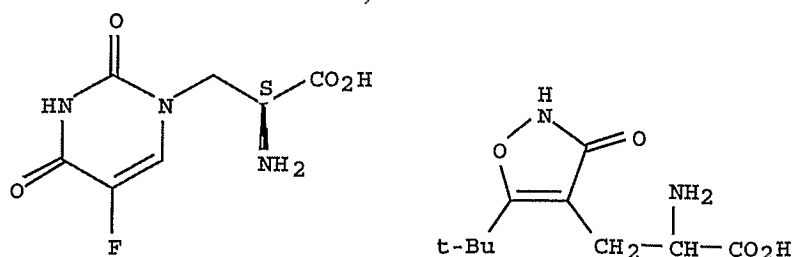
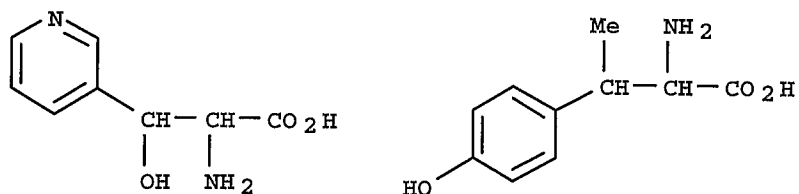
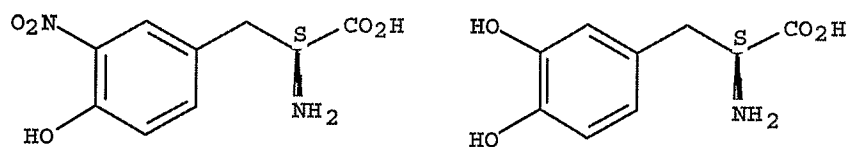


5

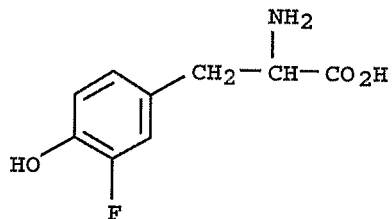
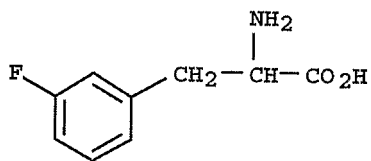
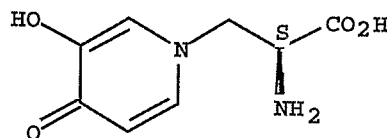
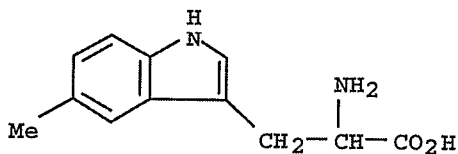
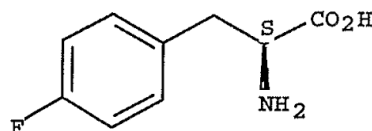
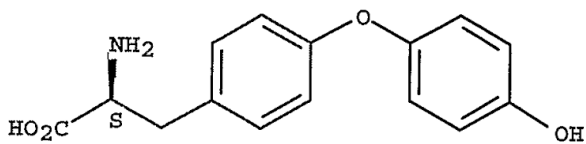
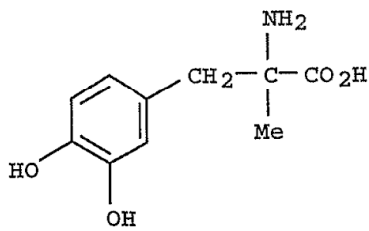
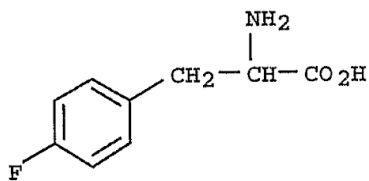
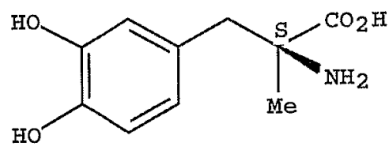
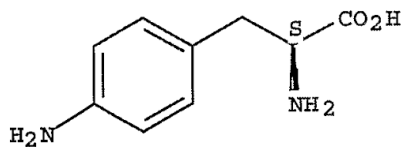
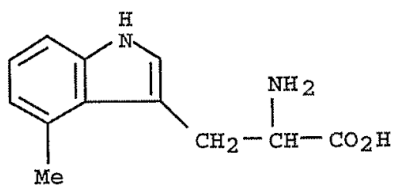
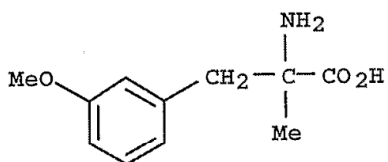
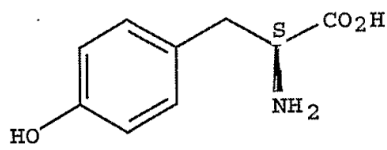
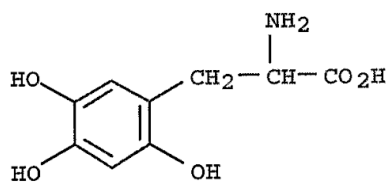


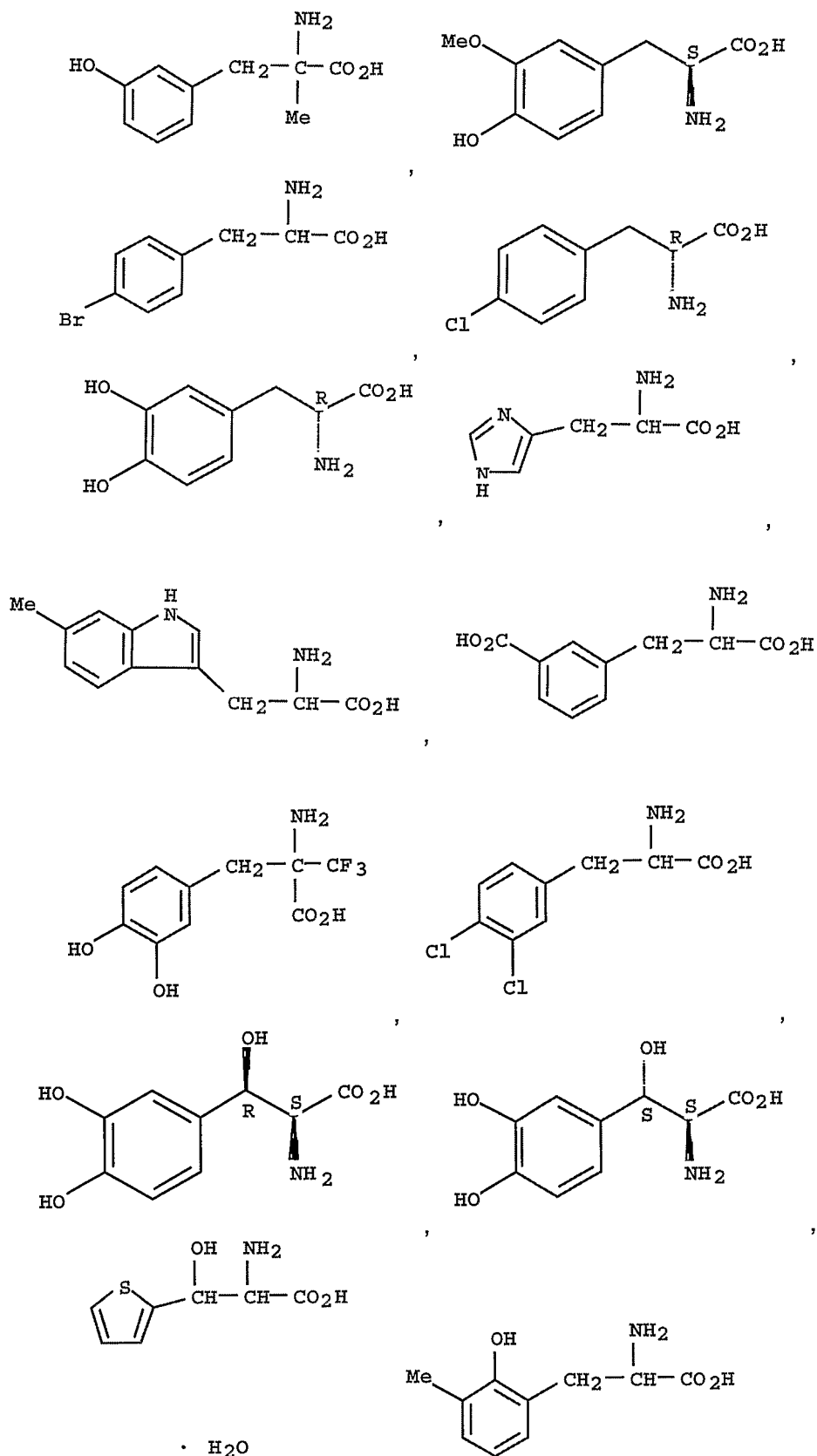


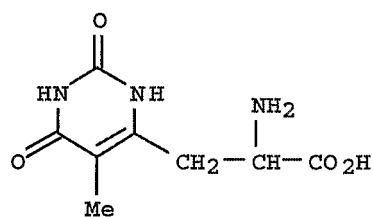
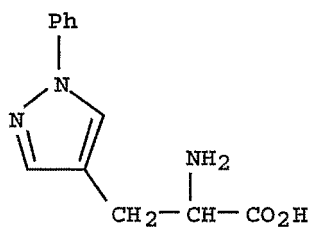
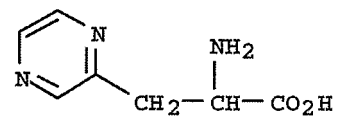
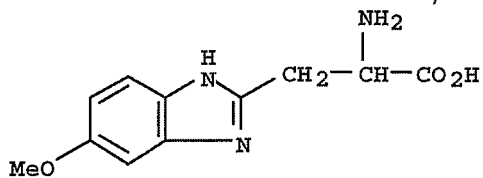
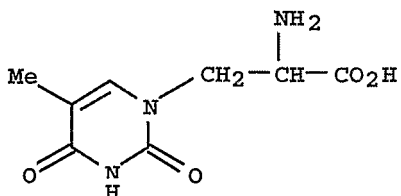
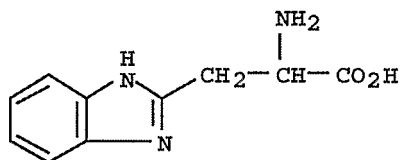
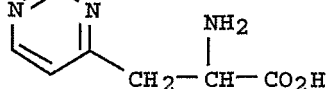
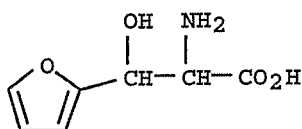
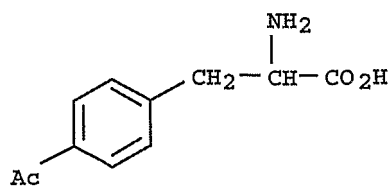
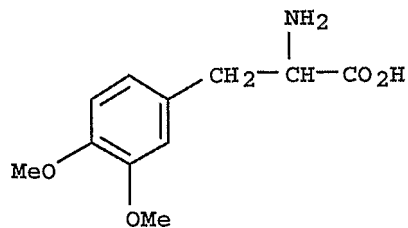
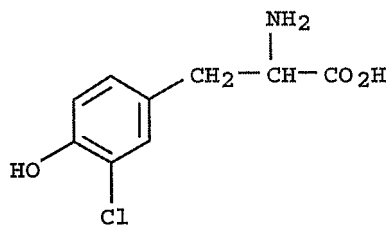
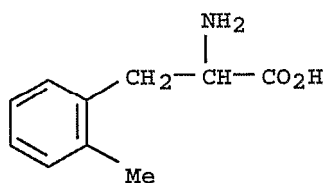
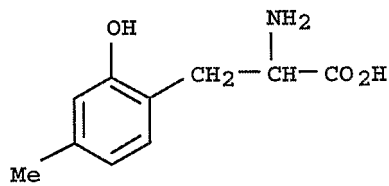
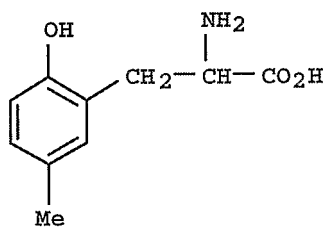




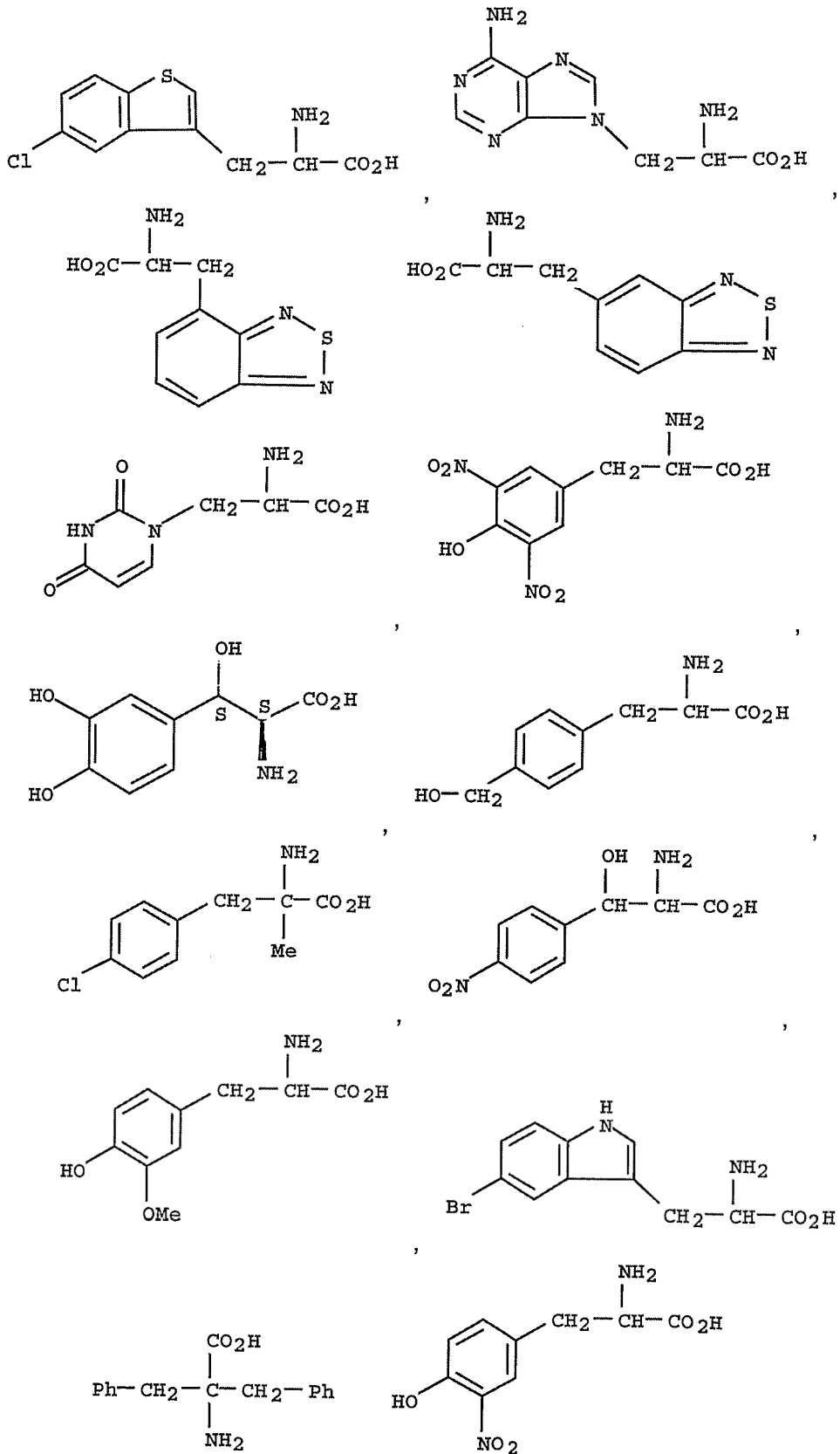
5





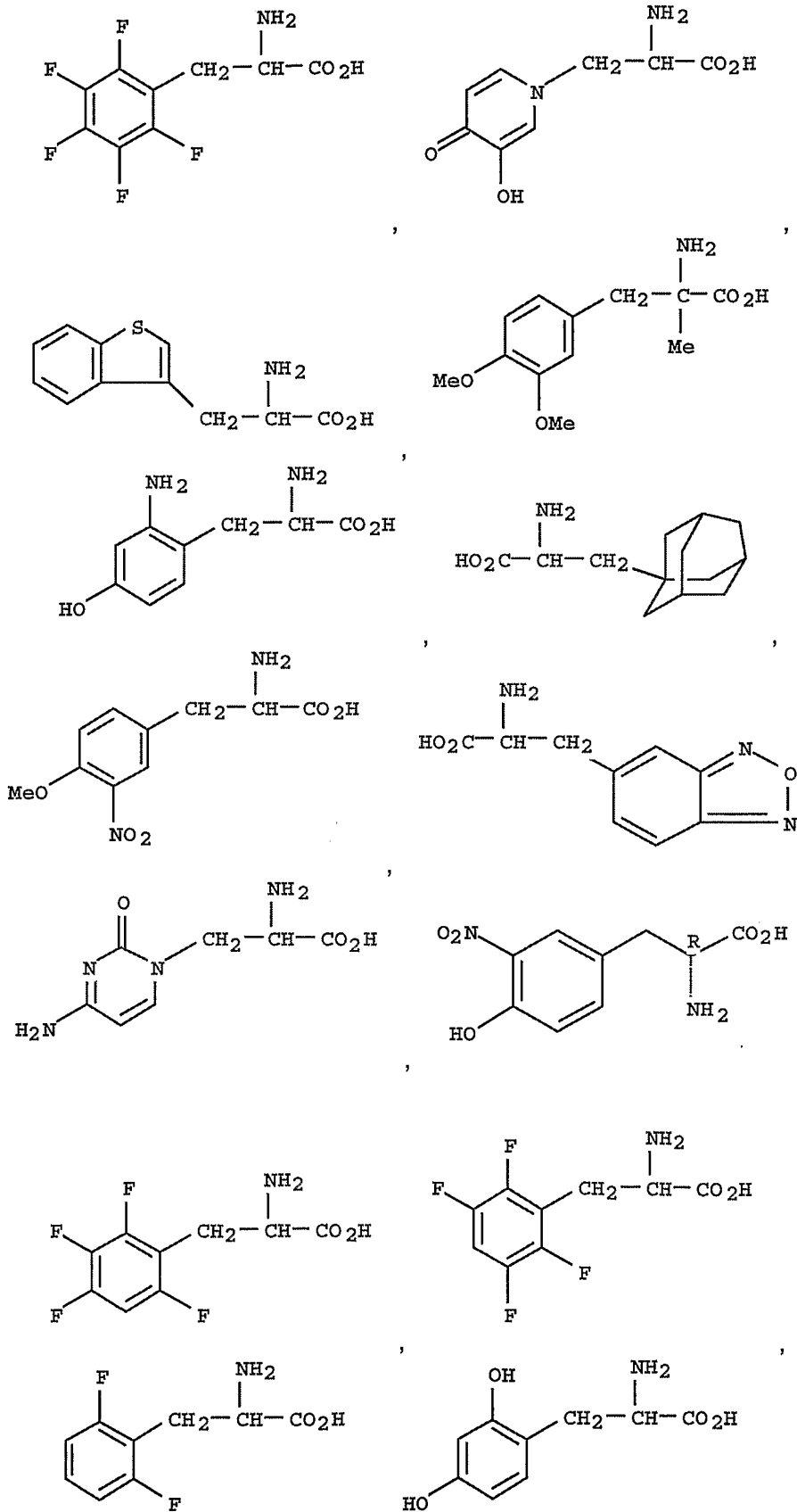




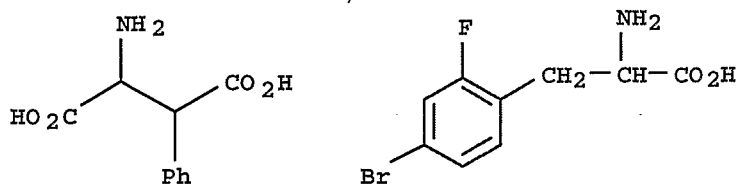
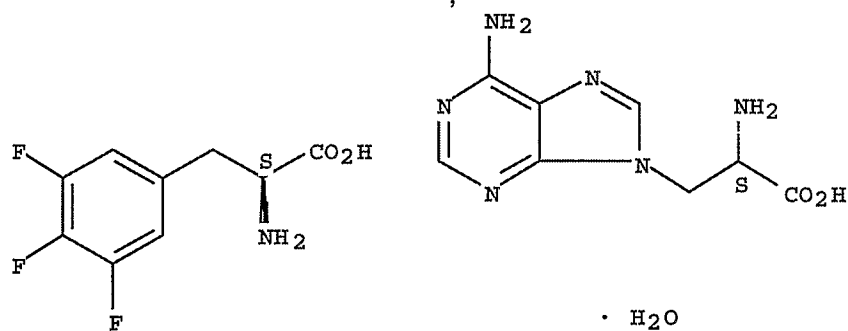
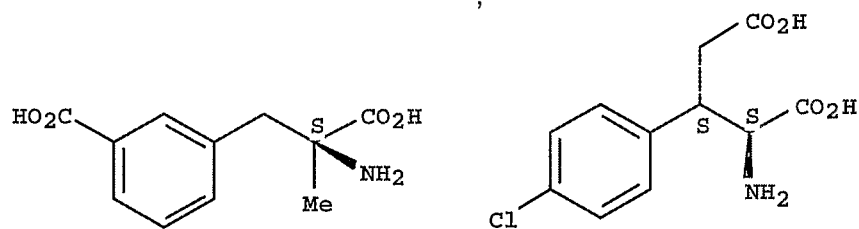
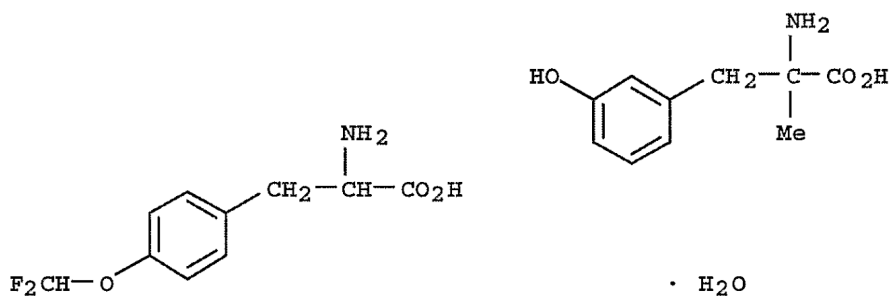
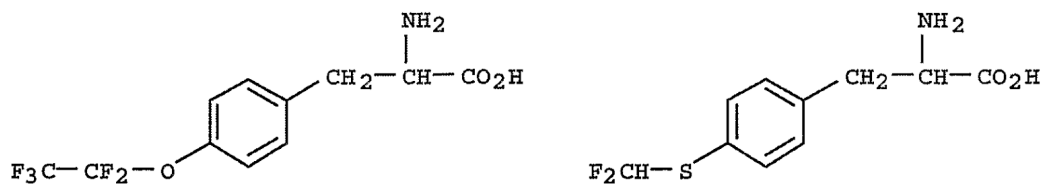


5

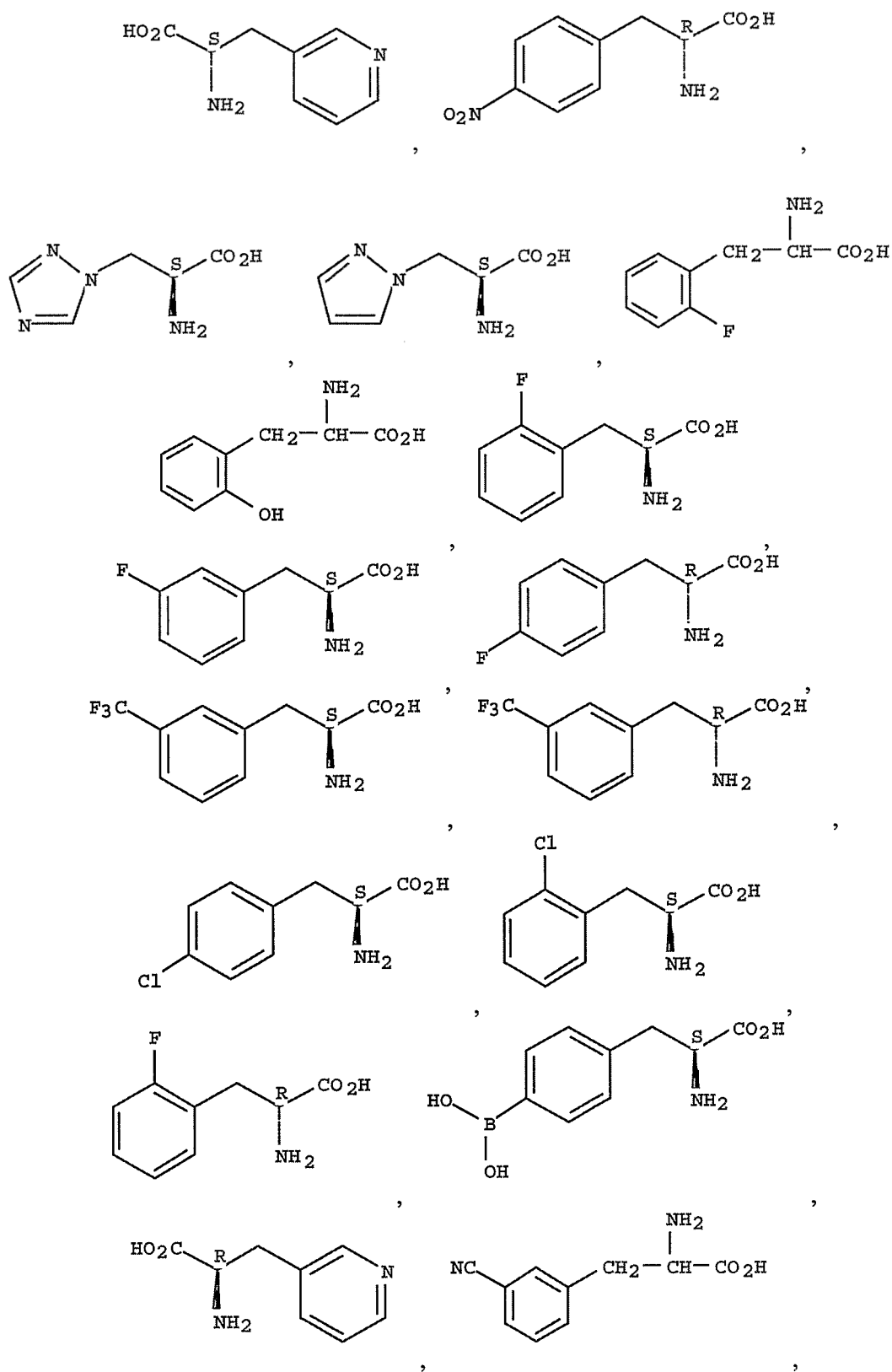
5



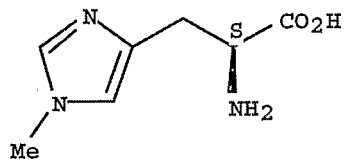




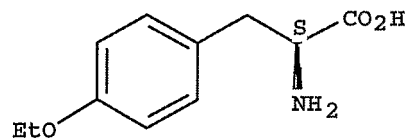
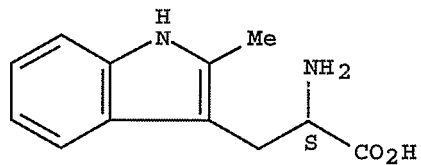
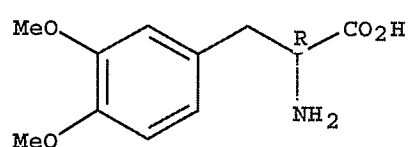
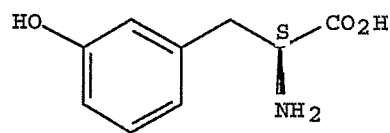
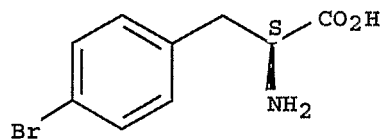
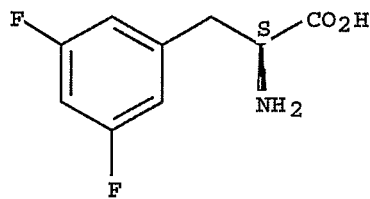
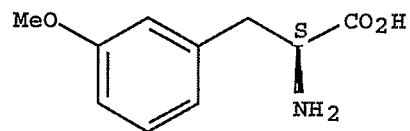
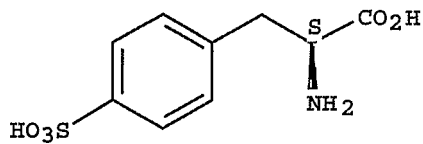
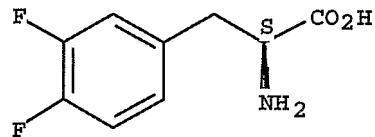
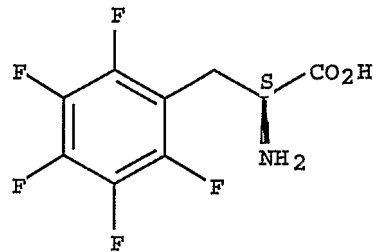
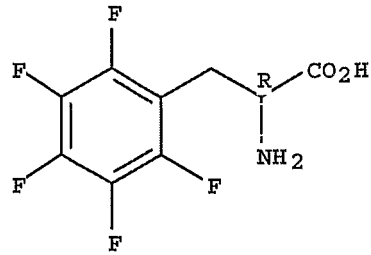
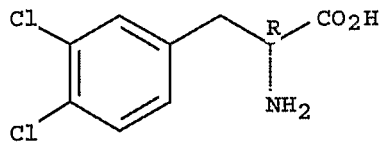
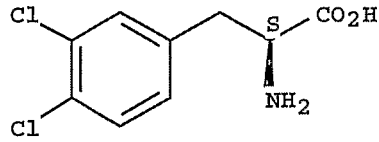




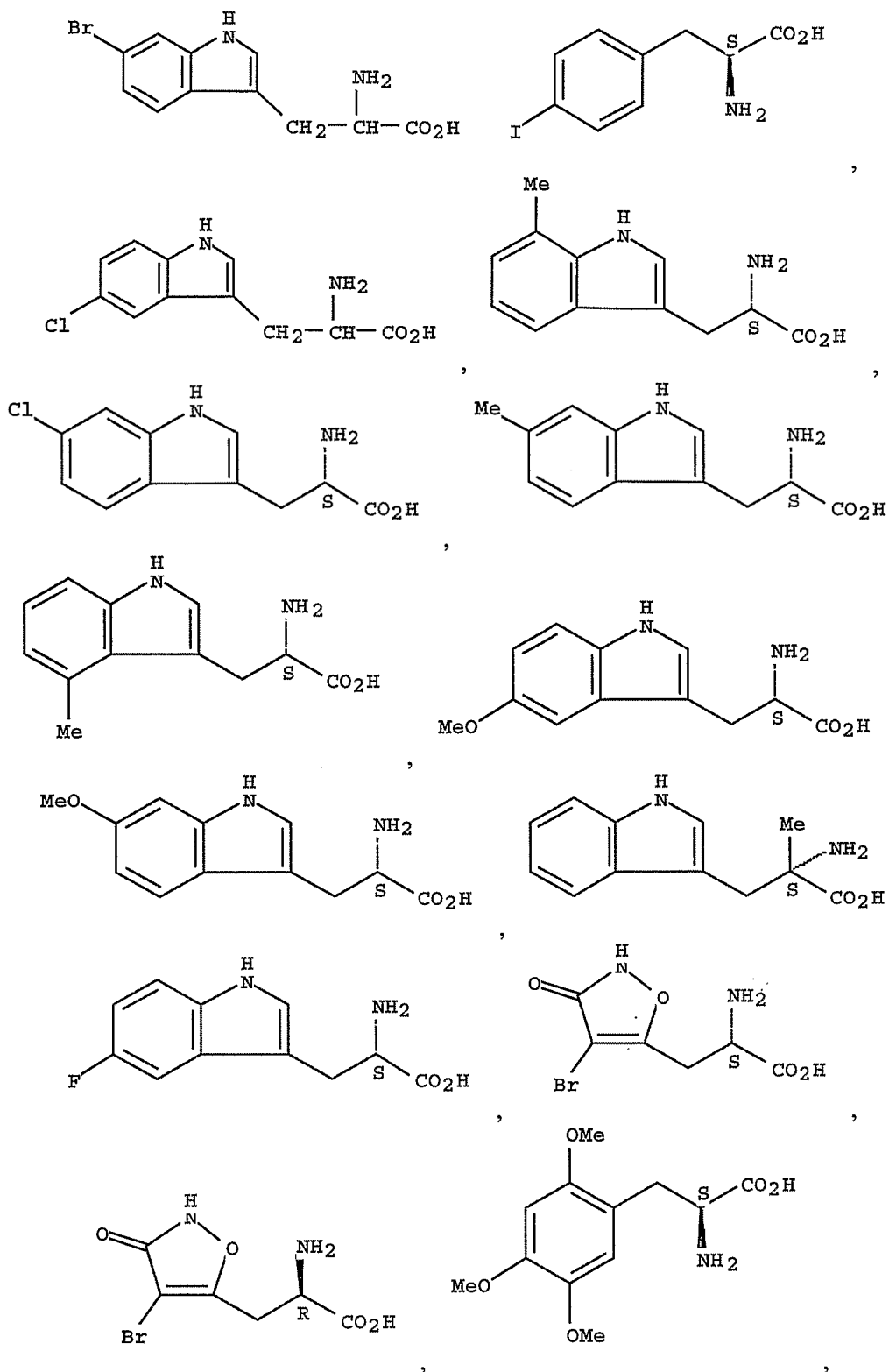
5



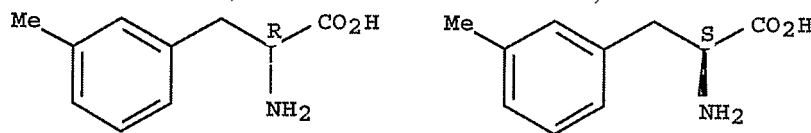
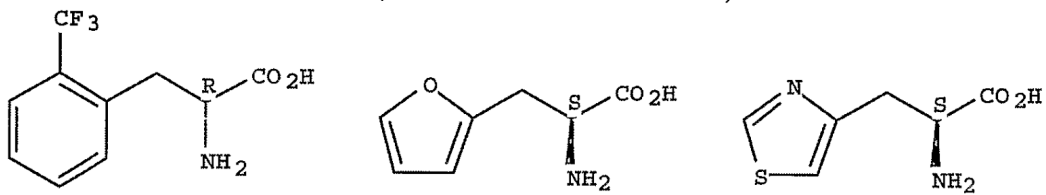
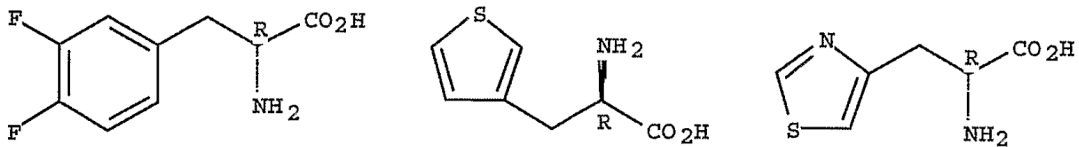
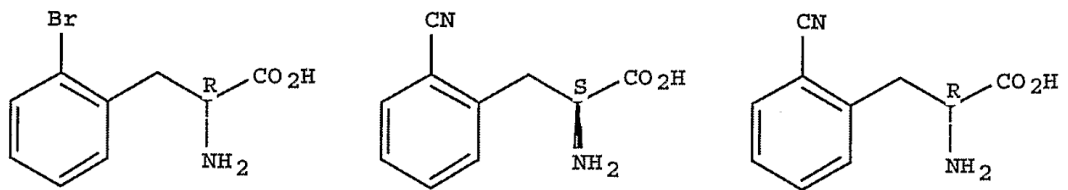
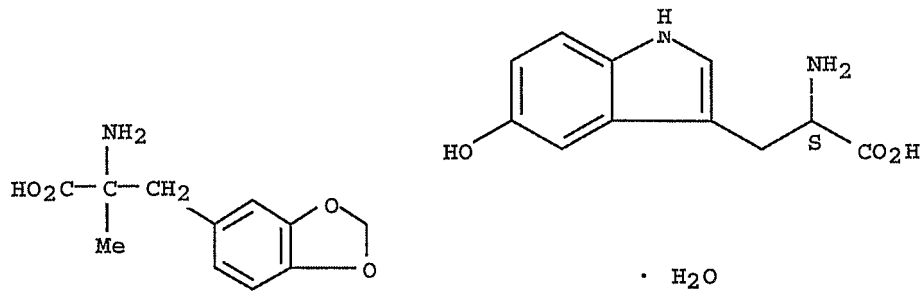
· H<sub>2</sub>O



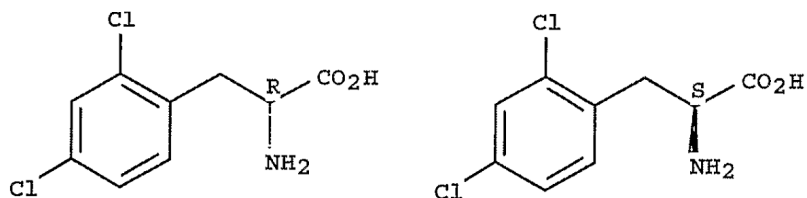
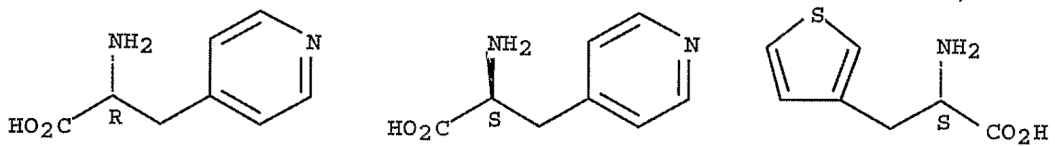
5

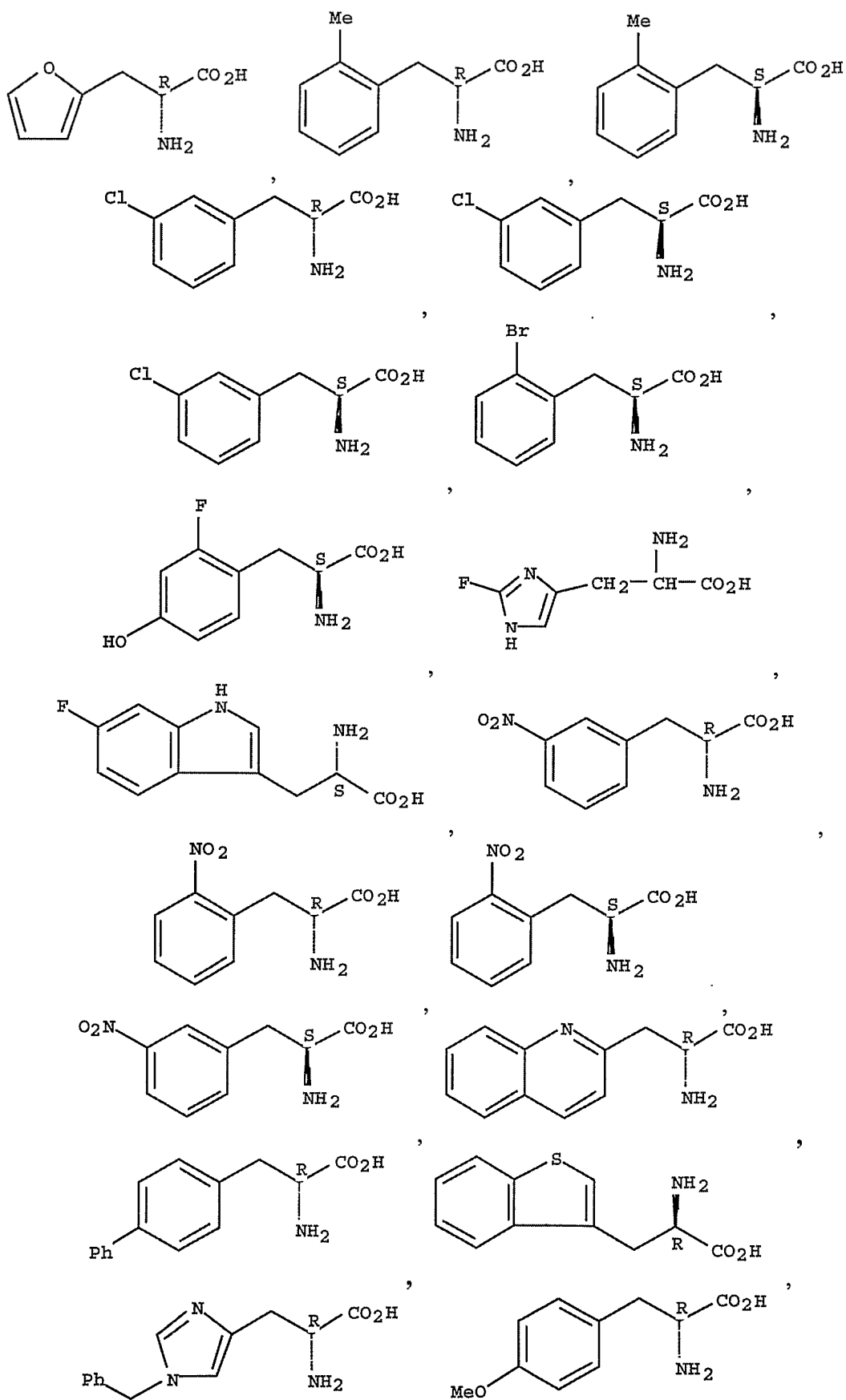


5

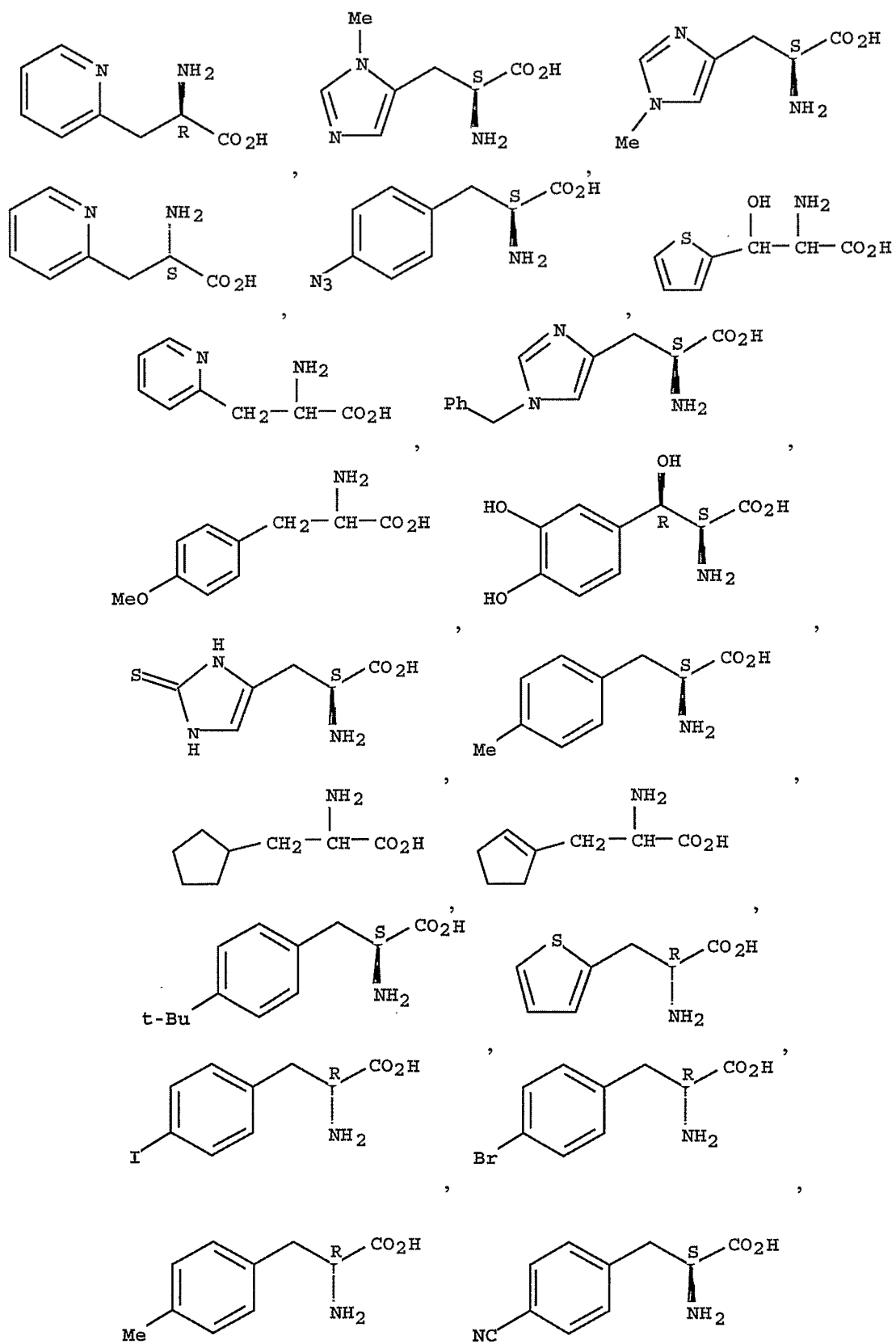


5



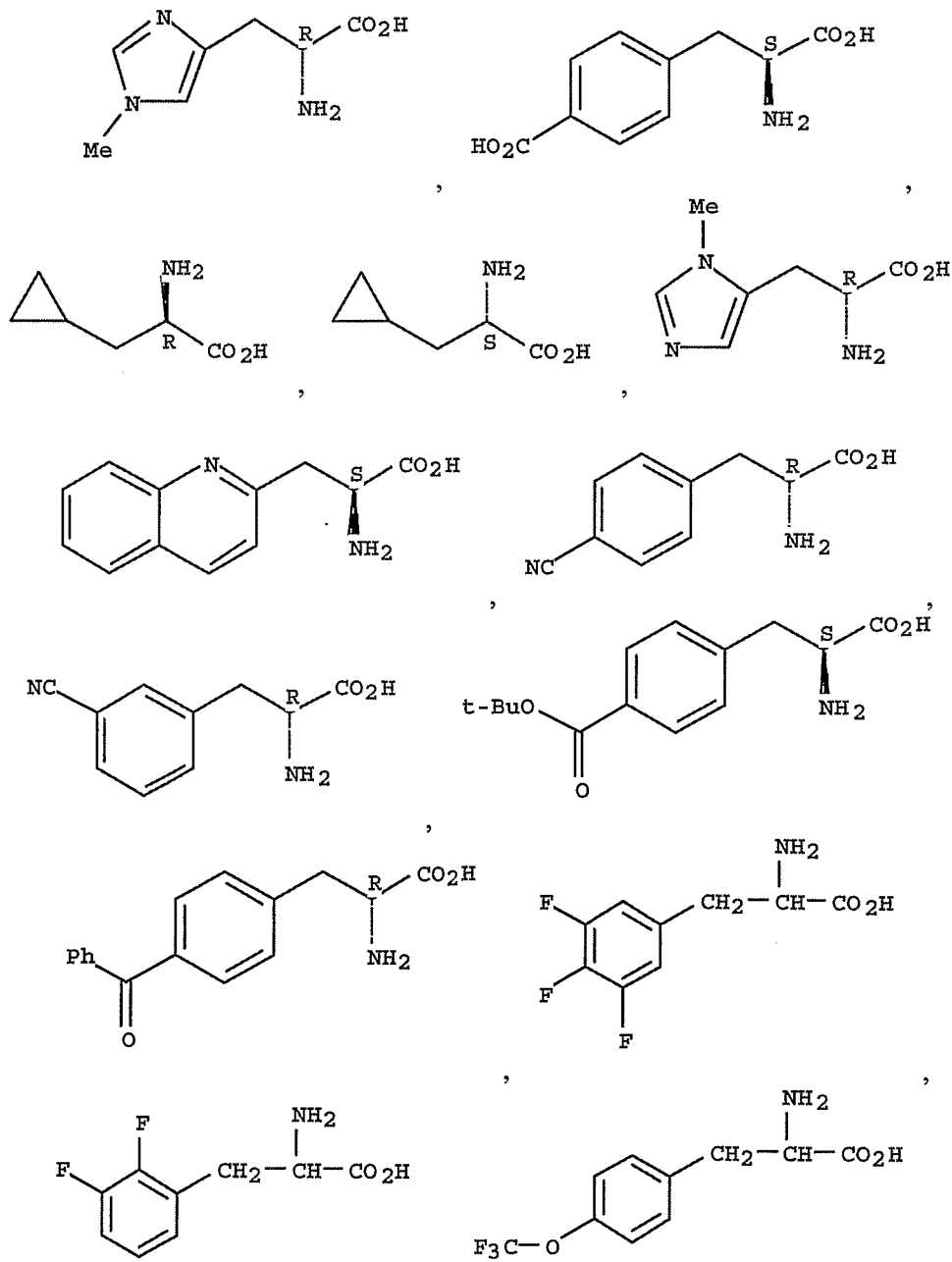


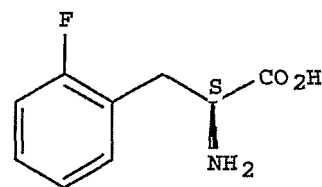
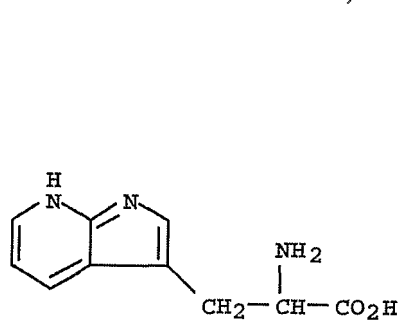
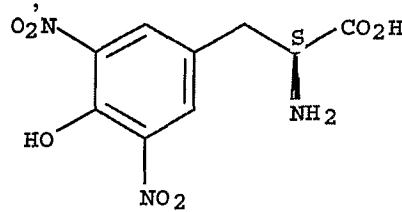
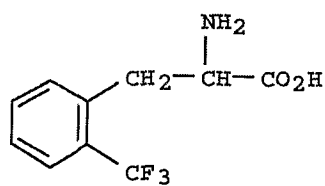
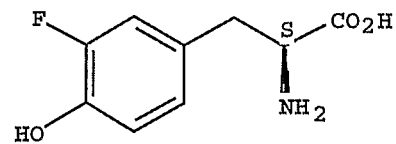
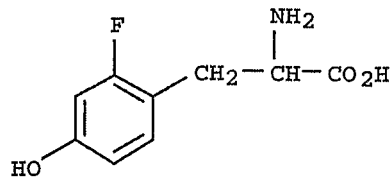
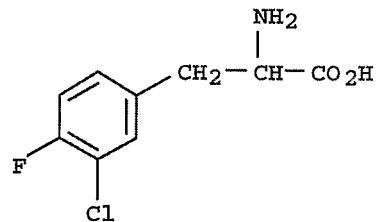
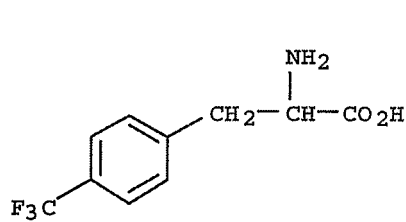
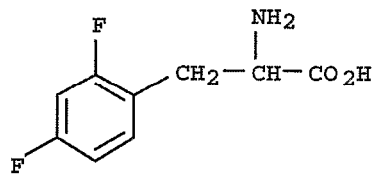
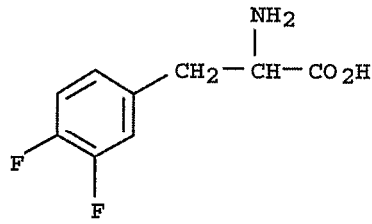
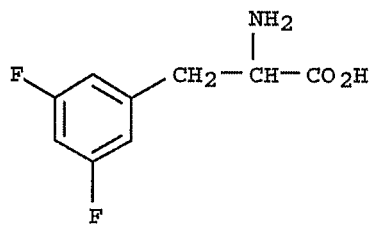
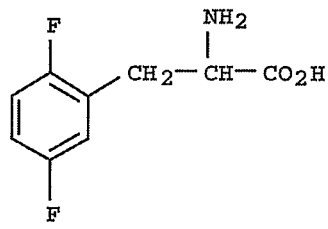
5



5

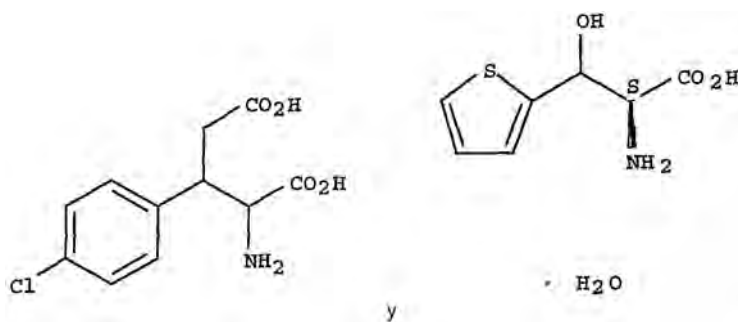






· 1/2 H<sub>2</sub>O





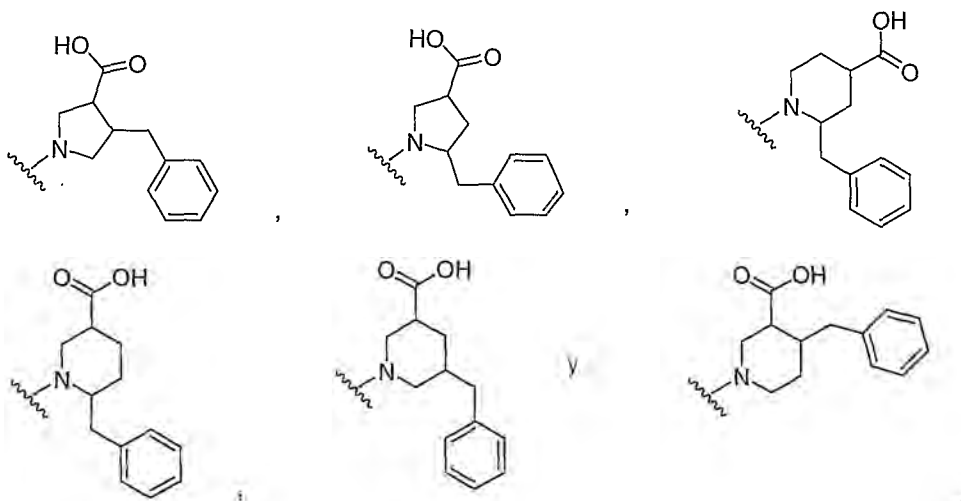
5 En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina es la amida de un  $\alpha$ -aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en: 4-cloro-fenilalanina, 4-fluoro-fenilalanina, 4-nitro-fenilalanina, N- $\alpha$ -metil-fenilalanina,  $\alpha$ -metil-fenilalanina, ácido glutámico, ácido aspártico, triptófano, isoleucina, leucina, metionina, tirosina, glutamina, treonina, valina, asparagina, fenilglicina, O-bencil-serina, O-t-butil-serina, O-t-butil-treonina, homofenilalanina, metionina-DL-sulfóxido, metionina-sulfona, ácido  $\alpha$ -aminobutírico, ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, ácido 4-amino-1-piperidina-4-carboxílico, ácido 4-amino-tetrahidropiran-4-carboxílico, ácido aspártico, benzotiazol-2-il-alanina,  $\alpha$ -t-butil-glicina, ciclohexilalanina, norleucina, norvalina, S-acetamidometil-penicilamina,  $\beta$ -3-piperidin-3-il-alanina, piperidinil-glicina, pirrolidinil-alanina, selenocisteína, tetrahidropiran-4-il-glicina, O-bencil-treonina, O-t-butiltirosina, 3-(p-acetilfenil)alanina, 3-fenilserina y ácido 1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-3-carboxílico.

En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina es



en la que  $Z^2$  es  $\text{CO}_2\text{H}$ ;  $\text{R}^{10}$  es bencilo; y los subíndices q, r y s son independientemente números enteros de 0 a 1.

20 En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina se selecciona entre el grupo que consiste en:



En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina es

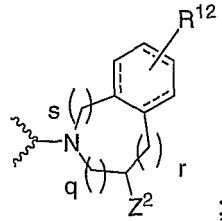


en la que  $Z^2$  es  $\text{CO}_2\text{H}$ ;  $\text{R}^{10}$  es bencilo;  $\text{R}^{11}$  es H; y los subíndices t y u son independientemente números enteros de 1 a 3.

En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina se selecciona entre el grupo que consiste en

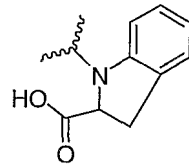


5 En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina es

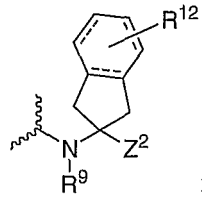


10 en la que  $Z^2$  es  $\text{CO}_2\text{H}$ ;  $\text{R}^{12}$  es como se ha descrito anteriormente; y los subíndices  $q$ ,  $r$  y  $s$  son independientemente números enteros de 1 a 3.

En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina es:

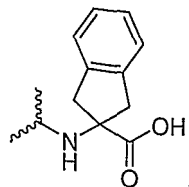


15 En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina es

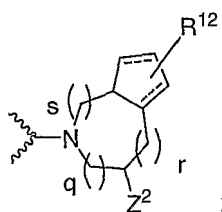


20 en la que  $Z^2$  es  $\text{CO}_2\text{H}$ ;  $\text{R}^{10}$  es bencilo; y  $\text{R}^{12}$  es como se ha descrito anteriormente.

En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina es



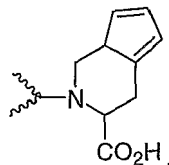
25 En una realización, el resto de bioisómero de fenilalanina es



en la que Z<sup>2</sup> es CO<sub>2</sub>H; R<sup>12</sup> es como se ha descrito anteriormente; y los subíndices q, r y s son independientemente números enteros de 1 a 3.

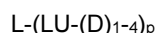
En una realización, el resto de bioisótero de fenilalanina es

5



En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona conjugados en los que los compuestos comprenden adicionalmente una unidad de enlazador (LU), teniendo los conjugados la fórmula:

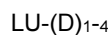
10



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que L es una unidad de ligando; -LU- es una unidad de enlazador; y D es una unidad de fármaco, como se expone en el presente documento.

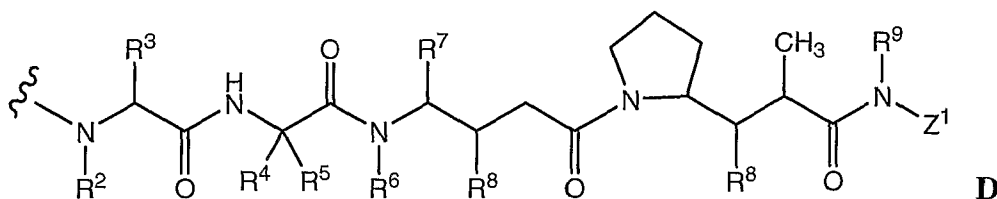
15

En otro aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona conjugados que tienen la fórmula:



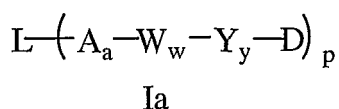
o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que, -LU- es una unidad de enlazador; y D es un resto de fármaco que tiene la Fórmula D:

20



25 de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores.

En una realización, se proporcionan conjugados fármaco-enlazador-ligando que tienen la fórmula Ia:

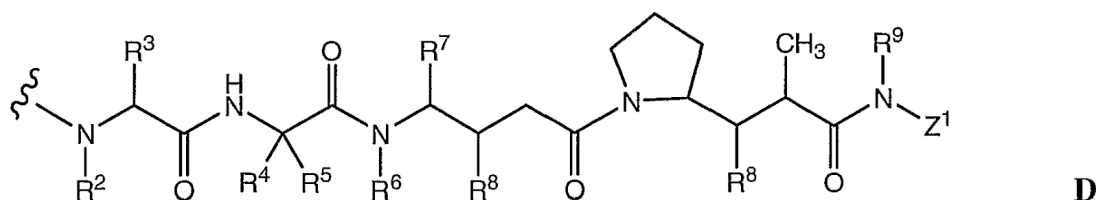


30

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que L-es una unidad de ligando; -A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-Y<sub>y</sub>- es una unidad de enlazador (LU), en la que --A- es una unidad de extensor, el subíndice a es 0 o 1, cada -W- es independientemente una unidad de aminoácidos, w es un número entero que varía de 0 a 12, -Y- es una unidad de espaciador, e y es 0, 1 o 2; p es un número entero de 1 a aproximadamente 20; y D es una unidad de fármaco que

35

tiene la Fórmula D:

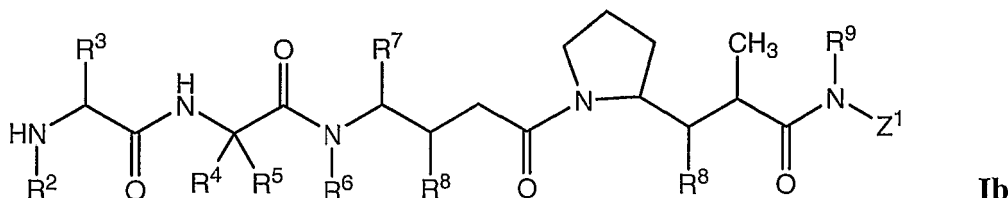


en la que R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo; o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>, en el que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6; R<sup>6</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo

45

C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>7</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>); cada X<sup>1</sup> es independientemente alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>; y el resto -NR<sup>9</sup>Z<sup>1</sup> es un bioisómero de fenilalanina de cualquiera de las realizaciones anteriores.

Otro aspecto son los compuestos de fármaco que tienen la Fórmula **Ib**. Estos compuestos de fármacos son los descritos anteriormente en los que la línea ondulada está reemplazada por un átomo de hidrógeno. Específicamente, los compuestos se representan a continuación:



o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que, R<sup>2</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>3</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>4</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); R<sup>5</sup> se selecciona entre H y metilo; o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>, en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6; R<sup>6</sup> se selecciona entre H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>; R<sup>7</sup> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>); cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>); y el resto -NR<sup>9</sup>Z<sup>1</sup> es un bioisómero de fenilalanina de cualquiera de las realizaciones anteriores.

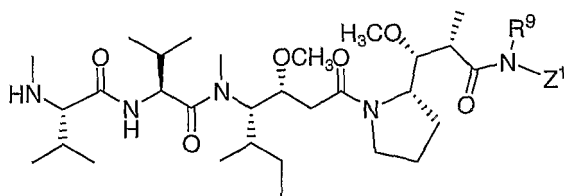
En una realización, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente isopropilo o *sec*-butilo y R<sup>5</sup> es -H. En una realización a modo de ejemplo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>5</sup> es -H y R<sup>7</sup> es *sec*-butilo.

En otra realización, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo y R<sup>9</sup> es -H.

En otra realización más, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>.

En una realización a modo de ejemplo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>5</sup> es -H, R<sup>7</sup> es *sec*-butilo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub> y R<sup>9</sup> es -H.

Los compuestos ilustrativos de Fórmula (**Ib**), cada uno de los cuales puede usarse como restos de fármaco (D) en un ADC, incluyen compuestos que tienen las siguientes estructuras:

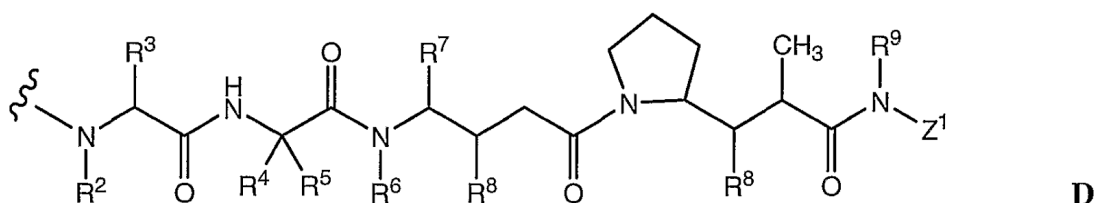


y sales farmacéuticamente aceptables o solvatos de los mismos.

En otro aspecto más, se proporcionan conjugados fármaco-enlazador-ligando en los que el ligando es un anticuerpo. En este aspecto, los conjugados se representan por la Fórmula **Ia'**:



o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la que Ab es un anticuerpo, A es una unidad de extensor, a es 0 o 1, cada W es independientemente una unidad de aminoácidos, w es un número entero de 0 a 12, Y es una unidad de espaciador, e y es 0, 1 o 2, p es un número entero de 1 a aproximadamente 20 y D es un resto de fármaco de Fórmula D:



en la que R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, cada R<sup>8</sup> y -N(R<sup>9</sup>)Z<sup>1</sup> tienen los significados proporcionados anteriormente.

5 El anticuerpo Ab puede ser cualquier anticuerpo unido covalentemente a una o más unidades de fármaco. Por ejemplo, Ab puede ser un anticuerpo que se une específicamente a CD20, CD30, CD33, CD40, CD70, BCMA o antígeno Y de Lewis.

En una realización -W<sub>w</sub>- es -Val-Cit-.

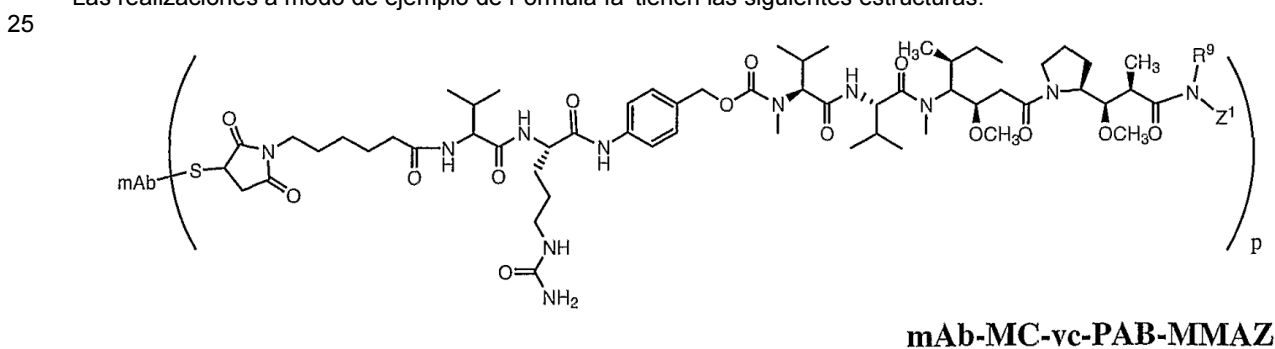
10 En otra realización, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente isopropilo o *sec*-butilo y R<sup>5</sup> es -H. En una realización a modo de ejemplo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>5</sup> es -H y R<sup>7</sup> es *sec*-butilo. En otra realización más, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo y R<sup>9</sup> es -H.

15 En otra realización, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>.

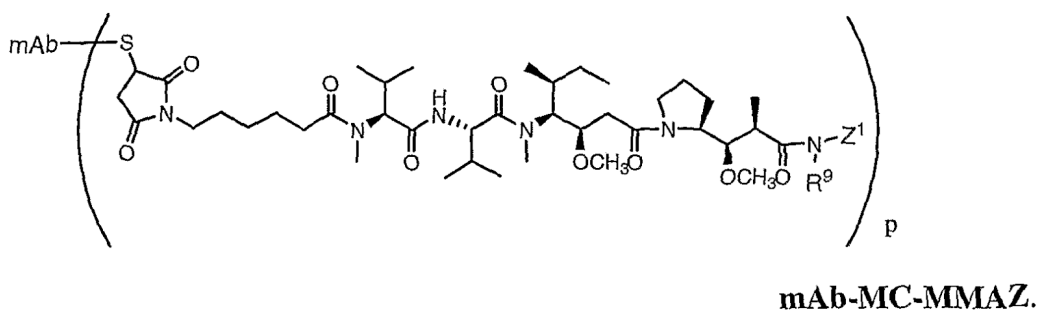
En una realización a modo de ejemplo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>5</sup> es -H, R<sup>7</sup> es *sec*-butilo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub> y R<sup>9</sup> es -H.

20 En un aspecto, el anticuerpo Ab es AC10 quimérico, BR96 quimérico, S2C6 quimérico, 1F6 quimérico, 2F2 quimérico, AC10 humanizado, BR96 humanizado, S2C6 humanizado, 1F6 humanizado, M195, M195 humanizado o 2F2 humanizado.

Las realizaciones a modo de ejemplo de Fórmula Ia' tienen las siguientes estructuras:



o



30 La carga de fármaco se representa por p, el número promedio de moléculas de fármaco por ligando (por ejemplo, un anticuerpo) (por ejemplo, de fórmula I, Ia, Ia'). La carga de fármaco puede variar de 1 a 20 unidades de fármaco (D) por ligando (por ejemplo, Ab o mAb). La unidad de fármaco puede conjugarse directamente o indirectamente a la

35 unidad de ligando (por ejemplo, a través de una unidad de enlazador). Las composiciones de Fórmula Ia y Fórmula Ia' incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 20.

En algunas realizaciones, p es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por unidad de ligando. En algunas realizaciones, p es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por



unidad de ligando. En algunas realizaciones,  $p$  es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 o de 2 a aproximadamente 4 unidades de fármaco por unidad de ligando. En algunas realizaciones,  $p$  es de aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6 o aproximadamente 8 unidades de fármaco por unidad de ligando.

5 El número promedio de unidades de fármaco por unidad de ligando en la preparación de las reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo de ELISA y HPLC. La distribución cuantitativa de conjugados ligando-fármaco en términos de  $p$  también puede determinarse. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de los conjugados ligando-fármaco homogéneos donde  $p$  es un valor determinado de conjugados ligando-fármacos con otras cargas de fármaco puede conseguirse por medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis.

10 Volviendo a la Fórmula Ia', los conjugados que comprenden un anticuerpo unido covalentemente a una o más unidades de fármaco (restos): A, a, W, w, Y e y son como se ha descrito anteriormente. Los compuestos de conjugado fármaco anticuerpo incluyen sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

15 La carga de fármaco se representa por  $p$ , el número medio de unidades de fármaco por anticuerpo en una molécula de fórmula I. La carga de fármaco puede variar de 1 a 20 fármacos (D) por anticuerpo (Ab o mAb). La Unidad de Fármaco puede conjugarse directamente o indirectamente con la unidad de ligando (por ejemplo, a través de una unidad de enlazador). Las composiciones de ADC de fórmula Ic incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 20. En algunas realizaciones,  $p$  es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por anticuerpo. En algunas realizaciones,  $p$  es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por anticuerpo. En algunas realizaciones,  $p$  es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 o de 2 a aproximadamente 4 unidades de fármaco por anticuerpo. En algunas realizaciones,  $p$  es aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6 o aproximadamente 8 unidades de fármaco por anticuerpo.

20 El número promedio de fármacos por anticuerpo en las preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse mediante medios convencionales tales como espectroscopía de UV/visible, espectrometría de masas, ensayo de ELISA y HPLC. La distribución cuantitativa de los ADC en términos de  $p$  también puede determinarse. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de ADC homogéneo donde  $p$  es un valor determinado de ADC con otras cargas de fármaco puede conseguirse por medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis.

25 Para algunos conjugados de fármaco anticuerpo,  $p$  puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión es un tiol de cisteína, como en las realizaciones a modo de ejemplo anteriores, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede estar unido un enlazador.

30 Normalmente, menos del máximo teórico de restos de fármacos se conjugan a un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos de lisina que no reaccionan con el intermedio fármaco-enlazador o el reactivo enlazador. Solo los grupos de lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo enlazador reactivo con amina. En general, los anticuerpos no contienen muchos, en caso de haberlos, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan estar vinculados a un resto fármaco. La mayoría de los restos de tiol de cisteína en los anticuerpos existen como puentes disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitól (DTT). Además, el anticuerpo debe ser sometido a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleófilos reactivos, tales como lisina o cisteína. La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, incluyendo: (i) limitar el exceso molar de intermedio fármaco-enlazador o reactivo enlazador con respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo de reacción de conjugación o la temperatura y (iii) parcializar o limitar las condiciones reductoras para la modificación del tiol de cisteína.

35 Cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermedio fármaco-enlazador o reactivo enlazador seguido de reactivo de resto de fármaco, el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de uno o más restos de fármaco unidos a un anticuerpo. El número promedio de fármacos por anticuerpo puede calcularse a partir de la mezcla mediante el ensayo de anticuerpos ELISA dual, específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Pueden identificarse moléculas de ADC individuales en la mezcla mediante espectroscopía de masas y pueden separarse mediante HPLC, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrófoba ("*Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate*", Hamblett, KJ, *et al.*, Resumen n.º 624, American Association for Cancer Research; Hamblett *et al.*, 2004, *Cancer Research* 10: 7063; reunión anual de 2004, del 27 al 31 de marzo, 2004, *Proceedings of the AACR*, Volumen 45, marzo de 2004; "*Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates*", Alley, S.C., *et al.*, resumen n.º 627, American Association for Cancer Research; reunión anual de 2004, del 27 al 31 de marzo, 2004, *Proceedings of the AACR*, Volume 45, marzo de 2004). Por tanto, un ADC homogéneo con un único valor de carga puede aislarse de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

**La unidad de enlazador (LU)**

Una "unidad de enlazador" (LU) es un compuesto bifuncional que puede usarse para enlazar una unidad de fármaco y una unidad de ligando para formar conjugados fármaco-enlazador-ligando, o que son útiles en la formación de inmunocombinados dirigidos contra antígenos asociados a tumores. Dichos inmunocombinados permiten el suministro selectivo de fármacos tóxicos a células tumorales.

En una realización, la unidad de enlazador del compuesto fármaco-enlazador y del conjugado fármaco-enlazador-ligando tiene la fórmula:



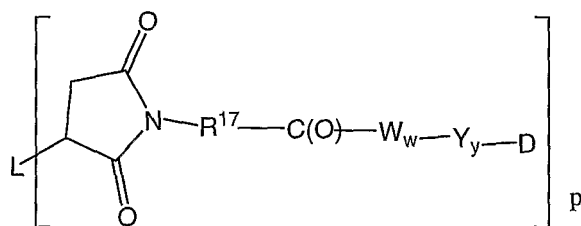
en la que -A- es una unidad de extensor; a es 0 o 1; cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido; w es independientemente un número entero que varía de 0 a 12; -Y- es una unidad de espaciador; e y es 0, 1 o 2.

En el conjugado fármaco-enlazador-ligando, el enlazador sirve para unir el resto de fármaco y la unidad de ligando.

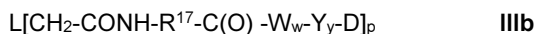
**La unidad de extensor**

La unidad de extensor (-A-), cuando está presente, es capaz de enlazar una unidad de ligando a una unidad de aminoácido (-W-). En este sentido un ligando (L) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de un extensor. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un ligando, ya sea naturalmente o por medio de manipulación química incluyen, pero no se limitan a, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un hidrato de carbono y carboxilo. En un aspecto, los grupos funcionales de ligando son sulfhidrilo y amino. Pueden generarse grupos sulfhidrilo por reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un ligando. Como alternativa, los grupos sulfhidrilo pueden generarse mediante la reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un ligando usando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo de generación de sulfhidrilo.

En una realización, la unidad de extensor forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de ligando. El átomo de azufre puede derivarse de un grupo sulfhidrilo de un ligando. Se representan unidades de extensor representativas de esta realización dentro de los corchetes de las Fórmulas IIIa y IIIb, en las que L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente y R<sup>17</sup> se selecciona entre -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -arileno-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, arilen-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>- y -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-; y r es un número entero que varía de 1 a 10. Ha de entenderse de todas las realizaciones a modo de ejemplo de fórmula Ia, tal como III-VI, que incluso cuando no se indica de forma expresa, se enlazan de 1 a 20 restos de fármaco a un ligando (p = 1-20).

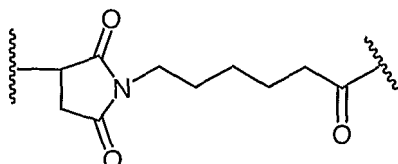


**IIIa**

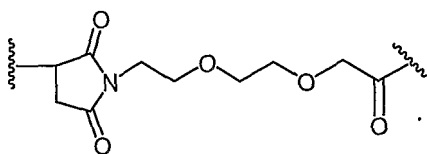


**IIIb**

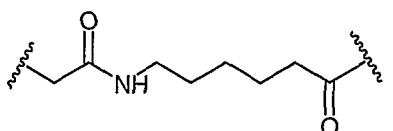
Una unidad de extensor ilustrativa es la de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:



Otra unidad de extensor ilustrativa es la de Fórmula IIIa en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-; y r es 2:



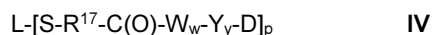
Otra unidad de extensor ilustrativa más es la de Fórmula IIIb en la que R<sup>17</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:



5

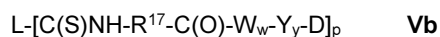
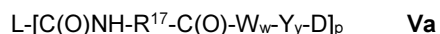
En otra realización, la unidad de extensor se enlaza a la unidad de ligando mediante un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de ligando y un átomo de azufre de la unidad de extensor. Una unidad de extensor representativa de esta realización se representa dentro de los corchetes de la fórmula IV, en la que R<sup>17</sup>, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.

10



En otra realización más, el grupo reactivo del extensor contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de un ligando. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero no se limitan a, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Se representan unidades de extensor representativas de esta realización dentro de los corchetes de las Fórmulas Va-Vc, en las que -R<sup>17</sup>-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente;

15



20

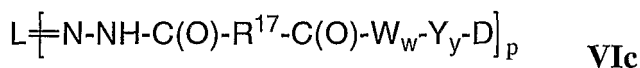
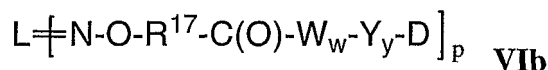
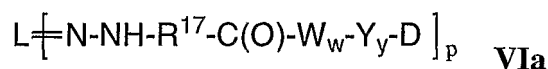


25

En otro aspecto más, el grupo reactivo del extensor contiene un sitio reactivo que es reactivo a un grupo de hidrato de carbono modificado (-CHO) que puede estar presente en un ligando. Por ejemplo, un hidrato de carbono puede oxidarse suavemente usando un reactivo tal como peryodato de sodio y la unidad de hidrato de carbono oxidado (-CHO) resultante puede condensarse con un extensor que contenga un grupo funcional tal como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina y una arilhidrazida tal como las descritas por Kaneko, T. *et al.* (1991) *Bioconjugate Chem* 2:133-41. Se representan unidades de extensor representativas de esta realización dentro de los corchetes de las Fórmulas VIa, VIb y VIc, en las que -R<sup>17</sup>-, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.

30

35



40

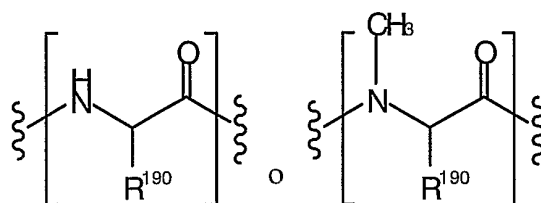
#### La unidad de aminoácido

La unidad de aminoácido (-W-), cuando está presente, enlaza la unidad de extensor a la unidad de espaciador si la unidad de espaciador está presente, enlaza la unidad de extensor al resto de fármaco si la unidad de espaciador está ausente y enlaza la unidad de ligando a la unidad de fármaco si la unidad de extensor y la unidad de espaciador están ausentes.

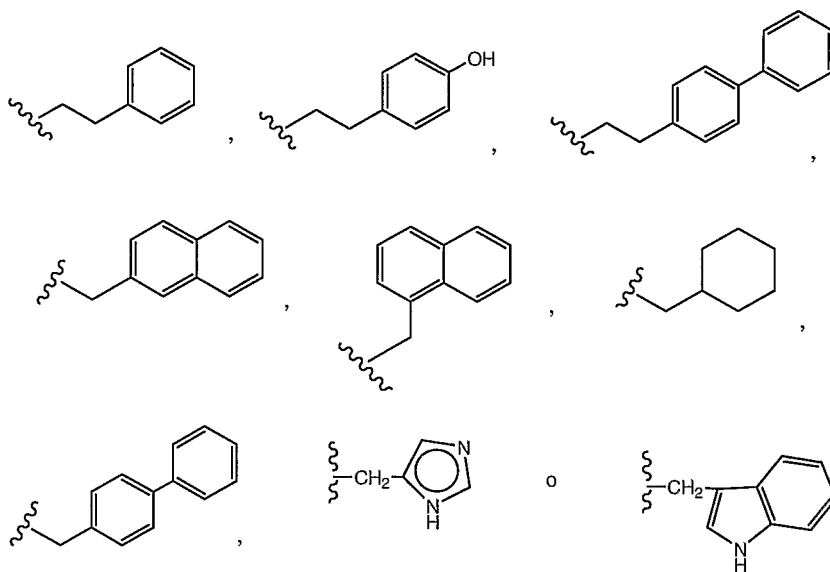
45

W<sub>w</sub>- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapeptido, undecapéptido o dodecapeptido. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula indicada a continuación en los corchetes y w es un número entero que varía de 0 a 12:

50



5 en la que R<sup>190</sup> es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmetilo-, fenilo, ciclohexilo,

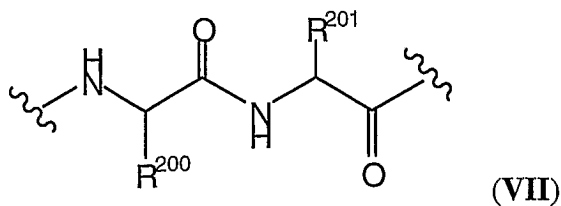


10

15

La unidad de aminoácido puede ser escindida enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada a tumor, para liberar la unidad de fármaco (-D), que en una realización se protona *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco (D).

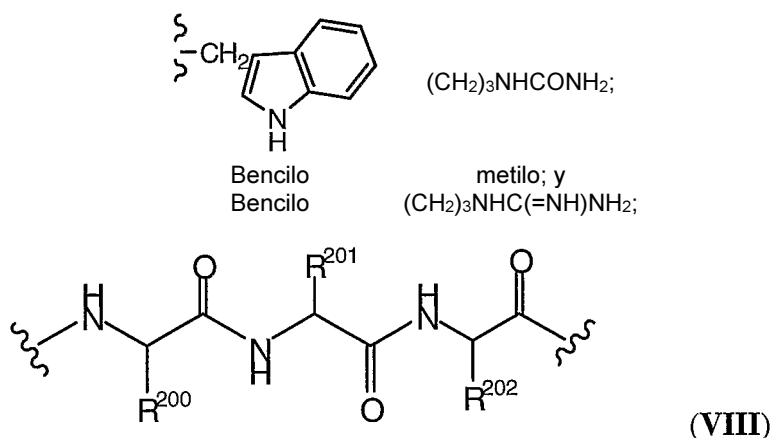
Las unidades W<sub>w</sub> ilustrativas se representan por las fórmulas (VII)-(IX):



20

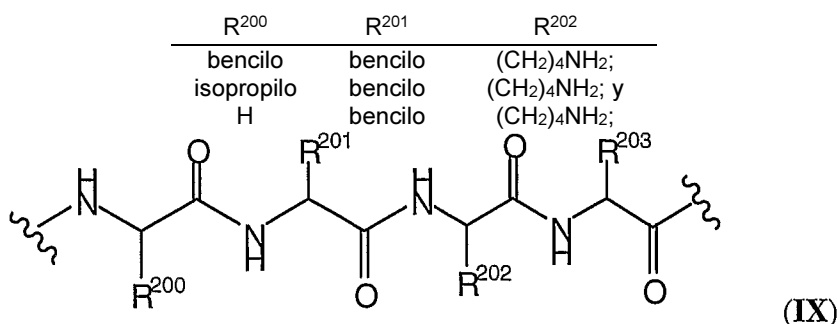
en la que R<sup>200</sup> y R<sup>201</sup> son como se indica a continuación:

| R <sup>200</sup>   | R <sup>201</sup>                                      |
|--------------------|---|
| Bencilo            | (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;     |
| Metilo             | (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;     |
| Isopropilo         | (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> ;     |
| Isopropilo         | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ; |
| Bencilo            | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ; |
| Isobutilo          | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ; |
| <i>sec</i> -butilo | (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub> ; |



en la que  $R^{200}$ ,  $R^{201}$  y  $R^{202}$  son las como se indica a continuación:

5



en la que  $R^{200}$ ,  $R^{201}$ ,  $R^{202}$  y  $R^{203}$  son las como se indica a continuación:

| $R^{200}$ | $R^{201}$ | $R^{202}$ | $R^{203}$ |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| H         | Bencilo   | Isobutilo | H; y      |
| Metilo    | Isobutilo | Metilo    | Isobutilo |

10 Las unidades de aminoácido a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, unidades de fórmula (VII) donde:  $R^{200}$  es bencilo y  $R^{201}$  es  $-(CH_2)_4NH_2$ ;  $R^{200}$  es isopropilo y  $R^{201}$  es  $-(CH_2)_4NH_2$ ;  $R^{200}$  es isopropilo y  $R^{201}$  es  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ . Otra unidad de aminoácido a modo de ejemplo es una unidad de fórmula (VIII) en la que  $R^{200}$  es bencilo,  $R^{201}$  es bencilo y  $R^{202}$  es  $-(CH_2)_4NH_2$ .

15 Las unidades  $-W_w-$  útiles pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para la escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor. En una realización, una unidad  $-W_w-$  es aquella cuya escisión está catalizada por la catepsina B, C y D o una proteasa de plasmina.

En una realización,  $-W_w-$  es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido.

20

Cuando  $R^{190}$ ,  $R^{200}$ ,  $R^{201}$ ,  $R^{202}$  o  $R^{203}$  es diferente de hidrógeno, el átomo de carbono al que  $R^{190}$ ,  $R^{200}$ ,  $R^{201}$ ,  $R^{202}$  o  $R^{203}$  está unido, es quiral.

25 Cada átomo de carbono al que  $R^{190}$ ,  $R^{200}$ ,  $R^{201}$ ,  $R^{202}$  o  $R^{203}$  está unido está independientemente en la configuración (S) o (R).

30 En un aspecto de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido es valina-citrulina. En otro aspecto, la unidad de aminoácido es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En otro aspecto más de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido es N-metilvalina-citrulina. En otro aspecto más, la unidad de aminoácido es ácido 5-aminovalérico, homo fenilalanina lisina, tetraisoquinolinacarboxilato lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido isonepecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina o ácido isonepecótico.

En ciertas realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otras realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos no naturales.

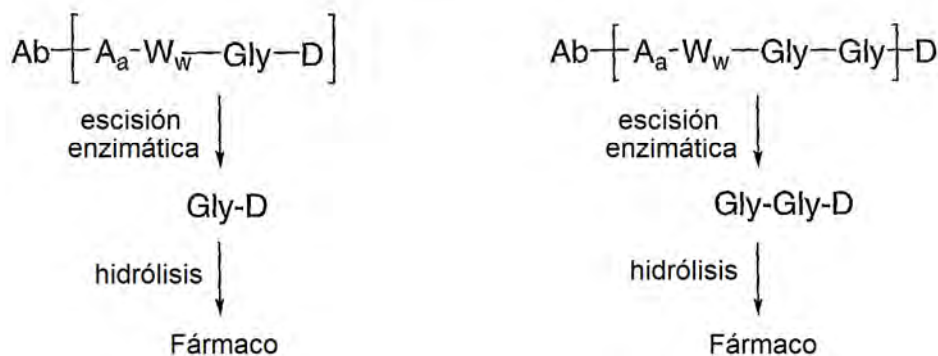
35

### La unidad de espaciador

La unidad de espaciador (-Y-), cuando está presente, enlaza una unidad de aminoácido al resto de fármaco cuando una unidad de aminoácido está presente. Como alternativa, la unidad de espaciador enlaza la unidad de extensor al resto de fármaco cuando la unidad de aminoácido es ausente. La unidad de espaciador también enlaza el resto de fármaco a la unidad de ligando cuando tanto la unidad de aminoácido como la unidad de extensor están ausentes.

Las unidades de espaciador son de dos tipos generales: autodestructivas y no autodestructivas. Una unidad de espaciador no autodestructiva es una en la que parte o la totalidad de la unidad de espaciador permanece unida al resto de fármaco después de la escisión, en particular enzimática, de una unidad de aminoácido del conjugado fármaco-enlazador-ligando o el compuesto fármaco-enlazador. Los ejemplos de una unidad de espaciador no autodestructiva incluyen, pero no se limitan a, una unidad de espaciador (glicina-glicina) y una unidad de espaciador glicina (ambas representadas en el Esquema 1) (a continuación). Cuando un compuesto a modo de ejemplo que contiene una unidad de espaciador de glicina-glicina o una unidad de espaciador glicina sufre una escisión enzimática por medio de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, un resto de glicina-glicina-fármaco o un resto de glicina-fármaco se escinde de L-A<sub>a</sub>-W<sub>w</sub>-. En una realización, una reacción de hidrólisis se realiza independiente dentro de la célula diana, escindiendo el enlace del resto glicina-fármaco y la liberación del fármaco.

Esquema 1



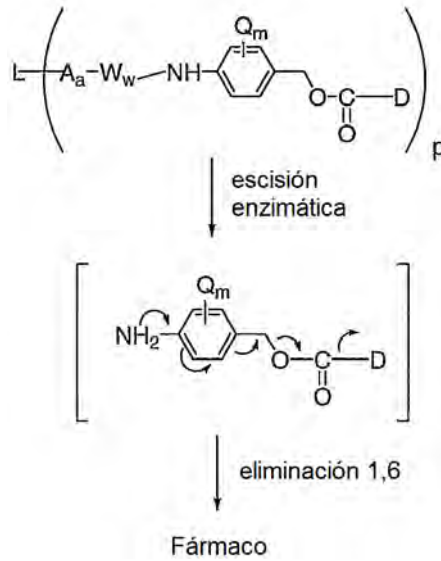
En una realización, una unidad de espaciador no autodestructiva (-Y-) es -Gly-Gly-. En otra realización, una unidad de espaciador no autodestructiva (-Y-) es -Gly-.

En otra realización, -Y- es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) (véanse los Esquemas 2 y 3, a continuación) cuya porción fenileno está sustituida con Q<sub>m</sub> en la que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4.

En una realización, se proporciona un compuesto de fármaco-enlazador o un conjugado fármaco-enlazador-ligando en los que la unidad de espaciador está ausente (y = 0) o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

Como alternativa, un compuesto a modo de ejemplo que contiene una unidad de espaciador autodestructiva puede liberar -D sin la necesidad de una etapa de hidrólisis separada. En esta realización, -Y- es un grupo PAB que se enlaza a -W<sub>w</sub>- a través del átomo de nitrógeno de amino del grupo PAB y se conecta directamente a -D por medio de un carbonato, un carbamato o un grupo éter. Sin quedar ligado a teoría alguna o mecanismo particular, el Esquema 2 representa un posible mecanismo de liberación del fármaco de un grupo PAB que está unido directamente a -D por medio de un grupo carbamato o carbonato, expuesto por Toki *et al.*, 2002, *J Org. Chem.* 67:1866-1872.

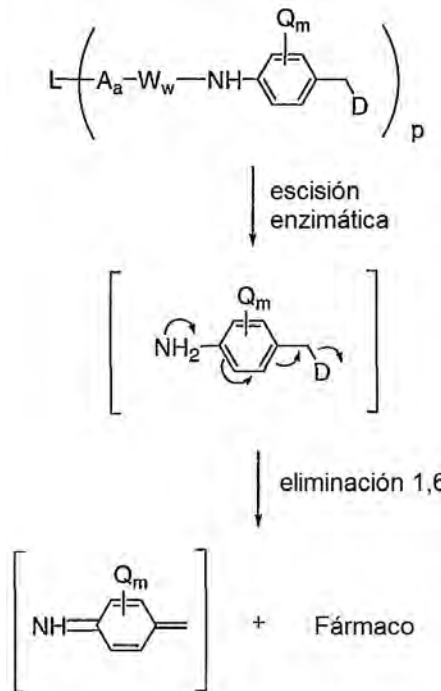
Esquema 2



en el que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; y p es un número entero de 1 a 20.

5 Sin quedar ligado a teoría alguna o mecanismo particular, el Esquema 3 representa un posible mecanismo de liberación del fármaco de un grupo PAB que está unido directamente a -D por medio de un enlace de éter o amina.

Esquema 3

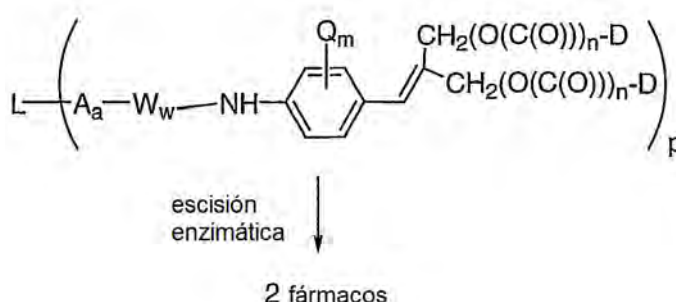


10 en el que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; y p es un número entero de 1 a aproximadamente 20.

Otros ejemplos de espaciadores autodestructivos incluyen, pero no se limitan a, compuestos aromáticos que son electrónicamente similar al grupo PAB tales como los derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase, por ejemplo, Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. Pueden usarse espaciadores que experimenten ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y sin sustituir (véase, por ejemplo, Rodrigues *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (véase, por ejemplo, Storm *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815). y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (véase, por ejemplo, Amsberry *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867). Eliminación de los fármacos que contienen aminas que están sustituidas en la posición  $\alpha$  de glicina (véase, por ejemplo, Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447) son también ejemplos de espaciador autodestructivo útil en compuestos a modo de ejemplo.

En una realización, la unidad de espaciador es una unidad de bis(hidroxi metil)estireno (BHMS) ramificado como se representa en el Esquema 4, que puede usarse para incorporar y liberar múltiples fármacos.

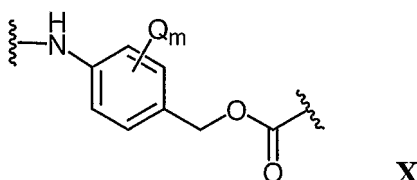
Esquema 4



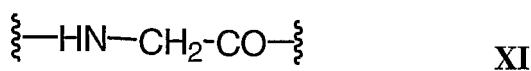
en el que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; n es 0 o 1; y p varía de 1 a aproximadamente 20.

En una realización, los restos -D son iguales. En otra realización más, los restos -D son diferentes.

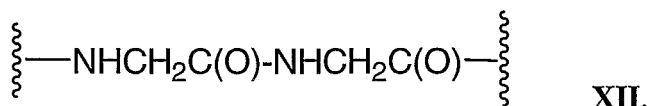
En un aspecto, las unidades de espaciador (-Y<sub>y</sub>-) se representan por las fórmulas (X)-(XII):



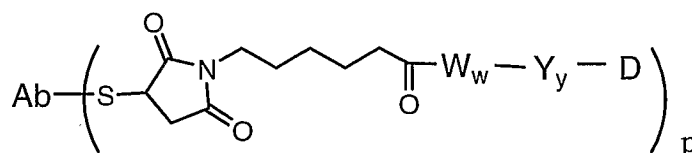
en la que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4;



30 y

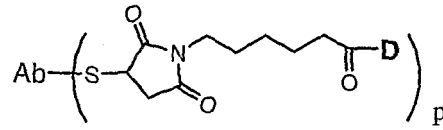


35 Las realizaciones de los compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula Ia' incluyen:

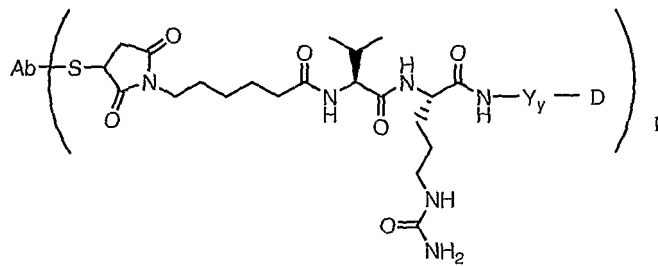
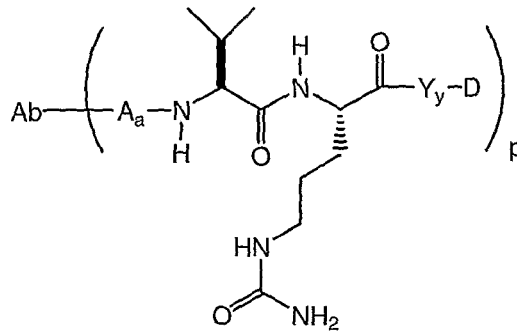




y

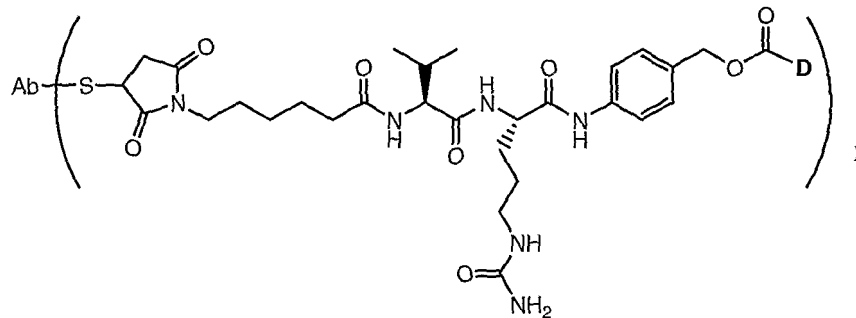


5 en la que w e y son cada uno 0,



10

y



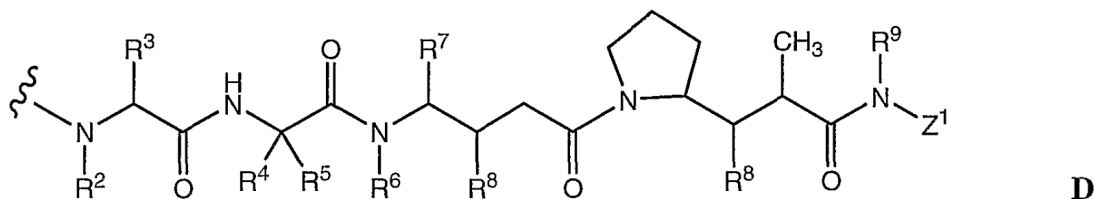
15 El resto de fármaco (D) es del tipo dolastatina/auristatina (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 5.635.483; y 5.780.588), que se ha demostrado que interfiere con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (véase, Woyke *et al.*, 2001, *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 5.663.149). Algunas dolastinas tienen actividad antifúngica (véase, por ejemplo, Pettit *et al.*, 1998, *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965).

20

Como se señaló anteriormente, D se refiere a una unidad de fármaco (resto) que tiene un átomo de nitrógeno u otro átomo que puede formar un enlace con la unidad espaciador cuando y = 1 o 2, con el grupo carboxilo C-terminal de una unidad de aminoácido cuando y = 0, con la de una unidad de extensor cuando w e y = 0, y con el sitio reactivo de una unidad de ligando cuando a, w e y = 0. Ha de entenderse que las expresiones "unidad de fármaco" y "resto de fármaco" son sinónimos y se usan indistintamente en el presente documento.

25

En una realización, -D es la fórmula D:



5 en la que, independientemente en cada ubicación:

R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

10 R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo;

15 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

R<sup>6</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>7</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

20 cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

cada X<sup>1</sup> es independientemente alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>; y

el resto -NR<sup>9</sup>Z<sup>1</sup> es un bioisómero de fenilalanina de cualquiera de las realizaciones anteriores.

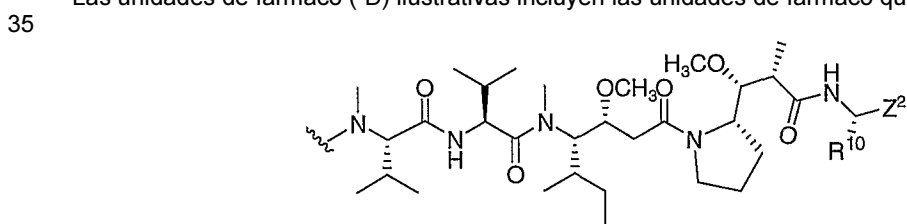
25 En una realización, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son independientemente isopropilo o *sec*-butilo y R<sup>5</sup> es -H. En una realización a modo de ejemplo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>5</sup> es H y R<sup>7</sup> es *sec*-butilo.

En otra realización, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo y R<sup>9</sup> es H.

En otra realización, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub>.

30 En una realización a modo de ejemplo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son cada uno isopropilo, R<sup>2</sup> y R<sup>6</sup> son cada uno metilo, R<sup>5</sup> es H, R<sup>7</sup> es *sec*-butilo, cada aparición de R<sup>8</sup> es -OCH<sub>3</sub> y R<sup>9</sup> es H.

Las unidades de fármaco (-D) ilustrativas incluyen las unidades de fármaco que tienen la siguiente estructura:



40 y sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de las mismas, en las que R<sup>10</sup> y Z<sup>2</sup> tienen los significados proporcionados anteriormente.

En un aspecto, pueden unirse grupos hidrófilos, tales como, pero no limitados a, ésteres de trietilenglicol (TEG), a la unidad de fármaco. Sin quedar ligado por teoría alguna, los grupos hidrófilos colaboran en la internalización y no aglomeración de la unidad de fármaco.

#### 45 La Unidad de ligando (L)

La unidad de ligando (L-) incluye dentro de su alcance cualquier unidad de un ligando (L) que se una o se asocie reactivamente o se compleje con un receptor, antígeno u otro resto receptivo asociado a una población de células diana dada. Una unidad de ligando es una molécula que se une a, se compleja con o reacciona con un receptor, antígeno u otro resto receptivo de una población celular que se busca modificar terapéuticamente o, por el contrario, biológicamente. En un aspecto, la unidad de ligando actúa para suministrar la unidad de fármaco a la población de la célula diana particular con la que la unidad de ligando interactúa. Dichos ligandos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de gran peso molecular tales como, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos, proteínas de peso molecular más pequeño, polipéptido o péptidos, lectinas, glicoproteínas, no péptidos,

vitaminas, moléculas de transporte de nutrientes (tales como, pero no limitadas a, transferrina) o cualquier otra célula molécula o sustancia de unión.

5 Una unidad de ligando puede formar un enlace a una unidad de extensor, una unidad de aminoácido, una unidad de espaciador o una unidad de fármaco. Una unidad de ligando puede formar un enlace a una unidad de enlazador a través de un heteroátomo del ligando. Los heteroátomos que pueden estar presentes en una unidad de ligando incluyen el azufre (en una realización, de un grupo sulfhidrido de un ligando), el oxígeno (en una realización, de un grupo carbonilo, carboxilo o hidroxilo de un ligando) y el nitrógeno (en una realización, de un grupo amino primario o secundario de un ligando). Estos heteroátomos pueden estar presentes en el ligando, en el estado natural del  
10 ligando, por ejemplo un anticuerpo de origen natural o pueden introducirse en el ligando a través de la modificación química.

En una realización, un ligando tiene un grupo sulfhidrido y el ligando se une a la unidad de enlazador a través de un átomo de azufre del grupo sulfhidrido.  
15

En otra realización, el ligando tiene restos de lisina que pueden reaccionar con ésteres activados (dichos ésteres incluyen, pero no se limitan a, *N*-hidroxisuccinimida, pentafluorofenilo y ésteres de *p*-nitrofenilo) del enlazador y de este modo forman un enlace amida que consiste en el átomo de nitrógeno del ligando y el grupo C=O del enlazador.

20 En otro aspecto más, el ligando tiene uno o más restos de lisina que pueden modificarse químicamente para introducir uno o más grupos sulfhidrido. La unidad de ligando se une a la unidad de enlazador a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrido. Los reactivos que pueden usarse para modificar lisinas incluyen, pero no se limitan a, S-acetiltioacetato de *N*-succinimidilo (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (reactivo de Traut).

25 En otra realización, el ligando puede tener uno o más grupos de hidrato de carbono que pueden modificarse químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrido. La unidad de ligando se une a la unidad de enlazador, tal como la unidad de extensor, a través de un átomo de azufre del grupo sulfhidrido.

En otra realización más, el ligando puede tener uno o más grupos de hidrato de carbono que pueden oxidarse para proporcionar un grupo aldehído (-CHO) (véase, por ejemplo, Laguzza, *et al.*, 1989, *J. Med. Chem.* 32(3):548-55). El aldehído correspondiente puede formar un enlace con un sitio reactivo en un extensor. Los sitios reactivos de un extensor que pueden reaccionar con un grupo carbonilo de un ligando incluyen, pero no se limitan a, hidrazina e hidroxilamina. Otros protocolos para la modificación de proteínas para la unión o asociación de unidades de fármaco se describen en Coligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley & Sons (2002).  
30

35 Los ligandos de proteína no inmunorreactiva, de polipéptido o de péptido útiles incluyen, pero no se limitan a, transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformante ("TGF"), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de vacuna ("VGF"), insulina y factores de crecimiento insulínico I y II, somatostatina, lectinas y apoproteína de lipoproteínas de baja densidad.  
40

Los anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados. Son anticuerpos monoclonales las útiles poblaciones homogéneas de anticuerpos para un determinante antigénico particular (por ejemplo, un antígeno de célula cancerosa, un antígeno viral, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un producto químico, un ácido nucleico o fragmentos de los mismos). Un anticuerpo monoclonal (mAb) para un un antígeno de interés puede prepararse mediante el uso de cualquier técnica conocida en la técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante cultivo de estirpes celulares continuos.  
45

50 Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpos o anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-ratón (u otras especies). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse mediante cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, Teng *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:7308-7312; Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72-79; y Olsson *et al.*, 1982, *Meth. Enzymol.* 92:3-16).  
55

El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica y se discuten a continuación.

60 El anticuerpo puede ser un fragmento, derivado o análogo de un anticuerpo funcionalmente activo que se une inmuno-específicamente a las células diana (por ejemplo, antígenos de células cancerígenas, antígenos virales o antígenos microbianos) u otros anticuerpos unidos a células tumorales o a una matriz. A este respecto, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de inducir anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que reconocía el anticuerpo del que se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una realización a modo de ejemplo la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede potenciarse mediante la delección de las secuencias marco conservadas y RDC que son C-terminal a la secuencia RDC que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias RDC se  
65

unen al antígeno, pueden usarse péptidos de síntesis que contienen las secuencias RDC en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica (por ejemplo, el ensayo de núcleo BIA) (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, MD; Kabat E *et al.*, 1980, *J. Immunology* 125 (3): 961-969).

5 Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, pero no limitados a, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fab, Fv, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, scFv, scFv-FV o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

10 De forma adicional, los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que pueden hacerse usando técnicas de ADN recombinante convencionales, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como por ejemplo, las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y las regiones constantes de inmunoglobulina humana.

15 (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 4.816.567; y la Patente de los EE.UU. n.º 4.816.397).

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (RDC) de las especies no humanas y una región marco conservada de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 5.585.089). Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo usando métodos descritos en la Publicación Internacional n.º WO 87/02671; Publicación de Patente Europea n.º 0 184 187; Publicación de Patente Europea n.º 0 171 496; Publicación de Patente Europea n.º 0 173 494; Publicación Internacional n.º WO 86/01533; Patente de los EE.UU. n.º 4.816.567; Publicación de Patente Europea n.º 012 023; Berter *et al.*, 1988, *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.*, 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.*, 1985, *Nature* 314:446-449; y Shaw *et al.*, 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214; Patente de los EE.UU. n.º 5.225.539; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 552-525; Verhoevan *et al.*, 1988, *Science* 239: 1534; y Beidler *et al.*, 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables y pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas endógenas, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, una porción de un polipéptido o uno completo. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B y posteriormente se someten a cambio de clase y mutación somática. Por tanto, usando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 5.625.126, 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Otros anticuerpos humanos pueden obtenerse en el mercado de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (ahora Amgen, Fremont, CA) y Medarex (Princeton, NJ).

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse usando una técnica denominada como "selección guiada". En este enfoque un anticuerpo monoclonal seleccionado no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Véase, por ejemplo, Jespers *et al.*, 1994, *Biotechnology* 12: 899-903). Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Quan y Carter, 2002, *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics, In Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu y Fick, eds, Marcel Dekker, Nueva York, NY, capítulo 20, págs. 427-469).

55 En otras realizaciones, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo o un fragmento funcionalmente activo del mismo, por ejemplo, en el que el anticuerpo está fusionado a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), ya sea al extremo N o al extremo C a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una porción de la misma, preferentemente una porción de al menos 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es de un anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento del mismo se une covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante.

Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que están ya sea modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente permita que el anticuerpo conserve su inmunoespecificidad de unión al antígeno. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión

proteolítica, enlace a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede realizarse mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitadas a, la escisión química específica, la acetilación, la formilación, la síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. De forma adicional, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

5 Los anticuerpos pueden tener modificaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con receptores Fc. En particular, los anticuerpos pueden tener modificaciones en los restos de aminoácidos identificados como que están implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 97/34631).

10 Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa puede obtenerse en el mercado o producirse mediante cualquier método conocido para un experto en la materia tal como, por ejemplo, la síntesis química o las técnicas de expresión recombinantes. La secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa puede obtenerse, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos como esta, las publicaciones de la bibliografía o por clonación y secuenciación sistemáticas.

En una realización específica, pueden usarse anticuerpos conocidos para el tratamiento o prevención del cáncer. Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa pueden obtenerse en el mercado o producirse mediante cualquier método conocido para un experto en la materia tal como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinantes. La secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa puede obtenerse, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos como esta, las publicaciones de la bibliografía o por clonación y secuenciación sistemáticas. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, RITUXAN® (rituximab; Genentech) que es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin; OVAREX que es un anticuerpo murino para el tratamiento del cáncer de ovario; PANOREX (Glaxo Wellcome, NC), que es un anticuerpo de IgG<sub>2a</sub> murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; Cetuximab ERBITUX (Imclone Systems Inc., NY) que es un anticuerpo quimérico de IgG anti-EGFR para el tratamiento de cánceres positivos para el factor de crecimiento epidérmico, tales como el cáncer de cabeza y cuello; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; CAMPATH 1/H (LeukoSite, MA) que es un anticuerpo de IgG<sub>1</sub> humanizado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC); SMART MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA) y SGN-33 (Seattle Genetics, Inc., WA) que es un anticuerpo de IgG anti-CD33 humanizado para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA); LYMPHOCIDE (Immunomedics, Inc., NJ), que es un anticuerpo de IgG anti-CD22 humanizado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; SMART ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; ONCOLYM (Techniclone, Inc., CA) que es un anticuerpo anti-HLA-DR10 murino radiomarcado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; ALLOMUNE (Bio Transplant, CA) que es un mAb anti-CD2 humanizado para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o del linfoma no Hodgkin; AVASTIN (Genentech, Inc., CA) que es un anticuerpo anti-VEGF humanizado para el tratamiento del cáncer de pulmón y el colorrectal; EPRATUZAMAB (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA) que es un anticuerpo anti-CD22 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; y CEACIDE (Immunomedics, NJ), que es un anticuerpo humanizado anti-CEA para el tratamiento del cáncer colorrectal.

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos contra los siguientes antígenos (donde los cánceres a modo de ejemplo que pueden tratarse con el anticuerpo están entre paréntesis): CA125 (ovario), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), fetoproteína alfa (carcinomas), CA 242 (colorrectal), fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), antígeno específico de la próstata (próstata), antígeno de membrana específico de la próstata (próstata), fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de crecimiento epidérmico (carcinomas), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), receptor de anti-transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1-KLH (cáncer de mama), CEA (colorrectal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), receptor de IL-2 (leucemia y linfomas de linfocitos T), CD20 (linfoma no Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), gonadotropina coriónica humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma) y producto del oncogén Neu (carcinomas). Algunos anticuerpos específicos útiles incluyen, pero no se limitan a, mAb BR96 (Trail *et al.*, 1993, *Science* 261: 212-215), BR64 (Trail *et al.*, 1997, *Cancer Research* 57: 100-105), mAb contra el antígeno CD40, tales como mAb S2C6 (Francisco *et al.*, 2000, *Cancer Res* 60: 3.225-3.231), mAb contra el antígeno CD70, tales como mAb 1F6, mAb 1F6 humanizado, mAb 2F2 y mAb 2F2 humanizado (véase, por ejemplo, la Solicitud Internacional Publicada n.º WO 04/073656 y la solicitud publicada de los EE.UU. n.º 2006-0083736) y mAb contra el antígeno CD30, tales como AC10 (Bowen *et al.*, 1993, *J. Immunol* 151:5896-5906; Wahl *et al.*, 2002 *Cancer Res* 62 (13): 3736-42) y MDX-060. Pueden usarse muchos otros anticuerpos de internalización que se unen a antígenos asociados a tumores y se han revisado (véase, por ejemplo, Franke *et al.*, 2000, *Cancer Biother Radiopharm* 15, 459-76; Murray, 2000, *Semin Oncol.* 27:64-70; Breitling y Dubel, *Recombinant Antibodies*, John Wiley y Sons, Nueva York, 1998).

65 En otra realización específica, los anticuerpos para el tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmune se usan de acuerdo con las composiciones y métodos de la divulgación. Los anticuerpos inmunoespecíficos para un

antígeno de una célula que es responsable de la producción de anticuerpos autoinmunes pueden obtenerse de cualquier organización (por ejemplo, un científico de una universidad o una empresa) o pueden producirse por cualquier método conocido para un experto en la materia tal como, por ejemplo, la síntesis química o las técnicas de expresión recombinante. En otra realización, los anticuerpos útiles que son inmunoespecíficos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, el anticuerpo anti-nuclear; anti-ADN bc; anti-ADN mc, anticuerpo de IgM, IgG anti-cardiolipina; anticuerpo de IgM, IgG anti-fosfolípido; anticuerpo anti-EM; anticuerpo anti-mitocondrial; anticuerpos tiroideos; anticuerpo microsomal; anticuerpos de tiroglobulina; anticuerpo anti-SCL-70; anticuerpo anti-Jo; anticuerpo anti-U<sub>1</sub>RNP; anticuerpo anti-La/SSB; anti-SSA; anticuerpo anti-SSB; anticuerpo anti-células peritales; anticuerpo anti-histonas; anticuerpo anti-RNP; anticuerpo C-ANCA; anticuerpo P-ANCA; anticuerpo anti-centrómero; anticuerpo anti-Fibrilarina y anticuerpo anti-GBM.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos útiles pueden unirse a un receptor o un complejo de receptor expresado en un linfocito activado. El receptor o complejo de receptor puede comprender un miembro de la superfamilia del gen de las inmunoglobulinas, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocinas, un receptor de quimiocinas, una proteína principal de histocompatibilidad, una lectina o una proteína de control del complemento. Son ejemplos no limitantes de miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas adecuados: CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1 e ICOS. Son ejemplos no limitantes de miembros de la superfamilia de receptores de TNF adecuados: CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 y APO-3. Son ejemplos no limitantes de integrinas adecuados: CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 y CD104. Son ejemplos no limitantes de lectinas adecuadas: lectina de tipo C, de tipo S y de tipo I.

En una realización, la unidad de ligando se une a un linfocito activado que se asocia a una enfermedad autoinmune.

En otra realización específica, los ligandos útiles inmunoespecíficos para un antígeno viral o microbiano son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados o humanos. Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno viral" incluye, pero no se limita a, cualquier péptido viral, proteína de polipéptido (por ejemplo, gp120 de VIH, nef del VIH, glicoproteína RSV F, neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, HTLV tax, glicoproteína del virus del herpes simple (por ejemplo, gB, gC, gD, gE y) y antígeno de superficie de la hepatitis B) que sea capaz de provocar una respuesta inmune. Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno microbiano" incluye, pero no se limita a, cualquier péptido, polipéptido, proteína, sacárido, polisacárido o molécula de lípido microbianos (por ejemplo, un polipéptido bacteriano, fúngico, de protozoos patógenos o de levadura, incluyendo, por ejemplo, el LPS y el polisacárido capsular 5/8) que sea capaz de provocar una respuesta inmune.

Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno viral o microbiano pueden obtenerse en el mercado, por ejemplo, de BD Biosciences (San Francisco, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA) o Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) o pueden producirse por cualquier método conocido para un experto en la materia tal como, por ejemplo, la síntesis química o las técnicas de expresión recombinantes. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos que son inmunoespecíficos para un antígeno viral o microbiano puede obtenerse, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos como esta, de las publicaciones de la bibliografía o por clonación y secuenciación sistemáticas.

En una realización específica, los ligandos útiles son aquellos que son útiles para el tratamiento o la prevención de la infección viral o microbiana de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento. Los ejemplos de anticuerpos disponibles útiles para el tratamiento de una infección viral o una infección microbiana incluyen, pero no se limitan a, SYNAGIS (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo monoclonal anti-virus respiratorio sincitial (VRS) humanizado útil para el tratamiento de los pacientes con infección por VRS; PRO542 (Progenics) que es un anticuerpo de fusión de CD4 útil para el tratamiento de la infección por VIH; OSTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humano útil para el tratamiento del virus de la hepatitis B; PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo de IgG<sub>1</sub> humanizado útil para el tratamiento del citomegalovirus (CMV); y los anticuerpos anti-LPS.

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra los antígenos de las cepas patógenas de bacterias (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenas*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenuae*, *Treponema carateum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi* y *Chlamydia spp.*); hongos patógenos (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans* y *Histoplasma capsulatum*); protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma*

5 *gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*; o helmintos (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* y anquilostomas).

10 Otros anticuerpos útiles para el tratamiento de enfermedades virales incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra antígenos de virus patógenos, incluyendo como ejemplos y no como limitación: Poxviridae, Herpesviridae, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, Adenoviridae, Papovaviridae, Enteroviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Retroviridae, virus de la gripe, virus de la parainfluenza, paperas, sarampión, virus sincitial respiratorio, rubéola, Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis no A/no B, Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae y virus de la inmunodeficiencia humana.

15 En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han buscado identificar o polipéptidos transmembrana o asociados a tumores de otro modo que se expresen específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con la expresión en una o más células no cancerosas normales. Con frecuencia, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de dichos polipéptidos antígenos de la superficie celular asociados a tumores ha dado origen a la capacidad de dirigirse específicamente a las células cancerosas para su destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos.

25 En una realización a modo de ejemplo, el conjugado ligando-enlazador-fármaco tiene la Fórmula IIIa, donde el ligando es un anticuerpo Ab que se une al menos a uno de CD20, CD30, CD33, CD40, CD70, BCMA y antígeno Y de Lewis,  $w = 0$ ,  $y = 0$  y D tiene la fórmula Ib. Los conjugados a modo de ejemplo de fórmula IIIa incluyen aquellos en los que  $R^{17}$  es  $-(CH_2)_5-$ . También se incluyen dichos conjugados de fórmula IIIa que contienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 restos de fármaco D por unidad de ligando (es decir, conjugados de fórmula Ia en la que p es un valor en el intervalo de aproximadamente 2-8, por ejemplo aproximadamente 2-6). Los conjugados que contienen combinaciones de las características estructurales indicadas en este párrafo también se consideran dentro del alcance de los compuestos descritos en el presente documento.

35 En otra realización, el conjugado ligando-enlazador-fármaco tiene la Fórmula IIIa, donde el ligando es un anticuerpo Ab que se une al menos a uno de CD20, CD30, CD33, CD40, CD70, BCMA y antígeno Y de Lewis,  $w = 0$ ,  $y = 0$  y D tiene la fórmula Ib. Se incluyen dichos conjugados de fórmula IIIa en los que  $R^{17}$  es  $-(CH_2)_5-$ . También se incluyen dichos conjugados de Fórmula IIIa que contienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 restos de fármaco D por unidad de ligando (es decir, conjugados de fórmula Ia en la que p es un valor en el intervalo de aproximadamente 2-8, por ejemplo aproximadamente 2-6). Los conjugados que contienen combinaciones de las características estructurales indicadas en este párrafo también a modo de ejemplo.

45 En otra realización, el conjugado ligando-enlazador-fármaco tiene la Fórmula IIIa, donde el ligando es un anticuerpo Ab que se une a uno de CD20, CD30, CD33, CD40, CD70, BCMA y antígeno Y de Lewis,  $w = 0$ ,  $y = 0$  y D tiene la fórmula Ib. Se incluyen conjugados de fórmula IIIa en los que  $R^{17}$  es  $-(CH_2)_5-$ . Se incluyen conjugados de Fórmula IIIa que contienen combinaciones de las características estructurales indicadas en este párrafo dentro del alcance de los compuestos descritos en el presente documento.

#### 50 **Producción de anticuerpos recombinantes**

Pueden producirse anticuerpos usando cualquier método conocido en la técnica que sea útil para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o mediante expresión recombinante.

55 La expresión recombinante de anticuerpos, o un fragmento, un derivado o un análogo de los mismos, requiere la construcción de un ácido nucleico que codifique el anticuerpo. Si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier *et al.*, 1994, *BioTechniques* 17:242), lo que implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y la ligamiento de esos oligonucleótidos y, después, la amplificación de los oligonucleótidos ligados, por ejemplo, por PCR.

60 Como alternativa, una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de una fuente adecuada. Si no hay un clon disponible que contenga el ácido nucleico que codifica el anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia del anticuerpo, puede obtenerse un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpo o una biblioteca de ADNc generada a partir de cualquier tejido o células que expresen la inmunoglobulina) por, por ejemplo, amplificación por PCR usando

cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia del gen particular.

5 Si no hay disponible en el mercado un anticuerpo que reconozca específicamente un antígeno particular (o una fuente para una biblioteca de ADNc para clonar un ácido nucleico que codifique una inmunoglobulina de este tipo), pueden generarse anticuerpos específicos para un antígeno particular mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal no humano o modelo animal adecuado, tal como un conejo o ratón, para generar anticuerpos policlonales o, más preferentemente, mediante la generación de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, como se describe por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256: 495-497) o como se describe por Kozbor *et al.* (1983, *Immunology Today* 4:72) o Cole *et al.* (1985 en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Como alternativa, puede obtenerse un clon que codifique al menos la porción Fab del anticuerpo mediante la exploración de bibliotecas de expresión de Fab (por ejemplo, como se describe en Huse *et al.*, 1989, *Science* 246: 1275-1281) para clones de fragmentos Fab que se unen al antígeno específico o explorando bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, 1991, *Nature* 352: 624; Hane *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4937).

20 Una vez que se obtiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos el dominio variable del anticuerpo, puede introducirse en un vector que contenga la secuencia de nucleótidos que codifica las regiones constantes del anticuerpo (véase, por ejemplo, Publicación Internacional n.º WO 86/05807; WO 89/01036; y la Patente de los EE.UU. n.º 5.122.464). Hay disponibles vectores que contienen la cadena ligera o pesada completa que permite la expresión de una molécula de anticuerpo completa. El ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede usarse para introducir las sustituciones o deleciones de nucleótidos necesarias para sustituir (o borrar) los uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario con un resto de aminoácido que no contiene un grupo sulfhidrilo. Dichas modificaciones pueden realizarse por cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones o deleciones específicas en una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, pero no limitados a, la mutagénesis química y la mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchinson *et al.*, 1978, *J. Biol. Chem.* 253: 6551)

30 Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (véase, por ejemplo, Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 851-855; Neuberger *et al.*, 1984, *Nature* 312: 604-608; Takeda *et al.*, 1985, *Nature* 314: 452-454) mediante el corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tal como la que tiene una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, los anticuerpos humanizados.

40 Como alternativa, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Patente de Estados Unidos 4.694.778; Bird, 1988, *Science* 242: 423-42; Huston *et al.*, 1988, *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-5883; y Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544-54) para producir anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla. También puede usarse técnicas para el montaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra *et al.*, 1988, *Science* 242: 1038-1041).

45 Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fab, fragmentos Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, scFv, scFv-Fc y similares.

50 Una vez que se ha obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo, el vector para la producción del anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Pueden usarse métodos que son bien conocidos para los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contengan las secuencias de codificación del anticuerpo y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis y recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.* (1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; 2001; *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª ed, Cold Spring Harbor Publicar, Cold Spring Harbor, Nueva York) y Ausubel *et al.*, eds., en la serie de manuales de técnicas de laboratorio *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987-1999, *Current Protocols*, © 1994-199 John Wiley and Sons, Inc.).

60 Puede transferirse un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo o la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposomal y precipitación con fosfato de calcio) y después las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo. En realizaciones específicas, la expresión del anticuerpo está regulada por un promotor constitutivo, inducible o específico de tejido.

65



Las células hospedadoras utilizadas para expresar el anticuerpo recombinante pueden ser o bien células bacterianas tales como *Escherichia coli* o células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de inmunoglobulina recombinante completa. En particular, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), en conjunción con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para inmunoglobulinas (Foecking *et al.*, 198, *Gene* 45: 101; Cockett *et al.*, 1990, *Biotechnology* 8: 2).

Puede usarse diversos sistemas de vectores de expresión en hospedador para expresar los anticuerpos de inmunoglobulina. Dichos sistemas de expresión en hospedador representan vehículos por los cuales las secuencias codificantes del anticuerpo pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias de codificación de nucleótidos apropiadas, pueden expresar una molécula de inmunoglobulina de anticuerpo *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN de plásmido o de ADN de cósmido que contienen secuencias de codificación de inmunoglobulina; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias de codificación de inmunoglobulina; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias de codificación de inmunoglobulina; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor (VMC) y el virus del mosaico del tabaco (VMT)) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, Plásmido Ti) que contienen secuencias de codificación de inmunoglobulina; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BH, 293, 293T o 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus de la vacuna).

En sistemas bacterianos, puede seleccionarse ventajosamente una serie de vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de una proteína de este tipo, podrían ser deseables vectores que dirijan la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifique fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, 1983, *EMBO J.* 2: 1791), en el que la secuencia que codifica el anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región de codificación *lac Z* de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye y Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguido de la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de trombina o factor Xa de manera que el producto génico diana clonado puede liberarse del resto de GST.

En un sistema de insectos, pueden usarse el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (VPNAc) o el virus análogo a partir de *Drosophila Melanogaster* como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera defrugiperda*. La secuencia de codificación del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de VPNAc (por ejemplo el promotor de la polihedrina).

En las células hospedadoras de mamífero, pueden usarse una serie de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Después, este gen quimérico puede insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) da como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de inmunoglobulina en hospedadores infectados. (p.ej, ver Logan y Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 355-359). También pueden ser necesarias señales de iniciación específicas para la traducción eficiente de las secuencias codificantes de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de traducción y codones de iniciación exógenos pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase, por ejemplo, Bittner *et al.*, 1987, *Methods in Enzymol.* 153: 51-544). En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden expresarse usando el sistema CHEF (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 5.888.809).

Además, puede elegirse una cepa de célula hospedadora para modular la expresión de las secuencias insertadas o modifica y procesa el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, la glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, la escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Diferentes células hospedador tienen mecanismos característicos y específicos para el

procesamiento post-traducciona l y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse estirpes celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que posean la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto del gen. Dichas células hospedadoras de mamífero incluyen, pero no se limitan a, CHO (por ejemplo, DG44), VERY, BH, HeLa, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst .

Para el largo plazo, se utiliza normalmente la producción de alto rendimiento de proteínas recombinantes, la expresión estable. Por ejemplo, las estirpes celulares que expresan de manera estable un anticuerpo pueden modificarse por ingeniería genética. En lugar de usar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación virales, las células hospedadoras pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, las células manipuladas pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y, después, se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en estirpes celulares. Este método puede usarse ventajosamente para obtener por ingeniería genética estirpes celulares que expresen el anticuerpo. Dichas estirpes celulares modificadas por ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en la exploración y la evaluación de los antígenos tumorales que interactúan directamente o indirectamente con el anticuerpo.

Pueden usarse una serie de sistemas de selección, incluyendo pero no limitados a los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple de (Wigler *et al.*, 1977, *Cell* 11: 223), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 202) y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1980, *Cell* 22: 817) en células tk<sup>-</sup>, hgprt<sup>-</sup> o aprt<sup>-</sup>, respectivamente. También, puede usarse la resistencia a antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: DHFR, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 357; O'Hare *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 1527); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (*Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann Rev. Pharmacol Toxicology* 32: 573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann Rev. Biochem* 62: 191-217; Mayo de 1993, *TIB TECH* 11 (5): 155-215) e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre *et al.*, 1984, *Gene* 30: 147). Se describen métodos habitualmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que puede usarse en Ausubel *et al.* (citado anteriormente; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, Nueva York y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al* (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Nueva York; Colberre-Garapin *et al.*, 1981, *J. Mol Biol* 150: 1).

Los niveles de expresión de un anticuerpo pueden incrementarse mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema vector que expresa un anticuerpo es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedador aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada a la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (véase, por ejemplo, Crouse *et al.*, 1983, *Mol Cell Biol* 3: 257).

La célula hospedadora puede co-transfectarse con dos vectores de expresión, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten igual expresión de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, un único vector puede usarse para codificar ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se coloca normalmente antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (véase, por ejemplo, Proudfoot, 1986, *Nature* 322: 52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2197). Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que el anticuerpo se ha expresado de forma recombinante, puede purificarse usando cualquier método conocido en la técnica para la purificación de un anticuerpo, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas.

En otra realización a modo de ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

## Producción de anticuerpos

La producción de anticuerpos se ilustrará con referencia a anticuerpos anti-CD30, pero será evidente para los expertos en la materia que pueden producirse y modificarse anticuerpos para otras dianas (por ejemplo, miembros de la familia del receptor del TNF) de una manera similar. El uso de CD30 para la producción de anticuerpos es solamente a modo de ejemplo y no pretende ser limitante.

El antígeno CD30 que se usa para la producción de anticuerpos puede ser, por ejemplo, una forma soluble del dominio extracelular de CD30 o una porción del mismo, que contenga el epitopo deseado. Como alternativa, pueden usarse células que expresan CD30 en su superficie celular (por ejemplo, L540 (estirpe celular derivada de linfoma de Hodgkin con un fenotipo de linfocitos T) y L428 (estirpe celular derivada de linfoma de Hodgkin con un fenotipo de células B)) para generar anticuerpos. Otras formas de CD30 útiles para generar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia.

### (I) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que sea inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl<sub>2</sub>, o R<sup>1</sup>N=C=NR, donde R y R<sup>1</sup> son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección de la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde los animales se sangran y se analiza el suero para determinar el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Normalmente, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también pueden hacerse en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. También, se usan adecuadamente agentes agregantes como el alumbre para mejorar la respuesta inmune.

### (II) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. De este modo, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que no es una mezcla de anticuerpos individuales.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden fabricarse usando el método del hibridoma descrito primero por Kohler *et al.*, 1975, *Nature* 256: 495, o pueden fabricarse mediante métodos de ADN recombinante (Patente de los EE.UU. nº 4.816.567)

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente en el presente documento para inducir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después, los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre éstas, las estirpes celulares de mieloma preferidas son la estirpes de mieloma murino, tales como las derivados de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU. y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU. También se han descrito estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma de

ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (véase, por ejemplo, Kozbor, 1984, *J. Immunol* 133: 3001; y Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

5 El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están creciendo se ensaya para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis  
10 Scatchard de Munson *et al.*, 1980, *Anal. Biochem.* 107: 220.

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y pueden cultivarse  
15 mediante métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo,  
20 proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de  
25 hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede situarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen  
30 Skerra *et al.*, 1993, *Curr. Opinion in Immunol.* 5: 256-262 y Pluckthun, 1992, *Immunol. Revs.* 130: 151-188.

En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, 1990, *Nature* 348:  
35 552-554. Clackson *et al.*, 1991, *Nature*, 352: 624-628 y Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de alta afinidad (intervalo nM) de anticuerpos humanos mediante combinación aleatoria de cadenas (Marks *et al.*, 1992, *Bio/Technology*, 10: 779-783), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (véase, por ejemplo, Waterhouse *et al.*, 1993, *Nuc Acids Res.*, 21: 2265-2266). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las  
40 técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena pesada y la cadena ligera humanas por secuencias murinas homólogas (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 6851) o uniendo covalente a la  
45 secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina.

Normalmente, los dominios constantes de un anticuerpo se sustituyen por dichos polipéptidos no inmunoglobulina, o se sustituyen los dominios variables de un solo sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo por dichos  
50 polipéptidos no inmunoglobulina para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un solo sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

### (iii) Anticuerpos humanizados

55 Un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan con frecuencia restos "importados", que normalmente se obtienen a partir de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (véase, por ejemplo, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:  
60 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239: 1534-1536), sustituyendo las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano por secuencias de la región hipervariable. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados  
65 son anticuerpos normalmente humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos RMC se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de anticuerpos humanizados es importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como la región marco conservada (RMC) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 151: 2296; Chotia *et al.*, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901). Otro método usa una región marco conservada particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (véase, por ejemplo, Carter *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 4285; Presta *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 151: 2623).

En otra realización, los anticuerpos pueden humanizarse mediante la retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Los anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Habitualmente hay modelos tridimensionales de inmunoglobulina disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Hay programas informáticos disponibles que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de RMC pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias del receptor e importadas de manera que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión al antígeno.

Se consideran diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, scFv, scFv-Fc y similares. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo de IgG1 intacto.

#### (iv) Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo (J<sub>H</sub>) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina humana de la línea germinal en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362: 255-258; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immu.* 07: 33; y la Patente de los EE.UU. n.º 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807

Como alternativa, la tecnología de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, 1990, *Nature* 348: 552-553) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco en genes de proteína de la cubierta ya sea mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se muestran como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson y Chiswell, 1993, *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571. Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson *et al.*, 1991, *Nature* 352: 624-628 aislaron una gama diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597) o Griffith *et al.*, 1993, *EMBO J.* 12: 725-734. Véase también la Patente de los EE.UU. n.º 5.565.332 y 5.573.905. Como se ha analizado anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden generarse mediante células B activadas *in vitro* (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. n.º 5.567.610 y 5.229.275). Se describen anticuerpos anti-CD30 humanos en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. n.º 2004-0006215.

**(V) Fragmentos de anticuerpos**

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, 1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117; y Brennan *et al.*, 1985, *Science* 229: 81). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células hospedador recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (véase, por ejemplo, Carter *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10: 163-167). De acuerdo con otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la Patente de los EE.UU. n.º 5.571.894; y la Patente de los EE.UU. n.º 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente de los EE.UU. n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

**(Vi) Anticuerpos biespecíficos**

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes de una proteína diana. Como alternativa, un brazo del anticuerpo puede combinarse con un brazo que se une a receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de focalizar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa la diana. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan la diana.

La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (véase, por ejemplo, Millstein *et al.*, 1983, *Nature* 305: 537-539). Debido a la variedad aleatoria de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se desvelan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Trauneker *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10: 3655-3659. De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, regiones C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (C<sub>H1</sub>) contenga el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones donde proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no tiene particular importancia.

En una realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, puesto que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se desvela en el documento WO 94/04690. Para detalles adicionales sobre generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, 1986, *Methods in Enzymology* 121: 210.

De acuerdo con otro enfoque descrito en la Patente de los EE.UU. n.º 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C<sub>H3</sub> de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interface de la segunda molécula de anticuerpo mediante el reemplazo de cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero por sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

También se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos en la bibliografía. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando unión química. Brennan *et al.*, 1985, *Science*, 229: 81 describe un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinde proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles vecinales e impedir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, 1992, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 describen la producción de un anticuerpo biespecífico completamente humanizado molécula F(ab')<sub>2</sub>. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148 (5): 1547-1553. Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede usarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento están obligados a emparejarse con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de cadena simple Fv (sFv). Véase Gruber *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152: 5368.

Se consideran anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

#### (vii) Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos

Se consideran la modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritas en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se preparan variantes de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se hace para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo, tales como cambiar el número o posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones favorecidas para la mutagénesis se llama "mutagénesis de rastreo con alanina", como se describe por Cunningham y Wells, 1989, *Science*, 244: 1081-1085. En este caso, se identifican un resto o un grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferentemente alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones después se refinan introduciendo más u otras variantes en o para, los sitios de sustitución. Así, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, el rastreo con ala o la mutagénesis aleatoria se realizan en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos expresadas se exploran para determinar la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a los extremos N- o C-terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se consideran las alteraciones de RMC.

5 Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) el grueso de la cadena lateral. Los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- 15 (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

20 Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se generan. Una forma conveniente de generar dichas variantes por sustitución implica la maduración de afinidad usando la presentación en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo, los sitios 6-7) para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de este modo se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Después, las variantes de presentación en fagos se exploran para determinar su actividad biológica (por ejemplo, la afinidad de unión) como se describe en el presente documento. Con el fin de identificar los sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, puede realizarse la mutagénesis de rastreo con alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión del antígeno. Como alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a exploración como se describe en el presente documento y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes pueden seleccionarse para un mayor desarrollo.

40 Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, por ejemplo, a fin de potenciar la citotoxicidad dependiente de antígeno mediada por células (CDAC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o la destrucción celular mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CDAC) aumentadas. Véase Caron *et al.*, 1992, *J. Exp Med.* 176: 1191-1195 y Shopes, 1992, *J. Immunol.* 148: 2918-2922. Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, 1993, *Cancer Research* 53: 2560-2565. Como alternativa, un anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética que tiene regiones Fc duales y de ese modo puede tener la lisis de complemento y las capacidades de CDAC potenciadas. Véase Stevenson *et al.*, 1989, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230.

55 Para incrementar la semivida en suero del anticuerpo, uno puede incorporar un epítipo de unión al receptor de recuperación en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe en la Patente de los EE.UU. n.º 5.739.277, por ejemplo. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor de recuperación" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, o IgG<sub>4</sub>) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

#### 60 (viii) Variantes de glicosilación

Los anticuerpos en el CAF pueden estar glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (véase, por ejemplo, Jefferis y Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, *Tibtech* 15: 26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas influyen en la función de la proteína (véase, por ejemplo, Boyd *et al.*, 1996, *Mol Immunol* 32: 1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, *Biochem* 29: 4175-4180) y la interacción intramolecular entre las porciones de la glicoproteína puede influir en la conformación y la superficie



tridimensional presentada de la glicoproteína (Hefferis y Lund, citado anteriormente; Wyss y Wagner, 1996, *Current Opin Biotech* 7: 409-416.). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glicoproteína dada hacia ciertas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha notificado que en IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido 'voltea' el espacio inter-CH<sub>2</sub> y los restos de N-acetilglucosamina terminales están disponibles para unirse a la proteína de unión a manosa (Malhotra *et al.*, 1995, *Nature Med.* 1: 237-243). La eliminación por glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo de IgG1 monoclonal murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de linfocitos humanos) producido en células de ovario de hámster chino (CHO) dio como resultado una reducción completa de la lisis mediada por complemento (LCMC) (Boyd. *et al.*, 1996, *Mol Immunol.* 32: 1311-1318), mientras que la eliminación selectiva de restos de ácido siálico usando neuraminidasa no dio como resultado ninguna pérdida de DMCL. También se ha notificado que la glicosilación de anticuerpos influye en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CDAC). En particular, se notificó que las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc de bisección, tienen una actividad de CDAC mejorada (Umana *et al.*, 1999, *Nature Biotech.* 17: 176-180).

La glicosilación de anticuerpos normalmente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Variantes de glicosilación de anticuerpos son variantes en las que se altera el patrón de glicosilación de un anticuerpo. Por alteración se entiende la eliminación de uno o más restos de hidratos de carbono que se encuentren en el anticuerpo, la adición de uno o más restos de hidrato de carbono al anticuerpo, cambiando la composición de la glicosilación (patrón de glicosilación), la extensión de la glicosilación, etc.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue alterando convenientemente la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O). De forma similar, la eliminación de sitios de glicosilación puede realizarse mediante la alteración de aminoácidos dentro de los sitios de glicosilación nativos del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos se altera por lo general mediante la alteración de la secuencia de ácido nucleico subyacente. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

La glicosilación (incluyendo el patrón de glicosilación) de los anticuerpos también pueden alterarse sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende mucho de la célula hospedadora utilizada para expresar el anticuerpo. Puesto que el tipo de célula utilizada para la expresión de las glicoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como agentes terapéuticos potenciales es raramente la célula nativa, pueden esperarse variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Hse *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070. Además de la elección de las células hospedadoras, los factores que afectan a la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación del medio, la densidad de cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos métodos para alterar el patrón de glicosilación conseguido en un organismo hospedador particular incluyendo la introducción o la sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (Patentes de los EE.UU. nº 5.047.335; 5.510.261; y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, pueden eliminarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo usando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula hospedadora recombinante puede modificarse mediante ingeniería genética, por ejemplo, haciéndola defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas y otras técnicas similares son bien conocidas en la técnica.

La estructura de la glicosilación de anticuerpos puede analizarse fácilmente mediante técnicas convencionales de análisis de hidrato de carbonos, incluyendo cromatografía de lectina, la RMN, la espectrometría de masas, la HPLC, la GPC, el análisis composicional de monosacáridos, la digestión enzimática secuencial y la HPAEC-PAD, que utiliza cromatografía de intercambio aniónico de alto pH para separar oligosacáridos basándose en la carga. También se conocen métodos para la liberación de oligosacáridos con fines de análisis, e incluyen, sin limitación, el tratamiento enzimático (habitualmente realizado usando péptido-N-glicosidasa F/endo- $\beta$ -galactosidasa), la eliminación usando ambiente alcalino duro para liberar principalmente estructuras ligadas a O y los métodos químicos usando hidrazina anhidra para liberar oligosacáridos ligados tanto a N como a O.

### Exploración de conjugados ligando-enlazador-fármaco

Los animales transgénicos y las estirpes celulares son particularmente útiles en la exploración de conjugados fármaco-enlazador-ligando (por ejemplo, conjugados anticuerpo fármaco (CAF)) para tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos que implican la sobreexpresión de una proteína diana (por ejemplo, CD20, CD30, CD33, CD40, CD70, BCMA e Y de Lewis). La exploración de conjugados fármaco-enlazador-ligando como CAF se ejemplifica en el presente documento.

Los animales transgénicos y las estirpes celulares son particularmente útiles en la exploración de conjugados anticuerpo fármaco (CAF). La exploración para encontrar un CAF útil pueden incluir la administración de CAF candidato en un intervalo de dosis al animal transgénico y ensayar a diferentes puntos temporales para determinar el efecto o efectos del CAF sobre la enfermedad o trastorno que se está evaluando. Como alternativa o adicionalmente, el fármaco puede administrarse antes de o simultáneamente con la exposición a un inductor de la enfermedad, si es aplicable. El CAF candidato puede explorarse en serie y de forma individual o en paralelo con formato de exploración de medio o alto rendimiento. La velocidad a la que un CAF puede explorarse para determinar su utilidad para tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos solo está limitada por la tasa de síntesis o la metodología de exploración, incluyendo la detección/medición/análisis de los datos.

Una realización es un método de exploración que comprende (a) trasplantar células de una estirpe celular estable de cáncer de células renales en un animal no humano, (b) administrar un candidato a fármaco CAF al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato para inhibir la formación de tumores de la estirpe celular trasplantada.

Otra realización es un método de exploración que comprende (a) poner en contacto células de una estirpe celular estable de enfermedad de Hodgkin con un candidato a fármaco CAF y (b) evaluar la capacidad del CAF candidato para bloquear la activación por ligando de CD40.

Otra realización es un método de exploración que comprende (a) poner en contacto células de una estirpe celular estable de la enfermedad de Hodgkin con un candidato a fármaco CAF y (b) evaluar la capacidad del CAF candidato para inducir la muerte celular. En una realización se evalúa la capacidad del CAF candidato para inducir la apoptosis.

Una realización es un método de exploración que comprende (a) trasplantar células de una estirpe celular estable de cáncer en un animal no humano, (b) administrar un candidato a fármaco CAF al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato para inhibir la formación de tumores a partir de la estirpe celular trasplantada.

Otra realización es un método de exploración que comprende (a) poner en contacto células de una estirpe celular estable de cáncer con un candidato a fármaco CAF y (b) evaluar la capacidad del CAF candidato para inducir la muerte celular. En una realización se evalúa la capacidad del CAF candidato para inducir la apoptosis.

En una realización, se exploran CAF candidatos administrándolos al animal transgénico en un intervalo de dosis y evaluando la respuesta fisiológica del animal a los compuestos en el tiempo. La administración puede ser oral o por inyección adecuada, dependiendo de la naturaleza química del compuesto que se evalúa. En algunos casos, puede ser apropiado administrar el compuesto conjuntamente con co-factores que potenciarían la eficacia del compuesto. Si se usan estirpes celulares derivadas de los animales transgénicos objeto para la exploración de compuestos útiles en el tratamiento de diversos trastornos, los compuestos de ensayo se añaden al medio de cultivo celular en un momento apropiado y la respuesta celular al compuesto se evalúa a lo largo del tiempo usando los ensayos bioquímicos y/o histológicos apropiados. En algunos casos, puede ser apropiado aplicar el compuesto de interés al medio de cultivo conjuntamente con co-factores que potenciarían la eficacia del compuesto.

Por tanto, en el presente documento se proporcionan ensayos para la identificación de conjugados fármaco-enlazador-ligando (tales como CAF) que se dirigen y se unen específicamente a una proteína diana, la presencia de la cual se correlaciona con la función celular anormal y en la patogénesis de la proliferación y/o diferenciación celular que se relaciona causalmente con el desarrollo de tumores.

Para identificar compuestos inhibidores del crecimiento que se dirigen específicamente a un antígeno de interés, pueden explorarse compuestos que inhiban el crecimiento de las células cancerosas que sobreexpresan el antígeno de interés derivado de animales transgénicos, puede realizarse el ensayo descrito en la Patente de los EE.UU. n.º 5.677.171. De acuerdo con este ensayo, las células cancerosas que sobreexpresan el antígeno de interés se cultivan en una mezcla 1:1 de F12 y medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10 %, glutamina y penicilina estreptomycin. Las células se siembran en placas a 20.000 células en una placa de cultivo celular de 35°mm (2 ml/35 mm de plato) y el compuesto de ensayo se añade a diversas concentraciones. Después de seis días, el número de células, en comparación con las células no tratadas se contó usando un contador de células COULTER™ electrónico. Los compuestos que inhiben el crecimiento celular en aproximadamente un 20 a un 100 % o en aproximadamente un 50 a un 100 % pueden seleccionarse como compuestos inhibidores del crecimiento.

Para seleccionar compuestos que induzcan la muerte celular, puede evaluarse, con respecto al control, la pérdida de integridad de la membrana tal como se indica mediante, por ejemplo, captación de PI, azul de tripano o 7AAD. El ensayo de captación de PI utiliza células aisladas del tejido tumoral de interés de un animal transgénico. De acuerdo con este ensayo, las células se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM):F-12 de Ham (50:50) complementado con FBS inactivado por calor al 10 % (Hyclone) y L-glutamina 2°mM. Por tanto, el ensayo se realiza en ausencia de complemento y células efectoras inmunes. Las células se siembran a una densidad de  $3 \times 10^6$  por plato en platos de  $100 \times 20$  mm y se deja que se unan durante la noche. Después, el medio se retira y se reemplaza por medio recién preparado solo o medio recién preparado que contiene diversas concentraciones del compuesto. Las células se incuban durante un periodo de tiempo de 3 días. Después de cada tratamiento, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. Las células se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C, el sedimento se resuspende en 3 ml de tampón de unión a  $Ca^{2+}$  frío (Hepes 10°mM, pH 7,4, NaCl 140°mM,  $CaCl_2$  2,5°mM) y se divide en alícuotas en tubos de  $12 \times 75$  mm tapados con tamiz de 35°mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para retirar grumos de células. Después, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACScan™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Los compuestos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular según se determina por la captación de PI pueden seleccionarse como compuestos que inducen la muerte celular.

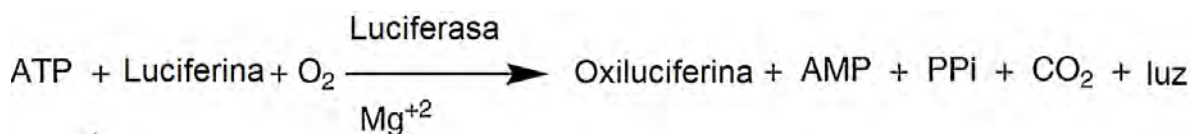
Con el fin de seleccionar compuestos que induzcan la apoptosis, se realiza un ensayo de unión a anexina usando células del tejido tumoral de interés del animal transgénico. Las células se cultivan y se siembran en placas como las analizadas en el párrafo anterior. Después, el medio se retira y se reemplaza por medio recién preparado solo o medio recién preparado que contiene 10 µg/ml del conjugado anticuerpo fármaco (CAF). Después de un periodo de incubación de tres días, las monocapas se lavan con PBS y se separan mediante tripsinización. Después, las células se centrifugan, se resuspenden en tampón de unión de  $Ca^{2+}$  y se dividen en alícuotas en tubos como los analizados anteriormente para el ensayo de la muerte celular. Los tubos reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V-FITC) (1 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACScan™ y software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Los compuestos que inducen niveles estadísticamente significativos de unión a anexina con respecto al control se seleccionan como compuestos inductores de la apoptosis.

### 30 Ensayos de proliferación celular *in vitro*

En general, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado fármaco-enlazador-ligando, tal como un conjugado anticuerpo fármaco (CAF), se mide: exponiendo células de mamífero que tengan proteínas receptoras para el anticuerpo del conjugado en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y midiendo la viabilidad celular. Se usan ensayos celulares *in vitro* para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de apoptosis (activación de las caspasas) de un conjugado fármaco-enlazador-ligando. La exploración de conjugados fármaco-enlazador-ligando como se los CAF se ejemplifica en el presente documento.

La potencia *in vitro* de los conjugados anticuerpo fármaco se mide mediante un ensayo de proliferación celular (véanse los ejemplos). El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo disponible en el mercado (Promega Corp., Madison, WI), basado en la expresión recombinante de luciferasa de *Coleoptera* (Patente de los EE.UU. n.º 5.583.024; 5.674.713 y 5.700.670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de las células metabólicamente activas (Crouch *et al.*, 1993, *J. Immunol Meth.* 160: 81-88, Patente de los EE.UU. n.º 6.602.677). El ensayo CellTiter-Glo® se realiza en formato de 96 pocillos, por lo que es susceptible de exploración automatizada de alto rendimiento (HTS) (Cree *et al.* (1995) *Anticancer Drugs* 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica añadir el reactivo individual (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en medio complementado con suero. No son necesarios el lavado de células, la retirada del medio ni las etapas de pipeteado múltiple. El sistema detecta tan solo 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de la adición de reactivo y la mezcla. Las células pueden tratarse continuamente con CAF o pueden tratarse y separarse del CAF. Generalmente, las células tratadas brevemente, es decir, durante 3 horas, muestran los mismos efectos de potencia que las células tratadas de forma continua.

El formato "añadir-mezclar-medir" homogéneo da como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El Ensayo CellTiter-Glo® genera una señal luminiscente "de tipo brillo", producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una semivida generalmente superior a cinco horas, dependiendo del tipo de célula y del medio utilizados. Las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia relativa (ULR). El sustrato, la luciferina de escarabajo, es descarboxilada oxidativamente por la luciferasa de luciérnaga recombinante con conversión simultánea de ATP en AMP y generación de fotones. La semivida extendida elimina la necesidad de utilizar inyectores de reactivos y proporciona flexibilidad para el procesamiento en modo continuo o por lotes de múltiples placas. Este ensayo de proliferación celular puede usarse con diversos formatos de múltiples pocillos, por ejemplo, formatos de 96 o 384 pocillos. Los datos pueden registrarse mediante un luminómetro o un dispositivo de formación de imágenes por cámara CCD. Los resultados de la luminiscencia se presentan como unidades de luz relativa (ULR), medidas a lo largo del tiempo.



Los efectos anti-proliferativos de los conjugados anticuerpo fármaco pueden medirse mediante el ensayo de destrucción celular *in vitro* y de proliferación celular anterior contra diferentes estirpes celulares de tumor de mama.

5

#### Aclaramiento plasmático y estabilidad *in vivo*

El aclaramiento plasmático farmacocinético y la estabilidad de los conjugados fármaco-enlazador-ligando, tales como los CAF, pueden investigarse en ratas y macacos a lo largo del tiempo. La exploración de conjugados fármaco-enlazador-ligando como los CAF se ejemplifica en el presente documento.

10

#### Toxicidad en roedores

Los conjugados anticuerpo fármaco y un control CAF-menos, "vehículo", se evalúan en un modelo de toxicidad aguda en rata. La toxicidad del CAF se investiga mediante el tratamiento de ratas Sprague-Dawley macho y hembra con el CAF y la posterior inspección y análisis de los efectos en diversos órganos. Las observaciones globales incluyen los cambios en el peso corporal y los signos de lesiones y hemorragias. Los parámetros de patología clínica (hematología y química de suero), la histopatología y la necropsia se realizan en animales tratados. Se considera que la pérdida de peso o el cambio de peso con respecto a los animales tratados solamente con vehículo, en los animales después del tratamiento con CAF es un indicador global y general de toxicidad sistémica o localizada.

15

20

La hepatotoxicidad se mide por las enzimas hepáticas elevadas, los números aumentados de formas mitóticas y apoptóticas y la necrosis de los hepatocitos. La toxicidad hematolinfóide se observa por el agotamiento de leucocitos, principalmente granulocitos (neutrófilos) y/o plaquetas y la implicación de los órganos linfoides, es decir, la atrofia o la actividad apoptótica. La toxicidad también se observa por lesiones del tracto gastrointestinal, tales como el aumento del número de formas mitóticas y apoptóticas y la enterocolitis degenerativa.

25

Las enzimas indicativas de lesión hepática que se estudian incluyen:

30

#### AST (aspartato aminotransferasa)

- Localización: citoplásmica, hígado, corazón, músculo esquelético, riñón
- Relación hígado:plasma de 7000:1
- T1/2: 17 h

35

#### ALT (alanina aminotransferasa)

- Localización: citoplásmica; hígado, riñón, corazón, músculo esquelético
- Relación hígado:plasma de 3000:1

40

- T1/2: 42 horas; variación diurna
- GGT (g-glutamyl transferasa)

- Localización: membrana plasmática de las células con alta capacidad de absorción o de secreción; hígado, riñón, intestino
- Factor predictivo pobre de lesión hepática; habitualmente elevada en los trastornos de las vías biliares

45

#### Toxicidad/Seguridad en macacos

Al igual que en el estudio de toxicidad/seguridad en rata, los macacos se tratan con CAF seguido de mediciones de enzimas hepáticas e inspección y análisis de los efectos en diversos órganos. Las observaciones globales incluyen los cambios en el peso corporal y los signos de lesiones y hemorragias. Los parámetros de patología clínica (hematología y química de suero), la histopatología y la necropsia se realizan en animales tratados.

50

#### Síntesis de los compuestos

55

Los compuestos a modo de ejemplo y conjugados a modo de ejemplo pueden fabricarse usando los procedimientos de síntesis que se esbozan a continuación en los Esquemas 5-16. Como se describe en más detalle a continuación, los compuestos a modo de ejemplo o conjugados a modo de ejemplo pueden prepararse convenientemente usando un enlazador que tenga un sitio reactivo para la unión al fármaco y al ligando. En un aspecto, un enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo a un grupo nucleófilo presente en un ligando, tal como, pero no limitado a un anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los grupos sulfhidrido, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo a un grupo

60

electrófilo en un enlazador y forma un enlace covalente con una unidad de enlazador. Los grupos electrófilos útiles incluyen, pero no se limitan a, los grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para la unión de anticuerpos.

- 5 En otra realización, un enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo a un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los grupos carbonilo aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente con una unidad de anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un enlazador incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a un enlazador.

- 15 Los grupos funcionales de ácido carboxílico y los grupos funcionales de cloroformiato son también sitios reactivos útiles para un enlazador, ya que pueden reaccionar con grupos amino secundarios de un fármaco para formar un enlace amida. También es útil como un sitio reactivo un grupo funcional carbonato en un enlazador, tal como, pero no limitado a carbonato de p-nitrofenilo, que puede reaccionar con un grupo amino de un fármaco, tal como, pero no limitado a, N-metil valina, para formar un enlace carbamato. Normalmente, los fármacos a base de péptidos pueden prepararse mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase Schroder y Lubke, "*The Peptides*", volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo la química de péptidos.

- 25 La síntesis de un extensor ilustrativo que tiene un grupo maleimida electrófilo se ilustra a continuación en los Esquemas 8-9. En el Esquema 10 se describen métodos de síntesis generales útiles para la síntesis de un enlazador. El Esquema 11 muestra la construcción de una unidad de enlazador que tiene un grupo val-cit, un grupo maleimida electrófilo y un grupo espaciador autodestructivo PAB. El Esquema 12 representa la síntesis de un enlazador que tiene un grupo phe-lys, un grupo maleimida electrófilo, con y sin el grupo espaciador autodestructivo PAB. El Esquema 13 presenta un esbozo general para la síntesis de un compuesto de fármaco-enlazador, mientras que el Esquema 14 presenta una vía alternativa para preparar un compuesto de fármaco-enlazador. El Esquema 15 representa la síntesis de un enlazador ramificado que contiene un grupo BHMS. El Esquema 16 esboza la unión de un anticuerpo a un compuesto de fármaco-enlazador para formar un conjugado fármaco-enlazador-anticuerpo y el Esquema 14 ilustra la síntesis de conjugados fármaco-enlazador-anticuerpo que tienen, por ejemplo, pero sin limitación, 2 o 4 fármacos por anticuerpo.

- 35 Como se describe en más detalle a continuación, los conjugados a modo de ejemplo se preparan convenientemente usando un enlazador que tiene dos o más sitios reactivos para la unión al fármaco y a un ligando. En un aspecto, un enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que es reactivo a un grupo nucleófilo presente en un ligando, tal como un anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo es reactivo a un grupo electrófilo en un enlazador y forma un enlace covalente con una unidad de enlazador. Los grupos electrófilos útiles incluyen, pero no se limitan a, los grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio conveniente para la unión de anticuerpos.

- 45 En otra realización, un enlazador tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que es reactivo a un grupo electrófilo presente en un ligando, tal como un anticuerpo. Los grupos electrófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los grupos carbonilo aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleófilo de un enlazador puede reaccionar con un grupo electrófilo en un anticuerpo y formar un enlace covalente con una unidad de anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un enlazador incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. El grupo electrófilo en un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a un enlazador.

En otra realización más, un fármaco que contiene óxido de arsina aromático puede unirse directamente a una unidad de ligando que contiene ditioles proximales para formar estructuras cíclicas arsina-ditiole estables.

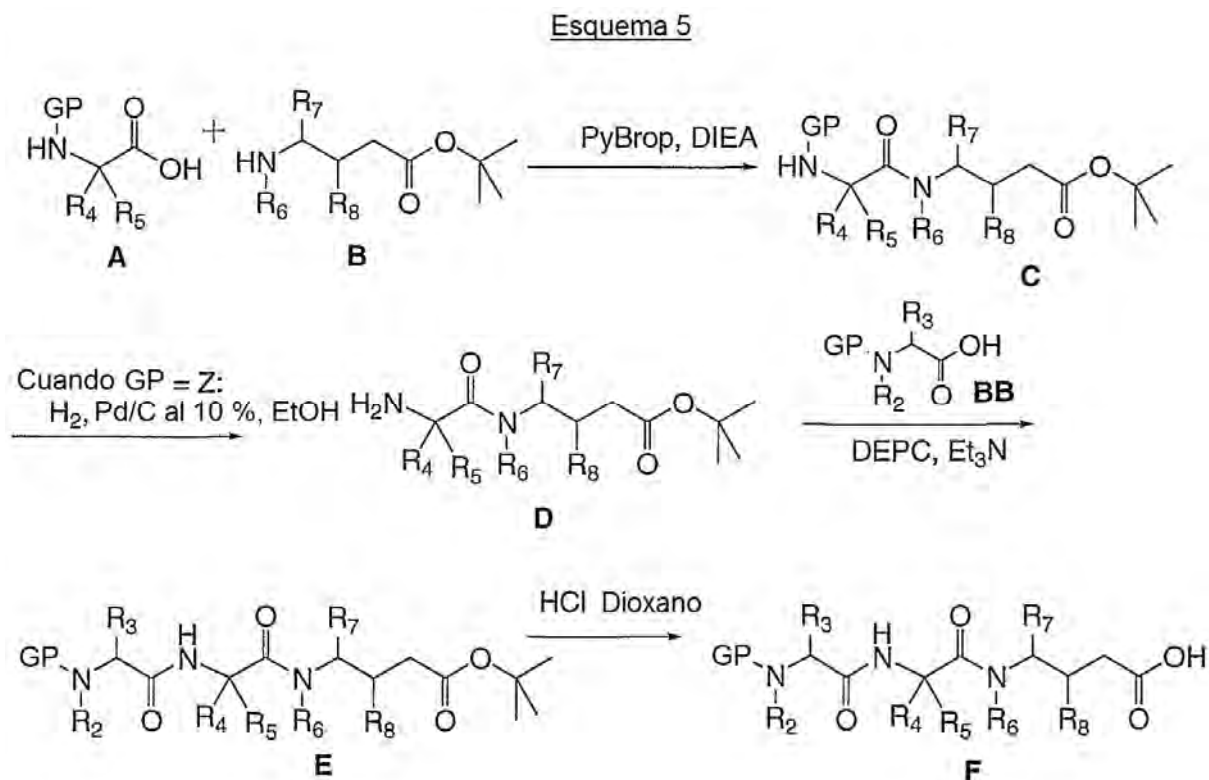
## 55 Síntesis de restos de fármaco

- Normalmente, los fármacos basados en péptidos pueden prepararse mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schroder y K. Lubke, "*The Peptides*", volumen 1, págs. 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

- 65 Los restos de fármaco de auristatina/dolastatina pueden prepararse de acuerdo con los métodos generales de: Patente de los EE.UU. n.º 5.635.483; Patente de los EE.UU. n.º 5.780.588; Pettit *et al.*, 1989, *J. Am. Chem. Soc.* 111: 5463-5465; Pettit *et al.*, 1998, *Anticancer Drug Design* 13: 243-277; y Pettit *et al.*, 1996, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15*: 859-863.

En una realización, un medicamento se prepara combinando aproximadamente un equivalente estequiométrico de un dipéptido y un tripéptido, preferentemente en una reacción en una sola etapa en condiciones de condensación adecuadas. Este enfoque se ilustra en los Esquemas 5-7, a continuación.

- 5 El Esquema 5 ilustra la síntesis de una unidad de tripéptido N-terminal **F**, que es un intermedio útil para la síntesis de los compuestos de la fórmula de la Fórmula Ib.



- 10 Como se ilustra en Esquema 5, un aminoácido protegido **A** (donde GP representa un grupo protector de amina,  $R^4$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$ ,  $-O$ -(alquilo  $C_1-C_8$ ), arilo,  $X^1$ -arilo,  $X^1$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ ), heterociclo  $C_3-C_8$ ,  $X^1$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ ) y  $R^5$  se selecciona entre H y metilo; o  $R^4$  y  $R^5$  juntos, tienen la fórmula  $-(CR^aR^b)_n$  en la que  $R^a$  y  $R^b$  se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_8$  y carbociclo  $C_3-C_8$  y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6 y forma un anillo con el átomo de carbono al que están unidos)
- 15 se selecciona entre  $-H$  y  $-\text{alquilo } C_1-C_8$  y  $R^7$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$ ,  $-O$ -(alquilo  $C_1-C_8$ ), arilo,  $X^1$ -arilo,  $X^1$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ ), heterociclo  $C_3-C_8$  y  $X^1$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ )) en condiciones de acoplamiento adecuadas, por ejemplo, en presencia de PyBrop y diisopropiletilamina o usando DCC (véase, por ejemplo, Miyazaki et. al., 1995, *Chem. Pharm. Bull.* 43 (10): 1706-1718).
- 20 Los grupos protectores adecuados GP y los métodos de síntesis adecuados para proteger un grupo amino con un grupo protector son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, segunda edición, 1991, John Wiley & Sons. Son aminoácidos protegidos a modo de ejemplo **A**: GP-Ile y, en particular, GP-Val, mientras que otros aminoácidos protegidos adecuados incluyen, sin limitación: GP-ciclohexilglicina, GP-ciclohexilalanina, ácido GP-aminociclopropano-1-carboxílico, ácido GP-aminoisobutírico,
- 25 fenilalanina, GP-fenilglicina y GP-*terc*-butilglicina. Z es un grupo protector a modo de ejemplo. Fmoc es otro grupo protector a modo de ejemplo. Un *t*-butil éster **B** a modo de ejemplo es éster *t*-butílico de dolaisoleuina.

- El dipéptido **C** puede purificarse, por ejemplo, usando cromatografía y posteriormente se desprotege, por ejemplo, usando  $\text{H}_2$  y Pd-C al 10 % en etanol cuando GP es benciloxycarbonilo o usando dietilamina para la eliminación de un grupo protector Fmoc. La amina resultante **D** forma fácilmente un enlace peptídico con un aminoácido **BB** (en el que  $R^1$  se selecciona entre  $-H$ ,  $-\text{alquilo } C_1-C_8$  y  $-\text{carbociclo } C_3-C_8$ ; y  $R^2$  se selecciona entre  $-H$  y  $-\text{alquilo } C_1-C_8$  o  $R^1$  y  $R^2$  unidos, tienen la fórmula  $-(CR^aR^b)_n$  en la que  $R^a$  y  $R^b$  se seleccionan independientemente entre  $-H$ ,  $-\text{alquilo } C_1-C_8$  y  $-\text{C}_3-C_8$  carbociclo y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6 y forman un anillo con el átomo de nitrógeno al que están unidos y  $R^3$  se selecciona entre hidrógeno, alquilo  $C_1-C_8$ ,  $C_3-C_8$  carbociclo,  $-O$ -(alquilo  $C_1-C_8$ ), arilo,  $X^1$ -arilo,  $X^1$ -(carbociclo  $C_3-C_8$ ), heterociclo  $C_3-C_8$  y  $X^1$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ )). Los *N,N*-dialquilaminoácidos son aminoácidos a modo de ejemplo para **BB**, tales como *N,N*-dimetilvalina disponible en el mercado. Otros *N,N*-dialquilaminoácidos puede prepararse por bis-alquilación reductora usando procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Bowman et al., 1950, *J. Chem. Soc.* 1342-1340). Fmoc-Me-L-Val y Fmoc-Me-L-glicina son dos aminoácidos a modo de ejemplo **BB**

útiles para la síntesis de derivados de N-monoalquilo. La amina **D** y el aminoácido **BB** reaccionan para proporcionar el tripéptido **E** usando un reactivo de acoplamiento DEPC con trietilamina como base. El grupo C-terminal protector de **E** posteriormente se desprotege con HCl para proporcionar el compuesto tripeptídico de fórmula **F**.

- 5 Los ejemplos ilustrativos de la metodología de acoplamiento con DEPC y la metodología de acoplamiento con PyBrop del Esquema 5 se describen a continuación en el Procedimiento General A y el Procedimiento General B, respectivamente. La metodología ilustrativa para la desprotección de una amina protegida con Cbz por hidrogenación catalítica se describe a continuación en el Procedimiento General C.

10 Procedimiento general A: Síntesis de péptidos usando DEPC

- El aminoácido o péptido *N*-protegido o *N,N*-disustituido **D** (1,0 eq.) y una amina **BB** (1,1 eq.) se diluyen con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano (0,1 a 0,5 M). Después, se añade una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina (1,5 eq.), seguida de DEPC (1,1 eq.). La solución resultante se agita, preferentemente en atmósfera de argón, durante hasta 12 horas mientras se controla mediante HPLC o TLC. El disolvente se retira al vacío a temperatura ambiente y el producto en bruto se purifica usando, por ejemplo, HPLC o cromatografía en columna ultrarrápida (columna de gel de sílice). Las fracciones pertinentes se combinan y se concentran al vacío para proporcionar tripéptido **E** que se seca al vacío durante la noche.

20 Procedimiento general B: síntesis de péptidos usando PyBrop

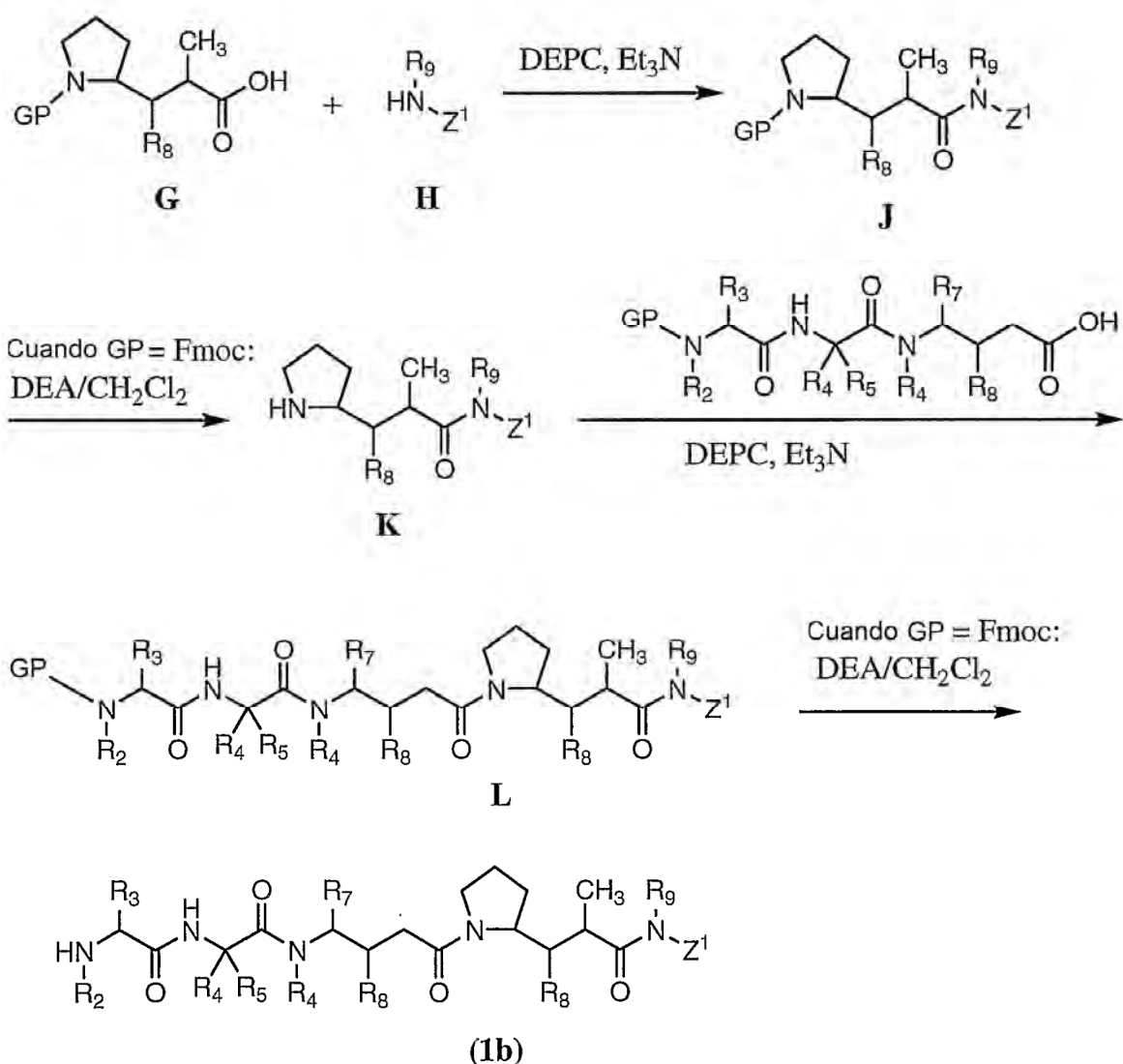
- El aminoácido **B** (1,0 eq.), que tiene opcionalmente un grupo protector de carboxilo, se diluye con un disolvente orgánico aprótico tal como diclorometano o DME para proporcionar una solución de una concentración de entre 0,5 y 1,0 mM, después, se añade diisopropiletilamina (1,5 eq.). Se añade aminoácido **A** protegido con Fmoc- o CBZ (1,1 eq.) en forma de un sólido en una porción, después, se añade PyBrop (1,2 eq.) a la mezcla resultante. La reacción se controla por TLC o HPLC, seguido de un procedimiento de tratamiento similar al descrito en el procedimiento general A.

30 Procedimiento general C: Eliminación de Z a través de hidrogenación catalítica

- Se diluye el aminoácido o péptido **C** protegido con CBZ con etanol para proporcionar una solución de una concentración de entre 0,5 y 1,0 mM en un recipiente adecuado, tal como un matraz de fondo redondo de pared gruesa. Se añade paladio al 10 % sobre carbón (5-10 % p/p) y la mezcla de reacción se coloca en una atmósfera de hidrógeno. El progreso de la reacción se vigila mediante HPLC y se completa generalmente en el plazo de 1 a 2 h. La mezcla de reacción se filtra a través de un lecho prelavado de Celite y el Celite se lava de nuevo con un disolvente orgánico polar, tal como metanol después de la filtración. La solución de eluyente se concentra al vacío para proporcionar un residuo que se diluye con un disolvente orgánico, preferentemente tolueno. El disolvente orgánico se retira después al vacío para proporcionar la amina desprotegida **C**.

- 40 El Esquema 6 muestra un método útil para la fabricación de un dipéptido C-terminal de fórmula **K** y un método para el acoplamiento del dipéptido de fórmula **K** con el tripéptido de fórmula **F** para fabricar compuestos de fármaco de Fórmula **Ib**. Este método es aplicable a los restos de reemplazo de fenilalanina **H** que tienen un grupo protector de carboxilo lábil en medio ácido, preferentemente el grupo oxibencilo.

Esquema 6



5 El dipéptido **K** puede prepararse fácilmente por condensación del aminoácido modificado N-protégido GP-Dolaproína (**G**) con una amina de fórmula **H** usando agentes de condensación bien conocidos en la química de péptidos, tales como, por ejemplo, DEPC en presencia de trietilamina, tal como se muestra en los Esquemas 5 y 6. Los grupos N-protégidos adecuados para Dolaproína incluyen, pero no se limitan a, un grupo protector Fmoc.

10 El dipéptido de fórmula **K** después puede acoplarse con un tripéptido de fórmula **F** usando el Procedimiento general D para hacer los compuestos de fármacos protegidos con Fmoc de fórmula **L** que posteriormente pueden desprotegerse usando el procedimiento general E a fin de proporcionar los compuestos de fármacos de fórmula **(1b)**.

Procedimiento general D: Síntesis de fármaco

15 Una mezcla de dipéptido **K** (1,0 eq.) y tripéptido **F** (1 eq.) se diluye con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano, para formar una solución 0,1 M, después, se añade un ácido fuerte, tal como ácido trifluoroacético (1/2 v/v) y la mezcla resultante se agita en una atmósfera de nitrógeno durante dos horas a 0 °C. La reacción puede controlarse usando TLC o, preferentemente, HPLC. El disolvente se retira al vacío y el residuo resultante se seca azeotrópicamente dos veces, preferentemente usando tolueno. El residuo resultante se seca a alto vacío durante 20 12 h y después se diluye con un disolvente orgánico aprótico, tal como diclorometano. Después, se añade una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiltilamina (1,5 eq.), seguida de PyBrop (1,2 eq.) o DEPC (1,2 eq.) dependiendo del grupo funcional del resto. La mezcla de reacción se controla por TLC o HPLC y tras la finalización, la reacción se somete a un procedimiento de tratamiento similar o idéntico al descrito en el procedimiento general A.

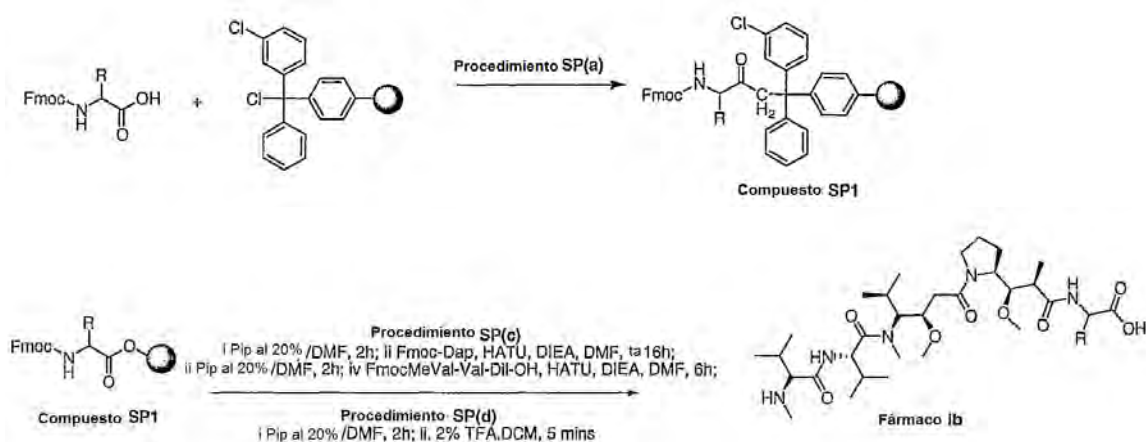


## Procedimiento General E: Eliminación de Fmoc usando dietilamina

Un fármaco **L** protegido con Fmoc se diluye con un disolvente orgánico aprótico tal como diclorometano y a la solución resultante se le añadió dietilamina (½ v/v). El progreso de la reacción se controla por TLC o HPLC y normalmente se completa en 2 h. La mezcla de reacción se concentra al vacío y el residuo resultante se seca azeotrópicamente, preferentemente con tolueno, después se seca a alto vacío para proporcionar fármaco **Ib** que tiene un grupo amino desprotegido. Por tanto, el método anterior es útil para fármacos que pueden usarse.

Como alternativa, pueden prepararse compuestos de fármaco convenientemente mediante síntesis de péptidos en fase sólida usando la química de Fmoc convencional bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, catálogo de Novabiochem® 2006/2007, Notas de síntesis) como se muestra en el Esquema 6 bis (a continuación). Pueden prepararse aminoácidos protegidos con Fmoc a partir de aminoácidos no protegidos usando, por ejemplo, Fmoc-OSu a través de procedimientos bien establecidos (véase, por ejemplo, Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Sintesis*, segunda edición, 1991, John Wiley & Sons, p. 506).

Esquema 6a. Vía de síntesis en fase sólida



Los aminoácidos no están disponibles en el mercado pre-cargados en una resina lábil en medio ácido apropiado, preferentemente resina de 2-clorotritilo, pueden cargarse en resina de cloruro de 2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(a). La carga puede determinarse mediante el ensayo de cuantificación de Fmoc espectrofotométrico. Los niveles de carga (mmol/g) de aminoácidos disponibles en el mercado pre-cargados en resina de clorotritilo pueden determinarse como se ha descrito en el Procedimiento general SP(b). Después, los péptidos entonces pueden ensamblarse en la resina cargada con el primer aminoácido mediante el acoplamiento de Fmoc-Dolaproína usando un agente de acoplamiento apropiado, preferentemente HATU/DIEA, seguido de desprotección de Fmoc y posterior acoplamiento de tripéptido Fmoc-MeVal-Val-Dil. La rutina de acoplamiento en fase sólida está bien establecida en la técnica y se describe en el Procedimiento General SP(c). La desprotección final de los péptidos y la escisión de la resina puede realizarse fácilmente siguiendo el Procedimiento General SP(d).

## Procedimiento General SP(a). Carga de la resina

Se suspende Fmoc-aminoácido (0,84°mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (4 ml) y DIEA (585 µl, 3,36°mmol, 4 equiv). La mezcla resultante se añade a una jeringa de 10 ml que contiene resina de cloruro de 2-Clorotritilo (500 mg, 0,70°mmol, 1,4°mmol/g). La mezcla se agita durante 6 horas a temperatura ambiente. Después, la resina se filtra, se lava con DCM/MeOH/DIEA (17:2:1; 5 ml, 4 veces), MeOH (5 ml, 1 vez), DCM (5 ml, 2 veces), DMF (5 ml, 2 veces), DCM (5 ml, 2 veces), éter etílico (5 ml, 4 veces) y se seca al vacío durante 2 h. La resina se deja al vacío durante la noche para producir resina **SP1**.

La carga se determina mediante la cuantificación de Fmoc. Una cantidad conocida de resina **SP1** (4,4 mg) se pesa en un matraz aforado de 10 ml. Al matraz se le transfiere piperidina al 20 %/DMF (2 ml). La mezcla se deja escindir durante 1 h, con agitación ocasional a mano. Al matraz se le transfiere DMF (8 ml) para llevar el volumen total a 10 ml. Se prepara una solución de blanco con 10 ml, piperidina al 20 %/DMF en un matraz aforado de 10 ml. El espectrofotómetro se pone a cero con la solución de blanco. La absorbancia se midió a 301 nm y el nivel de carga viene dado por:

$$\text{Carga (mmol/g)} = A_{301} \times 10 \text{ ml}/7800 \times \text{peso}$$

por la que  $A_{301}$  es la absorbancia a 301 nm, 7800 es el coeficiente de extinción del aducto de piperidina-fluorenona y

peso es el peso de la resina utilizada en miligramos. La cuantificación de Fmoc se realiza generalmente por duplicado.

Procedimiento General SP(b). Cuantificación de Fmoc de resinas pre-cargadas disponibles en el mercado

- 5 Se disuelve Fmoc-Cl (259 mg, 1°mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (2 ml) para hacer una solución de trabajo 0,5 M. Esta solución se transfiere a una jeringa de plástico de 3 ml que contiene resina de aminoácido-2-clorotritilo (0,86°mmol/g, 0,0215°mmol). La mezcla se agita durante 2 h. Después, la resina se filtra y se lava con DMF (5 ml, 2 veces), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml, 2 veces), éter etílico (5 ml, 2 veces) y se seca al vacío durante 2 h. La resina se somete al ensayo de amina de Kaiser. Tras los resultados negativos (amina libre totalmente protegida) se realiza la cuantificación de Fmoc para obtener un nivel de carga como se muestra en el Procedimiento General SP(a).

Procedimiento general SP(c). Acoplamiento de péptidos en fase sólida usando HATU

- 15 Una solución de piperidina al 20 % en DMF (5 ml) se añade a la jeringa que contiene resina **SP1**, y la mezcla se agita durante 2 h. Después la resina se filtra, se lava con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), éter etílico (5 ml, 4 veces) y se seca al vacío durante 2 h.

- 20 Se suspenden Fmoc-Dap (278 mg, 0,680°mmol) y HATU (259 mg, 0,680°mmol, 2 equiv.) en DMF anhidro (5 ml) y DIEA (237 µl, 1,36°mmol, 4 equiv.). La mezcla resultante se transfiere a la jeringa de plástico de 10 ml que contiene resina de H-aminoácido-2-clorotritilo (555,6 mg, 0,340°mmol). La mezcla se agita durante la noche, a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se determina mediante el ensayo de amina de Kaiser y el análisis por CLEM del material retirado por escisión de una pequeña cantidad de resina (usando TFA al 2 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Después se filtra la resina, se lava con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), éter etílico (5 ml, 4 veces) y se seca al vacío durante 2 h.

- 30 Una solución de piperidina al 20 % en DMF (5 ml) se añade a la jeringa que contiene resina de Fmoc-Dap-aminoácido-2-clorotritilo y la mezcla se agita durante 2 h. La resina se filtra, se lava con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), éter etílico (5 ml, 4 veces) y se seca al vacío durante 2 h.

- 35 Se suspenden Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH (510 mg, 0,680°mmol, 2 equiv.) y HATU (259 mg, 0,680°mmol, 2 equiv.) en DMF anhidro (5-ml) y DIEA (237 µl, 1,70°mmol, 5 equiv.). La mezcla resultante se transfiere a la jeringa de plástico de 10 ml que contiene la resina H-Dap-aminoácido-2-clorotritilo. La mezcla se agita durante 6 h. La finalización de la reacción se determina mediante análisis por CLEM del material retirado por escisión de una pequeña cantidad de resina (usando TFA al 2 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Después se filtra la resina, se lava con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), éter etílico (5 ml, 4 veces) y se seca al vacío durante 2 h.

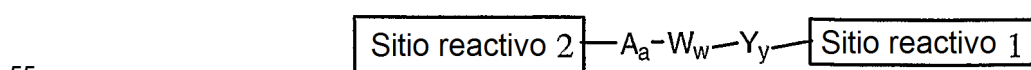
Procedimiento general SP(d). Desprotección final y escisión de la resina

- 40 Una solución de piperidina al 20 % en DMF (5 ml) se añade a la jeringa que contiene resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Aminoácido-2-clorotritilo y la mezcla se agita durante 2 h. La resina se filtra, se lava con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), éter etílico (5 ml, 4 veces) y se seca al vacío durante 2 h. El secado adicional puede lograrse, si es necesario, dejando la resina durante la noche al vacío.

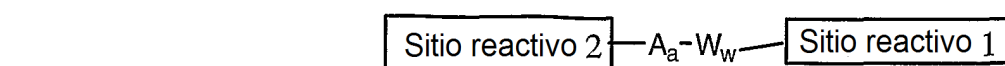
- 45 Una solución de TFA al 2 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) se transfiere a una jeringa de plástico de 10 ml que contiene resina de MeVal-Val-Dil-DAP-Aminoácido-2-clorotritilo y la mezcla se agita, a temperatura ambiente, durante 5 minutos. El filtrado se recoge en un matraz de fondo redondo de 100 ml. El proceso se repite tres veces. El filtrado se evapora para dejar un sólido de color blanco. Los péptidos **Ib** puede aislarse mediante HPLC preparativa.

## 50 Síntesis de fármaco-enlazador

Para preparar un compuesto de fármaco-enlazador, el fármaco se hace reaccionar con un sitio reactivo en el enlazador. En general, el enlazador puede tener la estructura:

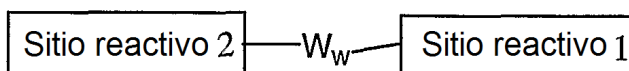


cuando tanto una unidad de espaciador (-Y-) como una unidad de extensor (-A-) están presentes. Como alternativa, el enlazador puede tener la estructura:



cuando la unidad de espaciador (-Y-) está ausente.

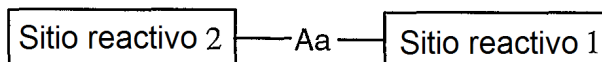
El enlazador también puede tener la estructura:



5

cuando tanto la unidad de extensor (-A-) como la unidad de espaciador (-Y-) están ausentes.

El enlazador también puede tener la estructura:



10

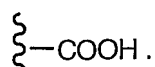
cuando tanto la unidad de aminoácido (W) como la unidad de espaciador (y) están ausentes.

15 En general, un enlazador adecuado tiene una unidad de aminoácido unida a una unidad de extensor opcional y una unidad de espaciador opcional. El sitio reactivo 1 está presente en el extremo del espaciador y el sitio reactivo 2 está presente en el extremo del extensor. Si una unidad de espaciador no está presente, entonces el sitio reactivo 1 está presente en el extremo C de la unidad de aminoácido.

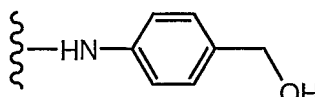
20 En una realización a modo de ejemplo, el sitio reactivo n.º 1 es reactivo a un átomo de nitrógeno del fármaco y el sitio reactivo n.º 2 es reactivo a un grupo sulfhidrilo del ligando. Los sitios reactivos 1 y 2 pueden ser reactivos a diferentes grupos funcionales.

En otra realización a modo de ejemplo, el sitio reactivo n.º 2 es reactivo a los grupos amino de las lisinas del ligando.

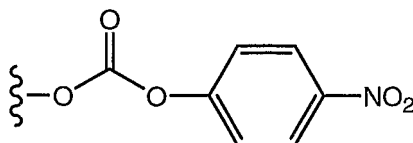
25 En un aspecto de la invención, el sitio reactivo n.º es



30 En otro aspecto, el sitio reactivo n.º 1 es

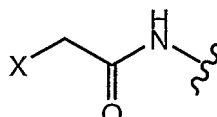


En otro aspecto el, el sitio reactivo n.º 1 es un carbonato de p-nitrofenilo que tiene la fórmula



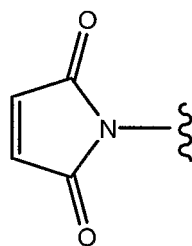
35

En un aspecto, el sitio reactivo n.º 2 es un grupo aceptor de tiol. Los grupos aceptores de tiol adecuados incluyen los grupos halo-acetamida que tienen la fórmula



40

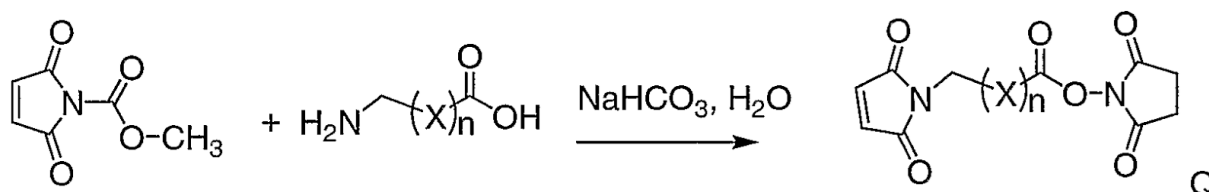
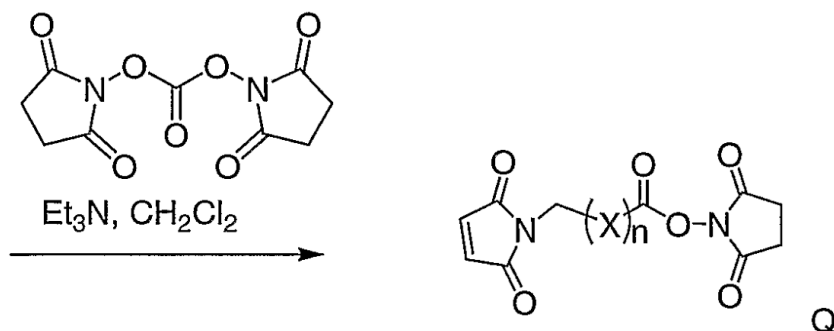
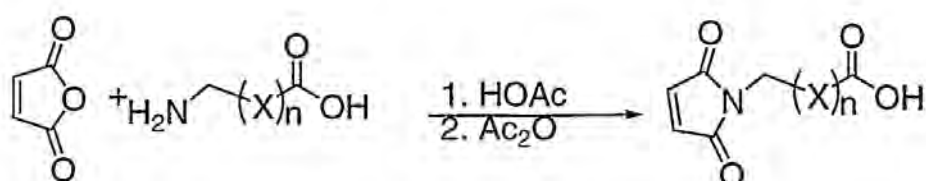
en la que X representa un grupo saliente, preferentemente O-mesilo, O-tosilo, -Cl, -Br o -I; o un grupo maleimida que tiene la fórmula



Pueden obtenerse enlazadores útiles a través de fuentes comerciales, tales como Molecular BioSciences Inc. (Boulder, CO) o pueden prepararse como se resume en los Esquemas 8-10 a continuación.

5

Esquema 8

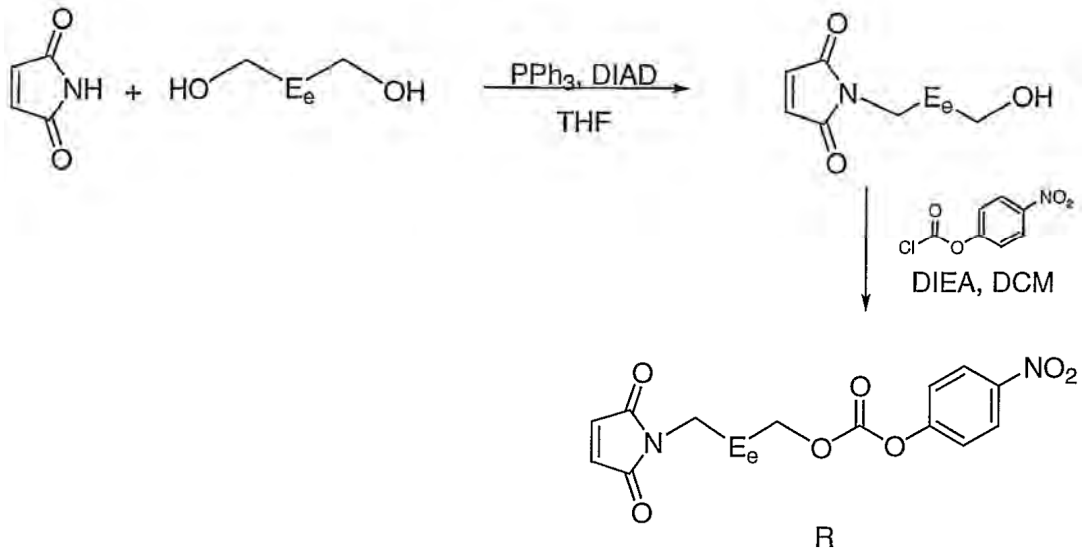


en el que X es  $-\text{CH}_2-$  o  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ ; y n es un número entero que varía ya sea de 0 a 10, cuando X es  $-\text{CH}_2-$ ; o de 1 a 10, cuando X es  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$ .

10

El método mostrado en el Esquema 9 combina maleimida con un glicol en condiciones de Mitsunobu para hacer un extensor de maleimida polietilenglicol (véase, por ejemplo, ejemplo, Walker, 1995, *J. Org. Chem.* 60, 5352-5), seguido de instalación de un grupo sitio reactivo de carbonato de p-nitrofenilo.

Esquema 9



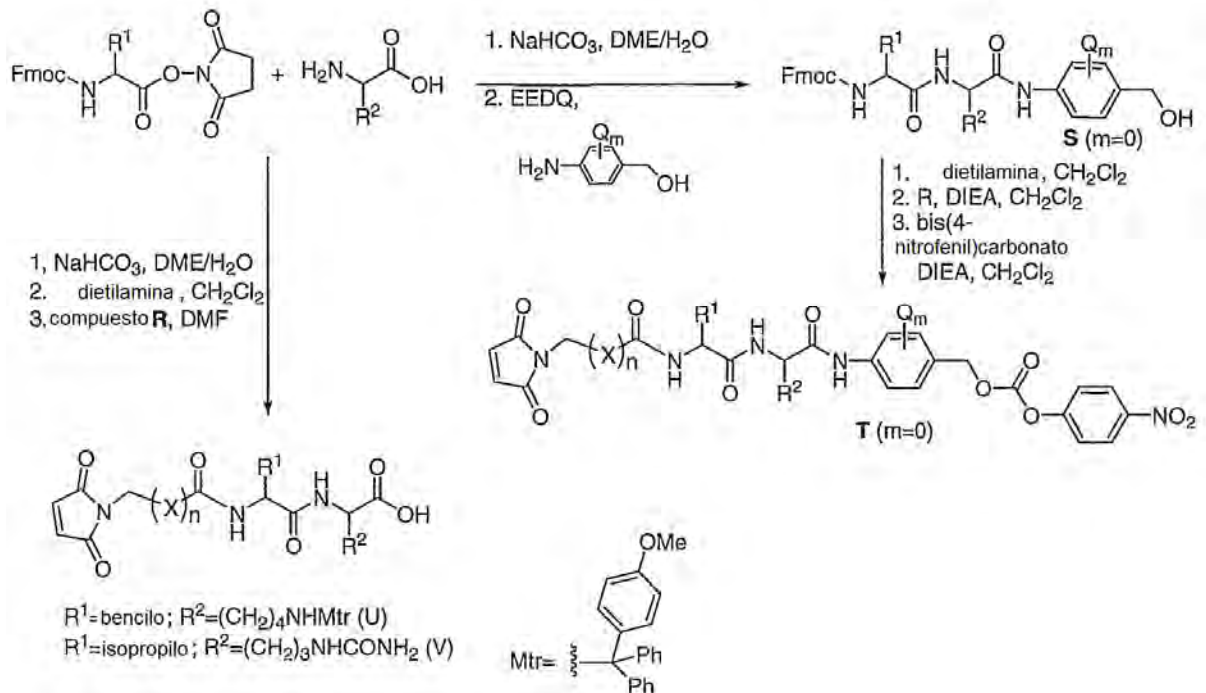
en el que E es -CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>-; y e es un número entero que varía de 0 a 8;

- 5 Como alternativa, pueden prepararse extensores de PEG-maleimida y PEG-haloacetamida como se describe por Frisch *et al.*, 1996, *Bioconjugate Chem.* 7: 180-186.

El esquema 10 ilustra una síntesis general de una unidad de enlazador ilustrativa que contiene un grupo extensor de maleimida y, opcionalmente, un espaciador autodestructivo de éter de p-aminobencilo.

10

Esquema 10

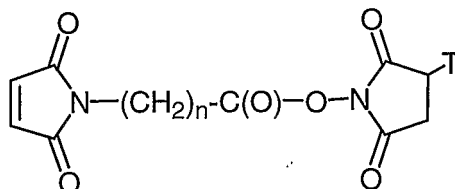


en el que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0 a 4; y n es un número entero que varía de 0 a 10.

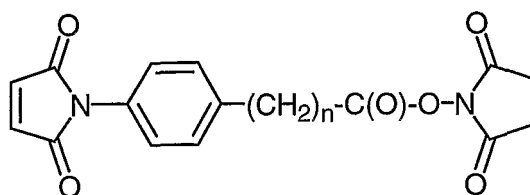
15

Pueden incorporarse extensores útiles en un enlazador usando los intermedios disponibles en el mercado de Molecular Biosciences (Boulder, CO) descritos a continuación mediante la utilización de técnicas conocidas de síntesis orgánica.

- 5 Los extensores de fórmula (IIIa) pueden introducirse en un enlazador haciendo reaccionar los siguientes intermedios con el extremo N de una unidad de aminoácido como se representa en los Esquemas 11 y 12:

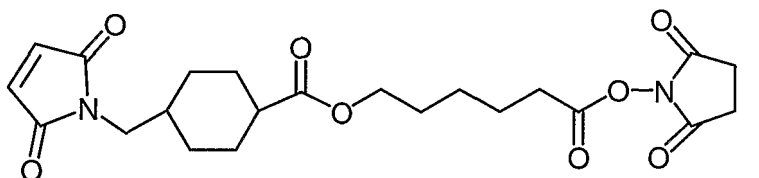
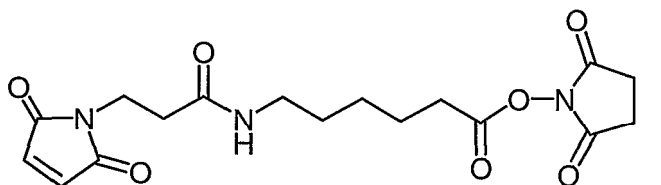
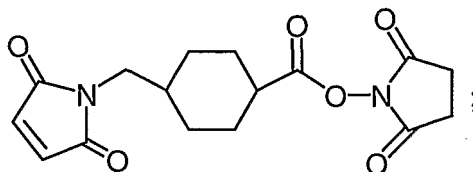


- 10 en la que n es un número entero que varía de 1 a 10 y T es -H o -SO<sub>3</sub>Na;

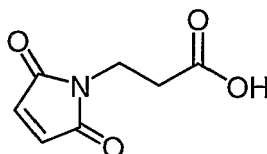


donde n es un número entero que varía de 0 a 3;

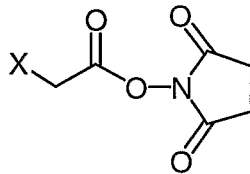
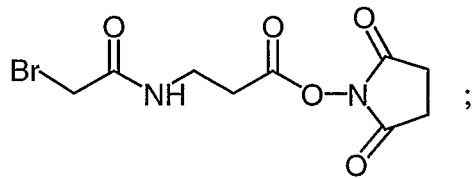
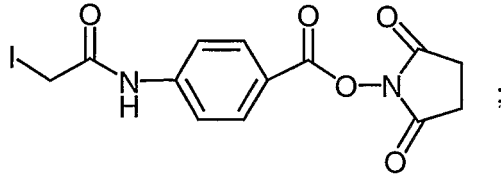
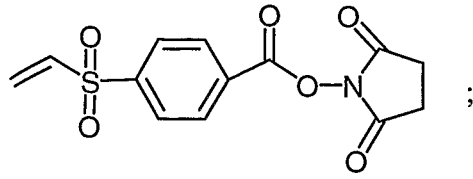
15



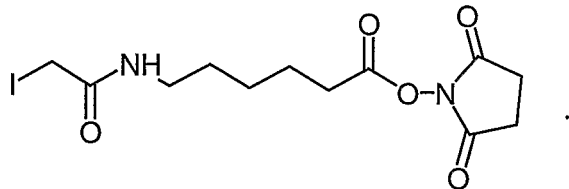
y



- 20 Las unidades de extensor de fórmula (IIIb) pueden introducirse en un enlazador haciendo reaccionar los siguientes intermedios con el extremo N de una unidad de aminoácido:

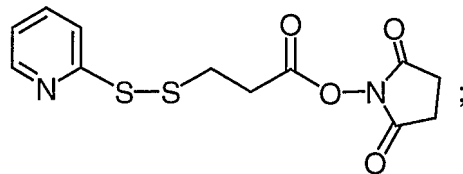


donde X es -Br o -I; y

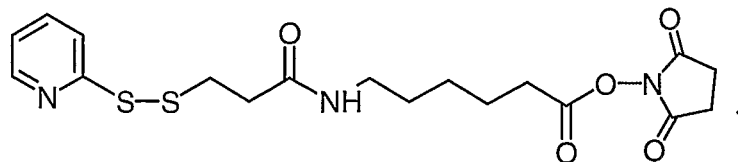


5

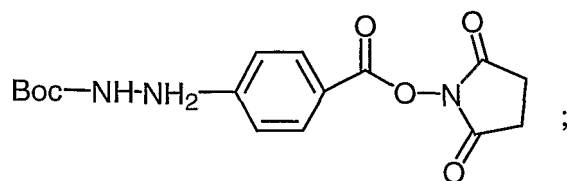
Pueden introducirse unidades de extensor de fórmula (IV) en un enlazador haciendo reaccionar los siguientes intermedios con el extremo N de una unidad de aminoácido:



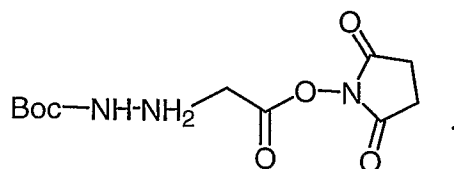
10 y



15 Pueden introducirse unidades de extensor de fórmula (Va) en un enlazador haciendo reaccionar los siguientes intermedios con el extremo N de una unidad de aminoácido:



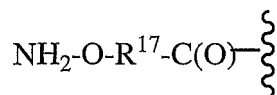
y



5

Otros extensores útiles pueden sintetizarse de acuerdo con procedimientos conocidos. Pueden prepararse extensores de aminooxi de la fórmula que se muestra a continuación mediante el tratamiento de haluros de alquilo con N-Boc-hidroxilamina de acuerdo con los procedimientos descritos en Jones *et al.*, 2000, *Tetrahedron Letters* 41 (10): 1531-1533; y Gilon *et al.*, 1967, *Tetrahedron* 23(11): 4441-4447.

10

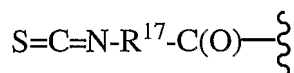


en la que -R<sup>17</sup>- se selecciona entre -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -arileno-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, -arilen-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>-, heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-, (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-; y r es un número entero que varía de 1 a 10;

15

Los extensores de isotiocianato de la fórmula que se muestra a continuación pueden prepararse a partir de cloruros del ácido isotiocianatocarboxílico como se describe en *Angew. Chem.*, 87(14): 517 (1975).

20



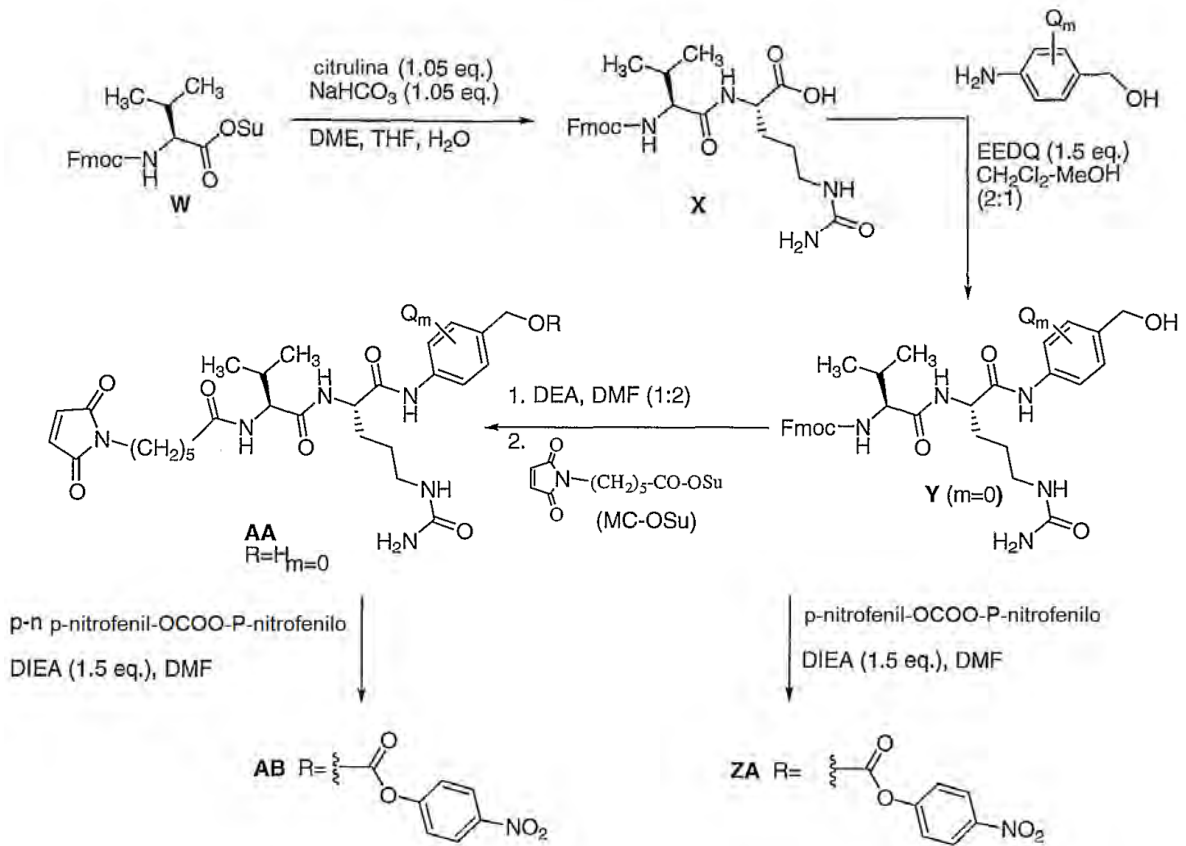
en la que -R<sup>17</sup>- es como se describe en el presente documento.

25

El esquema 11 muestra un método para obtener de un enlazador de dipéptido val-cit que tiene un extensor de maleimida y, opcionalmente, un espaciador autodestructivo de p-aminobenzóilo.



Esquema 11

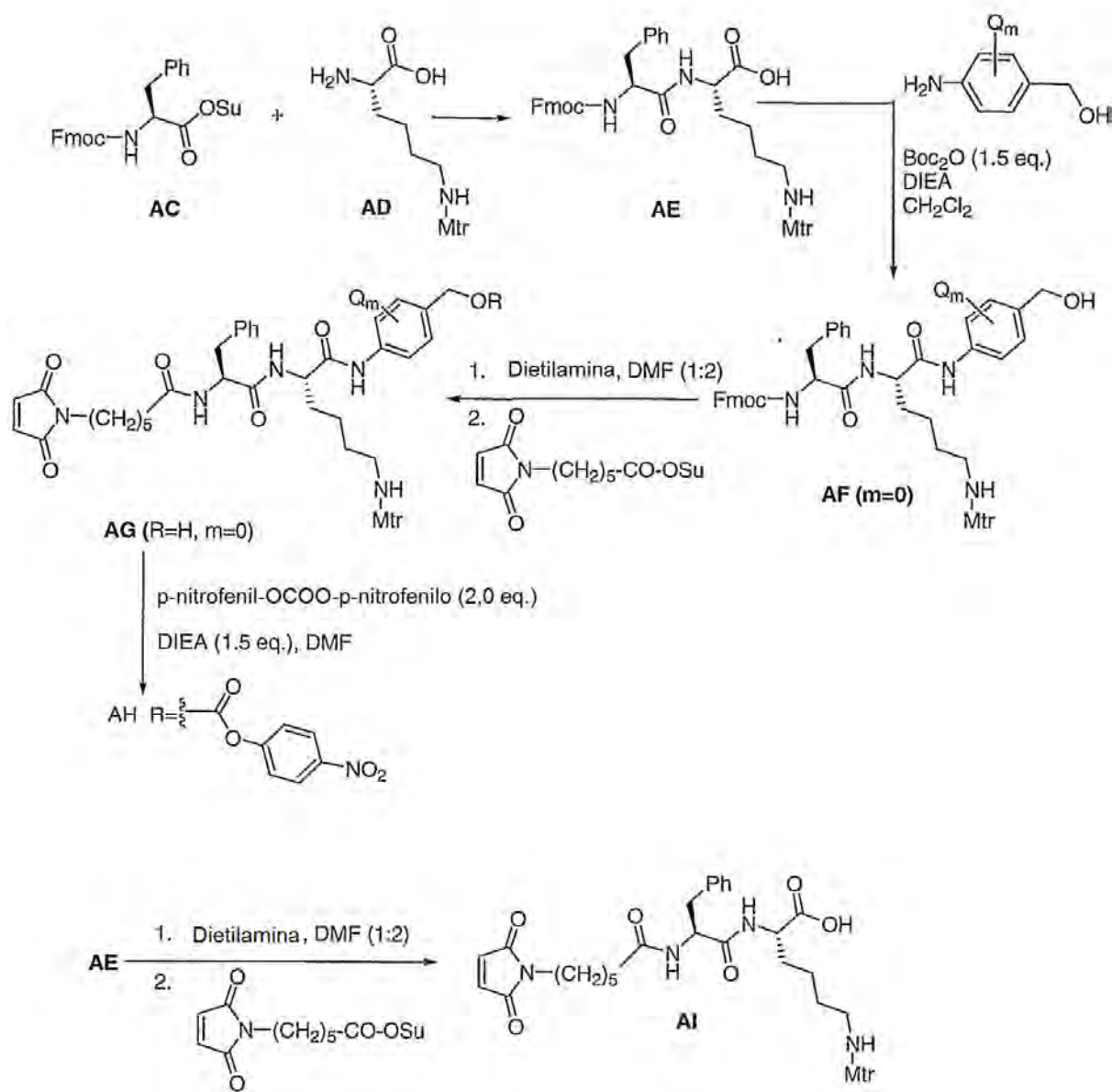


en la que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4.

5 El esquema 12 ilustra la síntesis de una unidad de enlazador de dipéptido phe-lys(Mtr) que tiene una unidad de extensor de maleimida y una unidad de espaciador autodestructiva de p-aminobencilo. El material de partida AD (Lys(MTR)) está disponible en el mercado (Bachem, Torrance, CA) o puede prepararse de acuerdo con Dubowchik, *et al.*, 1997 *Tetrahedron Letters* 38: 5257-60.

10

## Esquema 12



en el que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4.

5

Como se muestra en el Esquema 13, un enlazador puede hacerse reaccionar con un grupo amino de un compuesto de fármaco de fórmula (Ib) para formar un compuesto de fármaco-enlazador que contenga un grupo amida o carbamato, que une la unidad de fármaco a la unidad de enlazador. Cuando el sitio reactivo n.º 1 es un grupo de ácido carboxílico, como en el enlazador **AJ**, la reacción de acoplamiento puede realizarse usando HATU o PyBrop y una base de amina apropiada, dando como resultado un compuesto de fármaco-enlazador **AK**, que contiene un enlace amida entre la unidad de fármacos y la unidad de enlazador. Cuando el sitio reactivo n.º 1 es un carbonato, como en el enlazador **AL**, el enlazador puede acoplarse al fármaco usando HOBt en una mezcla de DMF/piridina para proporcionar un compuesto de fármaco-enlazador **AM**, que contiene un enlace carbamato entre la unidad de Fármaco y la unidad de enlazador.

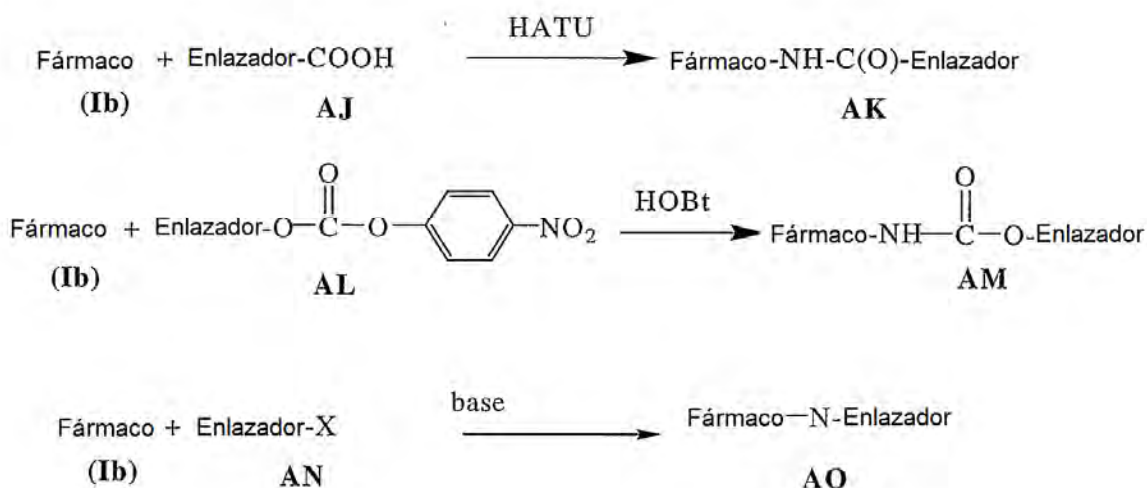
15

Como alternativa, cuando el sitio reactivo n.º 1 es un buen grupo saliente, tal como en enlazador **AN**, el enlazador puede acoplarse con un grupo amino de un fármaco a través de un proceso de sustitución nucleófila para proporcionar un compuesto de fármaco-enlazador que tiene un enlace de amina (**AO**) entre la unidad de fármaco y la unidad de Enlazador.

20

Se representan métodos ilustrativos útiles para enlazar un fármaco a un ligando para formar un compuesto de fármaco-enlazador, en el Esquema 13 y se esbozan en los procedimientos generales de G-H.

Esquema 13



5

Procedimiento general G: Formación de amida usando HATU

Un fármaco (**Ib**) (1,0 eq.) y un enlazador N-protegido que contiene un sitio reactivo de ácido carboxílico (1,0 eq.) se diluyen con un disolvente orgánico adecuado, tal como diclorometano y la solución resultante se trata con HATU (1,5 eq.) y una base orgánica, preferentemente piridina (1,5 eq.). La mezcla de reacción se deja en agitación en una atmósfera inerte, preferentemente de argón, durante 6 horas, durante cuyo tiempo la mezcla de reacción se controla usando HPLC. La mezcla de reacción se concentra y el residuo resultante se purificó usando HPLC para producir la amida de fórmula **AK**.

10

15 Procedimiento H: Formación de carbamato usando HOBt

Una mezcla de un enlazador **AL** que tiene un sitio reactivo de carbonato de p-nitrofenilo (1,1 eq.) y fármaco (**Ib**) (1,0 eq.) se diluyen con un disolvente orgánico aprótico, tal como DMF, para proporcionar una solución que tiene una concentración de 50-100 mM y la solución resultante se trata con HOBt (0,2 eq.) y se coloca en una atmósfera inerte, preferentemente de argón. La mezcla de reacción se deja en agitación durante 15 min, después, una base orgánica, tal como piridina (1/4 v/v), se añade y el progreso de reacción se controla usando HPLC. El enlazador se consume normalmente en el plazo de 16 h. La mezcla de reacción se concentra al vacío y el residuo resultante se purifica usando, por ejemplo, HPLC para proporcionar el carbamato **AM**.

20

25 Procedimiento General S: Formación de enlace de amida entre el enlazador y el fármaco

Un enlazador que contiene ácido carboxílico (30 mg) y anhido DMF (10  $\mu$ l) se coloca en una atmósfera inerte, preferentemente de argón, y se enfría en hielo seco durante aproximadamente 5 min. A esta mezcla se le añade cloruro de oxalilo (1 ml) gota a gota mediante una jeringa. Normalmente, después de unos minutos, la mezcla se deja calentar a temperatura ambiente y se deja durante 30 min con agitación manual ocasional. Los productos volátiles se retiran a presión reducida. El residuo se vuelve a suspender en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhido (1 ml) y el disolvente se retira al vacío. El residuo se seca durante la noche en bomba de vacío para producir enlazador **AN**.

30

El cloruro de acilo **AN** se suspende en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhido (3 ml). Un fármaco **Ib** (0,006 mmol) y *N,N*-diisopropil-etilamina (4  $\mu$ l, ~4 eq.) se suspenden en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhido (100  $\mu$ l) y la mezcla se enfría en el baño de hielo normalmente durante aproximadamente 10 min. A esta mezcla, se le añaden 150  $\mu$ l de cloruro de acilo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (~1,1 eq.) mediante una jeringa. Después de 15 min en hielo, la mezcla de reacción se deja calentar hasta temperatura ambiente y la agitación continuó durante aproximadamente 2 horas más. El progreso de la reacción puede monitorizarse mediante RP-HPLC. Después, el disolvente entonces se retira al vacío. El residuo se suspende en DMSO (0,5 ml). Se añadió agua (100  $\mu$ l) y después de 0,5 h la mezcla se purifica, por ejemplo, usando HPLC preparativa para producir fármaco-enlazador **AO**.

35

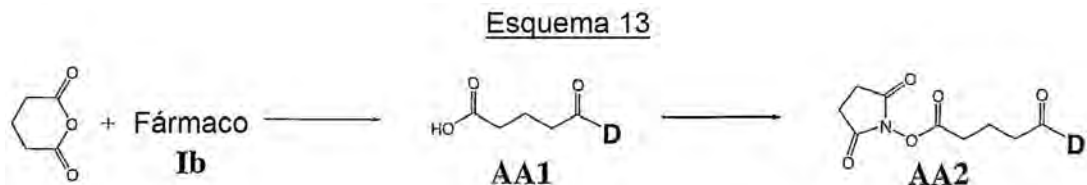
40

Procedimiento General T: preparación de enlazador-fármaco de éster de N-hidroxisuccinimida

45 El esquema 13a representa un ejemplo de preparación de compuestos de fármaco-enlazador **AA2** que contienen

ésteres de N-hidroxisuccinimida a través de la formación de enlaces amida entre una unidad de fármaco y un enlazador. Este procedimiento es particularmente útil para las unidades de fármacos que no contienen un grupo carboxílico libre o para fármacos que tienen un grupo carboxílico protegido como ésteres lábiles en medio ácido, preferentemente un éster de dimetoxibencilo.

5



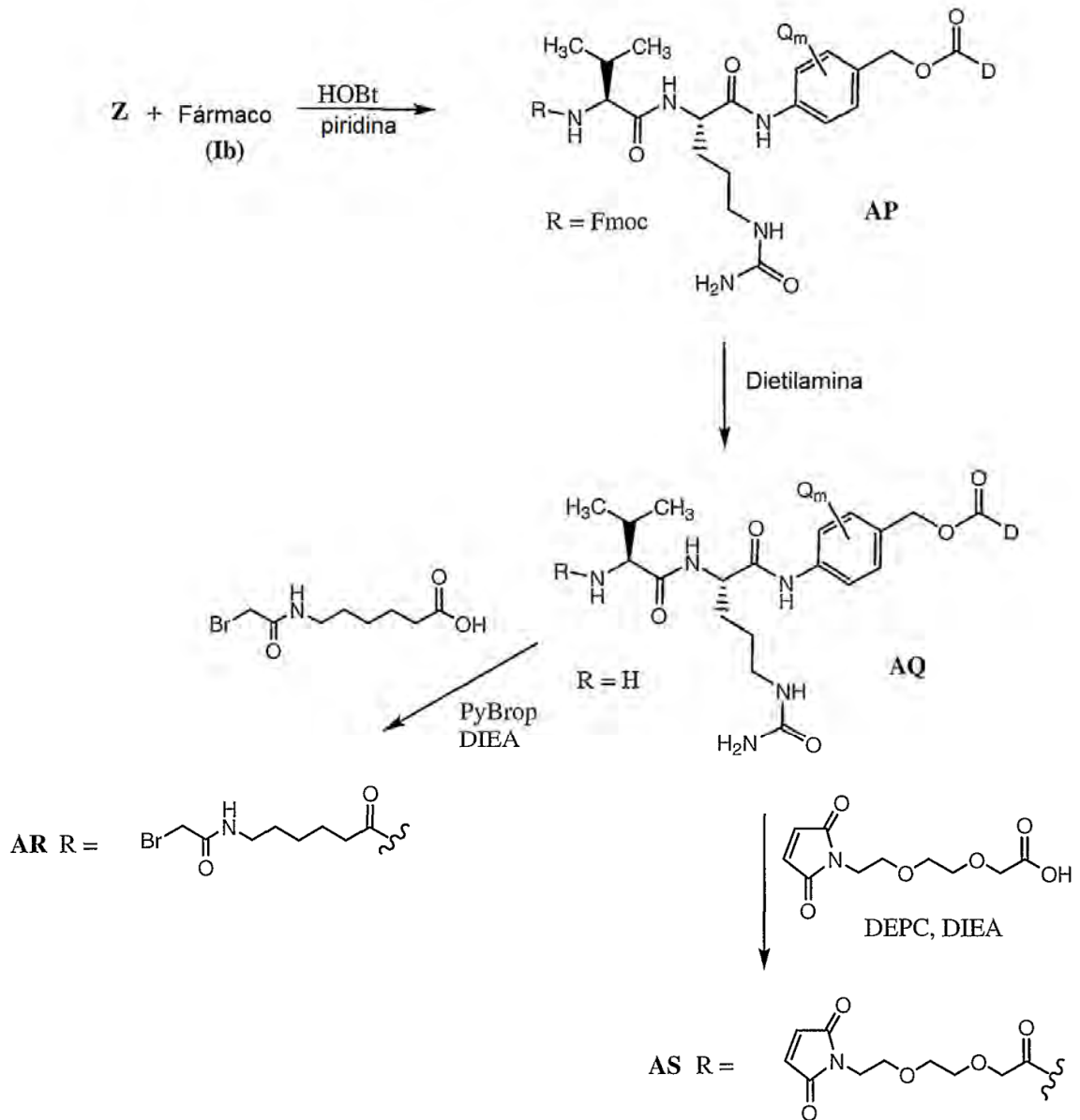
Se diluyen fármaco (**Ib**) (1,0 eq.) y un anhídrido cíclico adecuado, preferentemente anhídrido glutárico (1,0 eq.), con un disolvente orgánico adecuado, tal como diclorometano y la solución resultante se trata con una base orgánica, preferentemente DIEA (3 eq.). Se deja la mezcla de reacción en agitación en una atmósfera inerte, preferentemente de argón, durante 24 horas, tiempo durante el cual la mezcla de reacción se controla usando HPLC. El producto de reacción **AA1** se aísla usando cromatografía de ultrarrápida sobre gel de sílice. El material **AA1** secado al vacío y carbonato de N,N'-disuccinimidilo (3 eq.) se diluyen con un disolvente orgánico adecuado, tal como diclorometano y la solución resultante se trata con una base orgánica, preferentemente DIEA (3 eq.). Se deja la mezcla de reacción en agitación en una atmósfera inerte, preferentemente de argón, durante 24 horas, tiempo durante el cual la mezcla de reacción se controla usando HPLC. El producto de reacción **AA2** se aísla mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice. Si es necesario, el grupo protector de ácido del fármaco-enlazador **AA2** puede retirarse ahora mediante el tratamiento adecuado, preferentemente con TFA al 1 % en diclorometano para proporcionar éster de dimetoxibencilo.

20

Un método alternativo de preparación de compuestos de fármaco-enlazador se esboza en el Esquema 14. Usando el método del Esquema 14, el fármaco se une a una unidad de enlazador parcial (**ZA**, por ejemplo), que no tiene una unidad de extensor unida. Esto proporciona intermedio **AP**, que tiene una unidad de aminoácido que tiene un extremo N protegido con Fmoc. El grupo Fmoc después se retira y el intermedio de amina **AQ** resultante se une después a una unidad de extensor a través de una reacción de acoplamiento catalizada usando PyBrop o DEPC. La construcción de los compuestos fármaco-enlazador que contienen o bien un extensor de bromoacetamida **AR** o un extensor de PEG maleimida **AS** como se ilustra en el Esquema 14.

25

**Esquema 14**

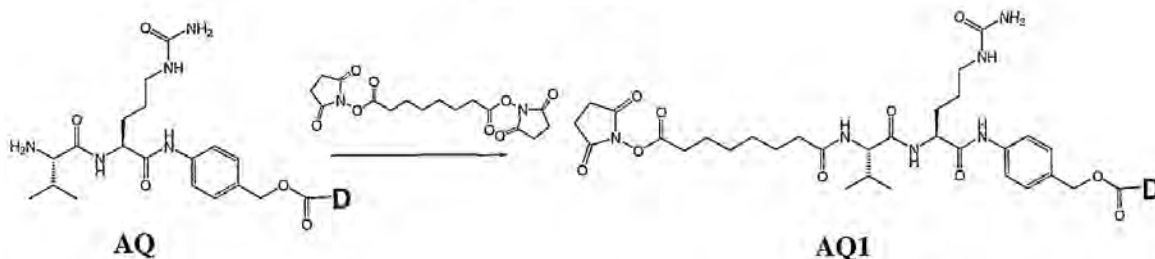


en la que Q es -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4.

5

La aplicación de esta estrategia general para la preparación de enlazador-fármaco de éster de N-hidroxisuccinimida reactivo a lisinas se representa en el Esquema 14a.

Esquema 14a



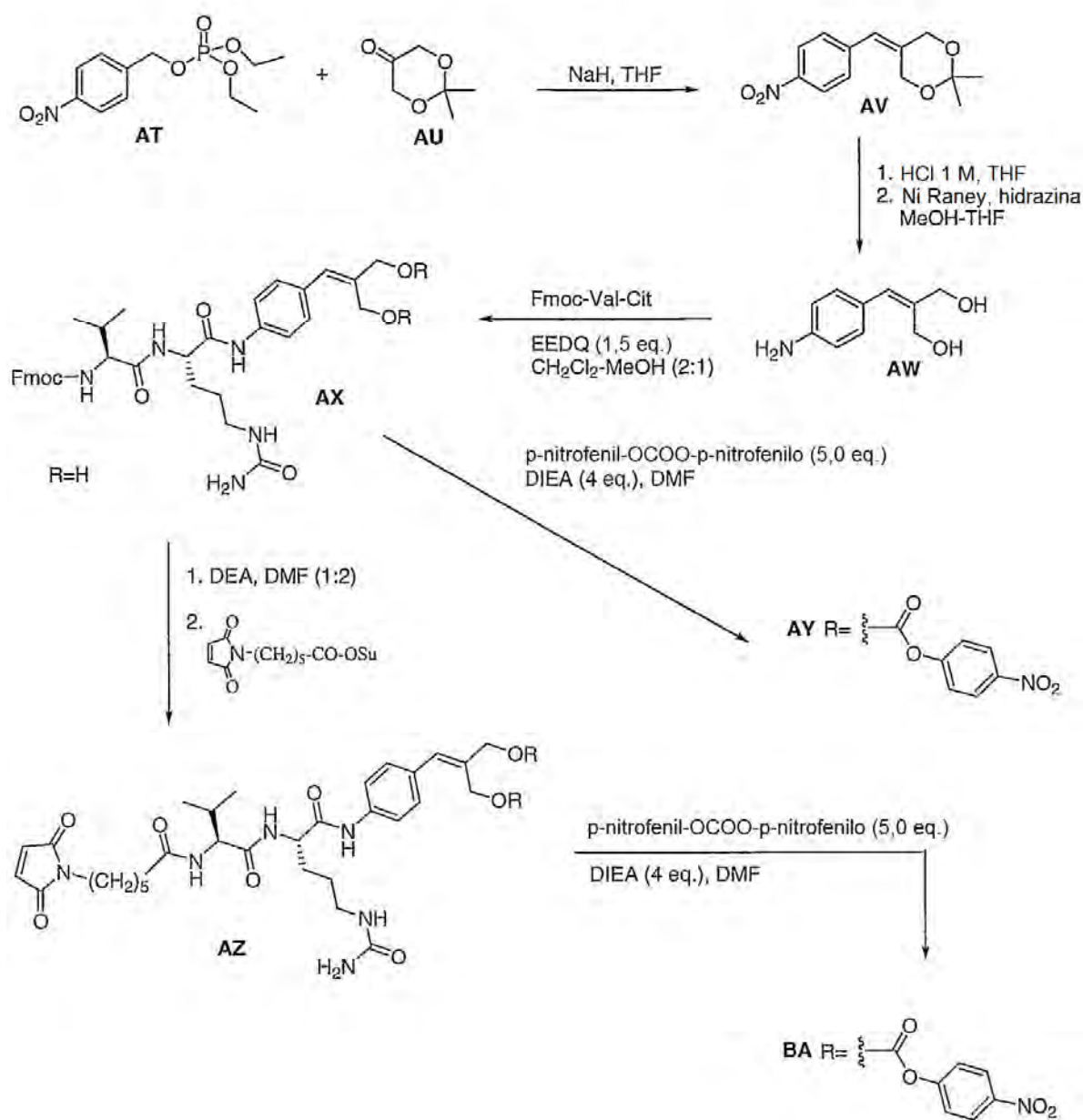
## Procedimiento General U

## 5 Método alternativo de preparación de enlazador-fármaco de éster de N-hidroxisuccinimida

El intermedio **AQ** (1 eq.) se suspende en piridina y esta mezcla se añade gota a gota a la suspensión de suberato de disuccinimidilo (5 eq) en piridina. Después, la mezcla de reacción se deja en agitación en una atmósfera inerte, preferentemente de argón, durante aproximadamente 4 h, tiempo durante el cual el progreso de la reacción se controla usando HPLC. Después, la piridina se retira al vacío, el residuo se suspende en un disolvente orgánico adecuado, tal como diclorometano y el fármaco-enlazador **AQ1** se aísla usando cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice. Si es necesario, el grupo protector de carboxilo del fármaco puede retirarse ahora mediante el tratamiento adecuado, preferentemente con TFA al 1 % en diclorometano para proporcionar éster de dimetoxibencilo.

- 10
- 15 La metodología útil para la preparación de una unidad de enlazador que contiene un espaciador ramificado se muestra en el Esquema 15.

## Esquema 15



El esquema 15 ilustra la síntesis de un enlazador de dipéptido val-cit que tiene una unidad de extensor de maleimida y una unidad de bis(4-hidroximetil)estireno (BHMS). La síntesis del intermedio de BHMS (**AW**) se ha mejorado a partir de los procedimientos anteriores (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional WO 98/13059 de Firestone *et al.* y Crozet *et al.*, 1985, *Tetrahedron Lett.* 26: 5133-5134) y utiliza como materiales de partida, (4-nitrobenzyl)fosfonato de dietilo (**AT**) disponible en el mercado y 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ona (**AU**) disponible en el mercado. Los enlazadores **AY** y **BA** pueden prepararse a partir del intermedio **AW** usando la metodología descrita en el Esquema 9.

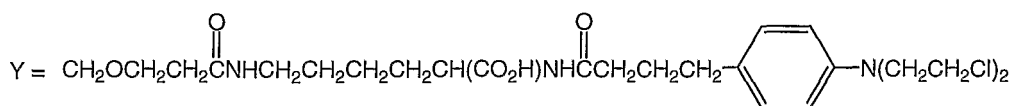
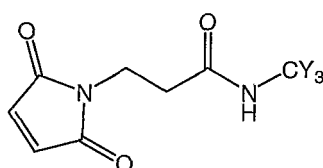
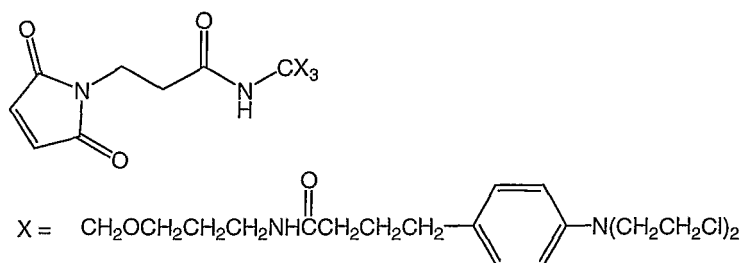
### Enlazadores dendríticos

El enlazador puede ser un enlazador de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto de fármaco a través de un resto enlazador multifuncional ramificado, a un ligando, tal como, pero no limitado a un anticuerpo (véase, por ejemplo, Sun *et al.*, 2002, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12: 2213-2215; Sun *et al.*, 2003, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11: 1761-1768). Los enlazadores dendríticos pueden aumentar la relación molar de fármaco a anticuerpo, es decir, la carga, que se relaciona con la potencia del conjugado fármaco-enlazador-ligando. Por tanto, cuando un anticuerpo modificado por ingeniería genética con cisteína soporta un solo grupo

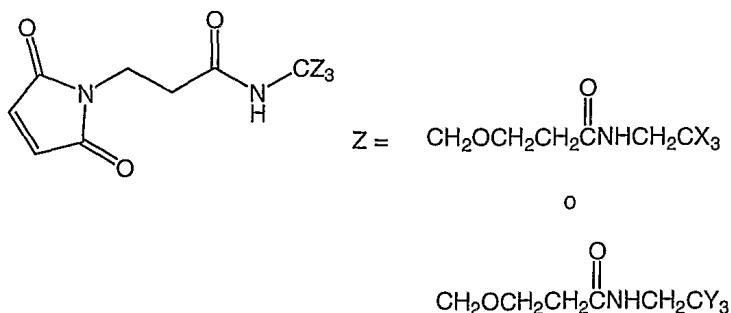
cisteína tiol reactivo, una multitud de restos de fármaco pueden unirse a través de un enlazador dendrítico.

Las siguientes realizaciones a modo de ejemplo de reactivos enlazadores dendríticos permiten que hasta nueve reactivos de resto de fármaco nucleófilo se conjuguen por reacción con los grupos funcionales cloroetil mostaza nitrogenada:

5



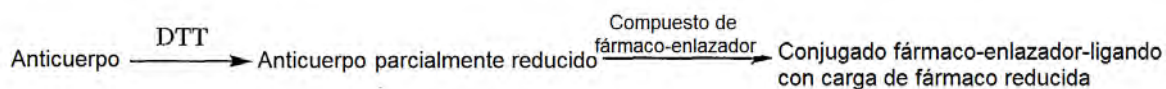
10



### Conjugación de restos de fármaco a anticuerpos

- 15 El esquema 16 ilustra la metodología útil para hacer conjugados de fármaco-enlazador-ligando que tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo. Un anticuerpo se trata con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) para reducir algunos o todos los residuos de disulfuro de cisteína para formar grupos tiol de cisteína altamente nucleófilos (-CH<sub>2</sub>SH). Por tanto, el anticuerpo parcialmente reducido reacciona con los compuestos de fármaco-enlazador, o reactivos enlazadores, con grupos funcionales electrófilos tales como maleimida o α-halo carbonilo, de acuerdo con el método de conjugación de la página 766 de Klussman *et al.*, 2004, *Bioconjugate Chemistry* 15 (4): 765-773.
- 20

Esquema 16



- 25 Por ejemplo, un anticuerpo, por ejemplo, AC10, disuelto en borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0 se trata con un exceso de ditioneitol 100 mM (DTT). Después de la incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambia por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. El valor de tior/Ab se comprueba determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tior mediante la reacción con DTNB (Aldrich,



Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido se disuelve en PBS y se enfría en hielo. El enlazador de fármaco, por ejemplo, MC-val-cit-PAB-MMAZ en DMSO, disuelto en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, se añade al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para interrumpir la reacción y proteger con caperuza cualesquier grupos tiol de anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra por ultrafiltración centrífuga y el CAF, por ejemplo, AC10-MC-vc-PAB-MMAZ, se purifica y desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µM en condiciones estériles y se congela para su almacenamiento.

Puede prepararse diversos conjugados de anticuerpo fármaco (CAF), con diversos enlazadores y los restos de fármaco, MMAZ siguiendo los protocolos de los Ejemplos y caracterizados mediante HPLC y ensayo de carga de fármaco.

### Composiciones y métodos de administración

En otras realizaciones, se describe una composición que incluye una cantidad eficaz de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por comodidad, las unidades de fármaco y los compuestos de fármaco-enlazador pueden denominarse compuestos a modo de ejemplo, mientras que los conjugados fármaco-ligando y los conjugados fármaco-enlazador-ligando pueden denominarse conjugados a modo de ejemplo. Las composiciones son adecuadas para la administración veterinaria o humana.

Las presentes composiciones pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las vías típicas de administración incluyen, sin limitación, la oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular, intratumoral e intranasal. La administración parenteral incluye las inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, la inyección intraesternal o las técnicas de infusión. En un aspecto, las composiciones se administran por vía parenteral. En otro aspecto más, los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados o composiciones a modo de ejemplo se administran por vía intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera que permitan que un compuesto a modo de ejemplo y/o un conjugado a modo de ejemplo estén biodisponible tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación individual y un recipiente de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.

Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser atóxicos en las cantidades utilizadas. Será evidente para los expertos en la materia que la dosis óptima del principio o principios activos en la composición farmacéutica dependerá de diversos factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, un ser humano), la forma particular del compuesto a modo de ejemplo o conjugado a modo de ejemplo, la forma de administración y la composición empleadas.

El excipiente o vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser partículas, de manera que las composiciones son, por ejemplo, en forma de comprimidos o polvo. El vehículo o vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o líquido inyectable. Además, el vehículo o vehículos pueden ser gaseosos o partículas, a fin de proporcionar una composición de aerosol útil en, por ejemplo, la administración por inhalación.

Cuando se destina a la administración oral, la composición está preferentemente en forma sólida o líquida, donde las formas semi-sólidas, semi-líquidas, de suspensión y de gel se incluyen dentro de las formas consideradas en el presente documento como sólidas o líquidas.

Como composición sólida para la administración oral, la composición puede formularse en forma de polvo, gránulo, comprimido, píldora, cápsula, chicle, oblea o similar. Una composición sólida de este tipo contiene normalmente uno o más diluyentes inertes. Además, uno o más de los siguientes pueden estar presentes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido alginico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; sustancias de deslizamiento tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja y un agente colorante.

Cuando la composición está en forma de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.

La composición puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser útil para la administración oral o para la entrega por inyección. Cuando se destina a la

administración oral, una composición puede comprender uno o más de un agente edulcorante, conservantes, un tinte/colorante y un potenciador del sabor. En una composición para la administración por inyección, también pueden incluirse uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

5 Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, también puede incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabeno de metilo; 10 antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición parenteral puede incluirse en una ampolla, una jeringa desechable o un vial de múltiples dosis hechos de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un 15 adyuvante a modo de ejemplo. Una composición inyectable es preferentemente estéril.

La cantidad del compuesto de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o condición particular dependerá de la naturaleza del trastorno o condición y puede ser determinada por la norma técnicas clínicas. Además, se pueden emplear ensayos *in vitro* o *in vivo* opcionalmente para ayudar a 20 identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en las composiciones también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo de manera que se obtendrá una dosificación adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos 25 aproximadamente el 0,01 % de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo en peso de la composición. Cuando se destinan a la administración oral, esta cantidad puede variarse en el intervalo de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 80 % en peso de la composición. En un aspecto, las 30 composiciones orales pueden comprender de aproximadamente el 4 % a aproximadamente el 50 % del compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo en peso de la composición. En otro aspecto más, las composiciones presentes se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contiene de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 2 % en peso del compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo.

35 Para la administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo por kg de peso corporal del animal. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo por kg de peso corporal del animal. En otro 40 aspecto, la cantidad administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal del compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo.

Generalmente, la dosificación de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo administrada a un paciente es normalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg de peso corporal 45 del animal. En un aspecto, la dosificación administrada a un paciente es de entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del animal, en otro aspecto, la dosificación administrada a un paciente es de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal del animal, en otro aspecto más, la dosificación administrada a un paciente es de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y 50 aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal del animal, en otro aspecto, la dosis administrada es de entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del animal y en otro aspecto más, la dosis administrada es de entre aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del animal.

Los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo o composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos 55 epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. Se conocen diversos sistemas de liberación, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc. y pueden usarse para administrar un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo o composición. En ciertas realizaciones, se administra a un paciente más de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo o composición.

60 En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo o composiciones localmente a la zona que necesita tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo y no a modo de limitación, por infusión local durante la cirugía; aplicación tópica, por ejemplo, en conjunción con un apósito para heridas después de la cirugía; por inyección; por medio de un catéter; por medio 65 de un supositorio; o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo las membranas, tales como las membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración

puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o preneoplásico. En otra realización, la administración puede ser por inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmune.

5 En ciertas realizaciones, puede ser deseable introducir uno o más compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo o composiciones en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya.

10 La administración pulmonar también puede emplearse, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente de aerosolización o por medio de perfusión en un fluorocarbono o tensioactivo pulmonar sintético.

15 En otra realización más, los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo o composiciones pueden suministrarse en un sistema de liberación controlada, tal como, pero no limitado a, una bomba, o pueden usarse diversos materiales poliméricos. En otra realización más, un sistema de liberación controlada puede colocarse en la proximidad de la diana de los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo o composiciones, por ejemplo, el cerebro, necesitando de este modo solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, *Goodson Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Pueden usarse otros sistemas de liberación controlada analizados en la revisión de Langer (*Science* 249: 1527-1533 (1990)).

25 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que se administra un compuesto a modo de ejemplo y/o un conjugado a modo de ejemplo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, animales, vegetales o sintéticos, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos pueden ser solución salina, goma arábica, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, pueden usarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una realización, cuando se administra a un paciente, el compuesto a modo de ejemplo y/o el conjugado a modo de ejemplo o composiciones y los vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo a modo de ejemplo, cuando los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo se administran por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas también pueden emplearse como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes tamponantes del pH.

40 Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizaciones, suspensiones o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" de E.W. Martin.

45 En una realización, los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo se formulan de acuerdo con procedimientos sistemáticos en forma de una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a animales, en particular seres humanos. Normalmente, los excipientes o vehículos para la administración intravenosa son soluciones tampón acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para la administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados juntos en formas de dosificación unitarias, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado en seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o sobre que indique la cantidad de agente activo. Cuando un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo se administre por infusión, puede dosificarse, por ejemplo, con una botella de infusión que contenga agua de calidad farmacéutica o solución salina estériles. Cuando el compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo se administran por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua para inyección o de solución salina estériles para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

60 Las composiciones para la administración oral pueden estar en forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes aromatizantes tales como menta, aceite de gaulteria o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente agradable al paladar. Además, cuando están en forma de comprimido o píldora, las composiciones pueden recubrirse para retardar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal

proporcionando de este modo una acción sostenida durante un periodo prolongado de tiempo. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto accionador osmóticamente activo también son adecuadas para los compuestos administrados por vía oral. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea la cápsula es absorbido por el compuesto accionador, que se hincha para desplazar el agente o composición de agente a través de una abertura. Estas plataformas de administración pueden proporcionar un perfil de liberación esencialmente de orden cero en oposición a los perfiles de pico de las formulaciones de liberación inmediata. También puede usarse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol.

Las composiciones pueden estar destinadas a la administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede ser en forma de una base de solución, emulsión, pomada o gel. Si está destinada a la administración transdérmica, la composición puede estar en forma de un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden comprender una concentración de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 50 % p/v (peso por unidad de volumen de la composición), en otro aspecto, del 0,1 % al 10 % p/v.

La composición puede estar destinada a la administración rectal, en forma, por ejemplo, de un supositorio que se fundirá en el recto y liberará el compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo.

La composición puede incluir diversos materiales que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que formen una cubierta de recubrimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la cubierta de recubrimiento son normalmente inertes y pueden seleccionarse entre, por ejemplo, azúcar, goma laca y otros agentes de recubrimiento entérico. Como alternativa, los principios activos pueden encapsularse en una cápsula de gelatina.

Las composiciones pueden consistir en unidades de dosificación gaseosas, por ejemplo, pueden estar en forma de un aerosol. El término aerosol se usa para indicar diversos sistemas que varía de aquellos de naturaleza coloidal a los sistemas que consisten en paquetes presurizados. La liberación puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bombeo adecuado que dosifica los principios activos.

Ya sea en forma sólida, líquida o gaseosa, las presentes composiciones puede incluir un agente farmacológico utilizado en el tratamiento del cáncer, de una enfermedad autoinmune o de una enfermedad infecciosa.

#### **Usos terapéuticos de los conjugados a modo de ejemplo**

Los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo son útiles para el tratamiento del cáncer, de una enfermedad autoinmune o de una enfermedad infecciosa en un paciente.

#### **Tratamiento del cáncer**

Los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, provocando la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa o para tratar el cáncer en un paciente. Los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo pueden usarse, en consecuencia, en diversas configuraciones para el tratamiento de los cánceres animales. Los conjugados fármaco-enlazador-ligando pueden usarse para suministrar una unidad de fármaco o fármacos a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin quedar ligado por teoría alguna, en una realización, la unidad de ligando de un conjugado a modo de ejemplo se une o se asocia a un antígeno asociado a células cancerosas o células tumorales, y el conjugado a modo de ejemplo puede captarse (interiorizarse) dentro de una célula tumoral o célula cancerosa a través de endocitosis mediada por receptor. El antígeno puede estar unido a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de la matriz extracelular asociada a la célula tumoral o célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias específicas de péptido dentro de la unidad de enlazador se escinden hidrolíticamente por una o más proteasas asociadas a células tumorales o células cancerosas, dando como resultado la liberación de un fármaco o un compuesto de fármaco-enlazador. El fármaco o un compuesto de fármaco-enlazador liberado está entonces libre para migrar dentro de la célula e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. El conjugado de fármaco-enlazador-ligando también puede ser escindido por la proteasa intracelular para liberar el resto de fármaco, el compuesto de fármaco-enlazador, y/o un fragmento activo del conjugado fármaco-enlazador-ligando (por ejemplo, cistilo-enlazador-fármaco). En una realización alternativa, el fármaco o la unidad de fármaco se escinde del conjugado a modo de ejemplo fuera de la célula tumoral o la célula cancerosa, y el fármaco o compuesto de fármaco-enlazador posteriormente penetra en la célula. En una realización alternativa, el fármaco o unidad de fármaco se escinde del conjugado a modo de ejemplo fuera de la célula tumoral o la célula cancerosa y el fármaco o compuesto de fármaco-enlazador posteriormente penetra en la célula.

En una realización, la unidad de ligando se une a la célula tumoral o célula cancerosa.

En otra realización, la unidad de ligando se une a un antígeno de célula tumoral o célula cancerosa que está en la superficie de la célula tumoral o célula cancerosa.

En otra realización, la unidad de ligando se une a un antígeno de célula tumoral o célula cancerosa que es una proteína de la matriz extracelular asociada a la célula tumoral o la célula cancerosa.

La especificidad de la unidad de ligando para una célula tumoral o célula cancerosa particular puede ser importante para la determinación de los tumores o cánceres que se tratan con mayor eficacia. Por ejemplo, los conjugados a modo de ejemplo que tienen una unidad de ligando BR96 pueden ser útiles para el tratamiento de carcinomas positivos a antígenos incluyendo los de pulmón, mama, colon, ovarios y páncreas. Los conjugados a modo de ejemplo que tienen una unidad de ligando anti-CD30 o anti-CD40 pueden ser útiles para el tratamiento de neoplasias malignas hemáticas.

Otros tipos particulares de cánceres que pueden tratarse con conjugados a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los que se describen en la Tabla 1:

#### TABLA 1

Los tumores sólidos, incluyendo pero no limitados a:

fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer óseo, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer testicular, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, cánceres transmitidas por la sangre, incluyendo, pero no limitados a:

leucemia aguda linfoblástica "LAL", leucemia de células B linfoblástica aguda, leucemia de linfocitos T linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda "LMA", leucemia promielocítica aguda "LPA", leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia indiferenciada aguda, leucemia mielóide crónica "LMC", leucemia linfocítica crónica "LLC", leucemia de células pilosas, mieloma múltiple

leucemias agudas y crónicas:

leucemias linfoblástica, mielóide, linfoide, mielocítica

Linfomas:

enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de cadena pesada, Policitemia vera

Los conjugados a modo de ejemplo proporcionan conjugación orientada al tumor o cáncer específico, lo que reduce la toxicidad general de estos compuestos. Las unidades de enlazador estabilizan los conjugados a modo de ejemplo en la sangre, sin embargo, son escindibles por proteasas específicas del tumor dentro de la célula, liberando un fármaco.

#### **Terapia multi-modalidad para el cáncer**

Los cánceres, incluyendo, pero no limitados a, un tumor, metástasis u otra enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado, puede tratarse o prevenirse mediante la administración de un conjugado a modo de ejemplo y/o un compuesto a modo de ejemplo.

En otras realizaciones, se proporcionan métodos para tratar o prevenir el cáncer, incluyendo la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de un ejemplo de conjugado y un agente quimioterápico. En una realización, el agente quimioterápico es aquel con el que se ha descubierto que el tratamiento del cáncer no es refractario. En otra realización, el agente quimioterápico es aquel con el que se ha descubierto que el tratamiento del cáncer es refractario. Los conjugados a modo de ejemplo pueden administrarse a un paciente que también ha sido sometido a cirugía como tratamiento para el cáncer.

En alguna realización, el paciente también recibe un tratamiento adicional, tal como la radioterapia. En una realización específica, el conjugado a modo de ejemplo se administra simultáneamente con el agente quimioterápico o con radioterapia. En otra realización específica, el agente quimioterápico o la radioterapia se administran antes o después de la administración de un conjugado a modo de ejemplo, en un aspecto al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, en otros aspectos varios meses (por ejemplo, hasta tres meses) antes o después de la administración de un conjugado a modo de ejemplo.

Un agente quimioterápico pueden administrarse a lo largo de una serie de sesiones. Puede administrarse uno cualquiera o una combinación de los agentes quimioterápicos enumerados en la Tabla 4. Con respecto a la radiación, puede usarse cualquier protocolo de radioterapia dependiendo del tipo de cáncer que se trate. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, puede administrarse radiación de rayos x; en particular, megavoltaje de alta energía (radiación de más de 1 MeV de energía) para tumores profundos, y pueden usarse haz de electrones y radiación de rayos X de ortovoltaje para cánceres de piel. También pueden administrarse radioisótopos emisores de rayos gamma, tales como isótopos radiactivos de radio, cobalto y otros elementos.

De forma adicional, se proporcionan métodos de tratamiento del cáncer con un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo como una alternativa a la quimioterapia o la radioterapia donde la quimioterapia o la radioterapia han demostrado ser o pueden resultar ser demasiado tóxicas, por ejemplo, dando como resultado efectos secundarios inaceptables o intolerables, para el sujeto que se trata. El animal que se trata puede, opcionalmente, tratarse con otro tratamiento para el cáncer tal como cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo de qué tratamiento se encuentre que es aceptable o tolerable.

Los compuestos a modo de ejemplo y/o conjugados a modo de ejemplo también puede usarse de forma *in vitro* o *ex vivo*, tal como para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, incluyendo, pero no limitados a, leucemias y linfomas, implicando dicho tratamiento los trasplantes de células madre autólogas. Esto puede implicar un proceso de múltiples etapas en el que las células madre hematopoyéticas autólogas del animal se recogen y se purgan de todas las células de cáncer, la población restante de células de médula ósea del animal se erradica después a través de la administración de una alta dosis de un compuesto a modo de ejemplo y/o conjugado a modo de ejemplo con o sin acompañamiento de radioterapia de alta dosis y el injerto de células madre se infunde de nuevo en el animal. Después, se proporciona cuidado de apoyo, mientras que la función de la médula ósea se restaura y el animal se recupera.

#### Terapia para el cáncer con múltiples fármacos

Los métodos para tratar el cáncer incluyen la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de un conjugado a modo de ejemplo y otro agente terapéutico que es un agente antineoplásico. Un "agente antineoplásico" o un "agente quimioterápico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer.

Los agentes antineoplásicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, taxol, L-asparaginasa, mercaptopurina, tioguanina, hidroxurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, topotecán, mostazas nitrogenadas, Cytosan, etopósido, 5-fluorouracilo, BCNU, irinotecán, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorubicina, dactinomomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel.

Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida CYTOXAN®; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfaán, pipsulfán y treosulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretarnina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolomelamina; TLK 286 (TELCYTA™); acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachona; lapachol; colchicina; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina, crisnatol; y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; esponjistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; triazinas, tales como dacarbazina; bifosfonatos, tales como clodronato; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omega 1 (véase, por ejemplo, Agnew, 1994, *Chem. Intl. Ed. Engl.* 33:183-186) y antraciclina tales como anamicina, AD 32, alcarrubicina, daunorubicina, dexrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarrubicina, pirarrubicina, zorubicina, mitoxantrona, KRN5500, menogarilo, dinemicina, incluyendo dinemicina A, un esperamicina, cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina de cromoproteína relacionados, aclacinomisinas, actinomomicina, autramicina, bleomicinas (por ejemplo, A2 o B2), cactinomomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomomicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicin, doxorubicina liposomal y desoxidoxorubicina), EICAR, esorrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, ribavirina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tiazofurina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorubicina; análogos de ácido fólico tales como denopterina, pteropterina y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, citoarabinósido, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina y fludarabina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol,

mepitostano y testolactona; anti-suprarrenales tales como aminoglucetimidina, mitotano y trilostano; relleno de ácido fólico tales como ácido folínico (leucovorina); aceglatona; agentes antineoplásicos anti-folato tales como ALIMTA®, pemetrexed LY231514, inhibidores de la dihidrofolato reductasa como metotrexato y trimetrexato, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU) y sus profármacos tales como UFT, S-1 y capecitabina y los inhibidores de la timidilato sintasa e inhibidores de glicinamida ribonucleótido formiltransferasa tales como raltitrexed (TOMUDEX<sup>M</sup>, TDX); inhibidores de la deshidrogenasa de dihidropirimidina tal como eniluracilo; glucósido de aldofosfomida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; defereoxamina; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente la toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitósina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfomida; tiotepa; taxoides y taxanos, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncología, Princeton, NJ), ABRAXANE<sup>TM</sup> sin Cremophor, formulación de paclitaxel de nanopartículas de albúmina modificada por ingeniería genética (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; análogos de platino o análogos a base de platino, como el cisplatino, oxaliplatino; platino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); etopósido (VP-16); ifosfomida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); vinblastina; vindesina; vinorelbina; alcaloides de la vinca, vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatraxato; daunomicina; aminopterina; Xeloda; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); Inhibidores de MDR tales como verapamilo; retinoides tales como ácido retinoico; inhibidores del ciclo celular, tales como estaurosporina; lovastatina; REVLIMID (lenalidomida); THALAMI (talidomida); VELADE (bortezomib); sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfomida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura de una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN<sup>TM</sup>) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en la presente definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como los anti-estrógenos y los moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FARESTON®; inhibidores de la aromataza que inhiben la enzima aromataza, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales citadas anteriormente, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglucetimidina, megestrol, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestano, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, anastrozol ARIMIDEX®; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida (por ejemplo, acetato de leuprolida) y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como las vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; PROLEUKIN® RIL-2; LURTOTECAN® inhibidor de la topoisomerasa 1; ABARELIX® rmRH; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la presente definición análogos de la vitamina D3, tales como EB 1089, CB 1093 y KH 1060; y terapias fotodinámicas, tales como vertoporfirina (BPD-MA), ftalocianina, fotosensibilizador Pc4, desmetoxihipocrelina A y 2BA-2-DMHA.

#### Tratamiento de enfermedades autoinmunes

Los conjugados a modo de ejemplo son útiles para destruir o inhibir la replicación de una célula que produce una enfermedad autoinmune o para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. Los conjugados a modo de ejemplo pueden usarse, en consecuencia, en diversas configuraciones para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un paciente. Los conjugados de fármaco-enlazador-ligando pueden usarse para suministrar un fármaco a una célula diana. Sin quedar ligado por teoría alguna, en una realización, los conjugados fármaco-enlazador-ligando asociados a un antígeno en la superficie de una célula diana, y el conjugado a modo de ejemplo se recoge después dentro de una célula diana a través de endocitosis mediada por receptor. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias específicas de péptidos dentro de la unidad de enlazador se escinden enzimáticamente o hidrolíticamente, dando como resultado la liberación de un fármaco. Después, el fármaco liberado queda libre para migrar en el citosol e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. El conjugado fármaco-enlazador-ligando también puede escindirse por una proteasa intracelular para liberar el resto de fármaco, el compuesto fármaco-enlazador y/o un fragmento activo del conjugado fármaco-enlazador-ligando (por ejemplo, cistilo-enlazador-fármaco). En una realización alternativa, el fármaco se escinde del conjugado a modo de ejemplo fuera de la célula diana y posteriormente el fármaco penetra en la célula.

En una realización, la unidad de ligando se une a un antígeno autoinmune. En un aspecto, el antígeno está sobre la superficie de una célula implicada en una afección autoinmune.

5 En otra realización, la unidad de ligando se une a un antígeno autoinmune que está sobre la superficie de una célula.

En una realización, el ligando se une a los linfocitos activados que se asocian a la patología autoinmune.

10 En una realización adicional, los conjugados a modo de ejemplo destruyen o inhiben la multiplicación de células que producen un anticuerpo autoinmune asociado a una enfermedad autoinmune en particular.

15 Los tipos particulares de enfermedades autoinmunes que pueden tratarse con los conjugados a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, trastornos relacionados con linfocitos Th2 (por ejemplo, dermatitis atópica, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica y enfermedad injerto contra hospedador); trastornos relacionados con linfocitos Th1 (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjorgren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener y tuberculosis); trastornos relacionados con linfocitos B activados (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes de tipo I); y los desvelados en la Tabla 3.

TABLA 3

25 Hepatitis crónica activa, enfermedad de Addison, alveolitis alérgica, reacción alérgica, rinitis alérgica, síndrome de Alport, anafilaxia, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, artritis, ascariasis, aspergilosis, alergia atópica, dermatitis atópica, rinitis atópica, enfermedad de Behcet, pulmón de Bird-Fancier, asma bronquial, síndrome de Caplan, miocardiopatía, enfermedad celiaca, enfermedad de Chagas, glomerulonefritis crónica, síndrome de Cogan, enfermedad por crioglobulinas, infección por rubéola congénita, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, crioglobulinemia, Síndrome de Cushing, dermatomiositis, lupus discoide, síndrome de Dressler, síndrome de Lambert-Eaton, infección por Ecovirus, encefalomiелitis, oftalmopatía endocrina, infección por virus de Epstein-Barr, náuseas equinas, eritematosis, síndrome de Evan, síndrome de Felty, fibromialgia, ciclitis de Fuch, atrofia gástrica, alergia gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedad de Graves, enfermedad de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch Schonlein, atrofia suprarrenal idiopática, fibritis pulmonar idiopática, nefropatía por IgA, enfermedades inflamatorias del intestino, diabetes mellitus insulino-dependiente, artritis juvenil, diabetes mellitus juvenil (tipo I), síndrome de Lambert-Eaton, laminitis, liquen plano, hepatitis lupoide, lupus, linfopenia, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, síndromes poliglandulares, demencia presenil, agamaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, aborto recurrente, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, síndrome de Sampter, esquistosomiasis, esclerodermia, síndrome de Sjorgen, síndrome de Shulman, síndrome de Schmidt, síndrome del hombre rígido, oftalmía simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, artritis temporal, tiroiditis, trombocitopenia, tirotoxicosis, necrólisis epidérmica tóxica, resistencia a la insulina de tipo B, diabetes mellitus de tipo I, colitis ulcerosa, uveítis, vitiligo, macroglobulinemia de Waldenstrom, granulomatosis de Wegener.

**Terapia de enfermedades autoinmunes con múltiples fármacos**

45 También se desvelan métodos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, incluyendo la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de un conjugado a modo de ejemplo y otro agente terapéutico conocido para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En una realización, el agente contra la enfermedad anti-autoinmune incluye, pero no se limita a, los agentes enumerados en la Tabla 4.

Tabla 4

55 ciclosporina, ciclosporina A, micofenolato de mofetilo, sirolimus, tacrolimus, enanercept, prednisona, azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, prednisona, ácido aminocaproico, cloroquina, hidroxiclороquina, hidrocortisona, dexametasona, clorambucilo, DHEA, danazol, bromocriptina, meloxicam, infliximab

**Tratamiento de enfermedades infecciosas**

60 Los conjugados a modo de ejemplo son útiles para destruir o inhibir la multiplicación de una célula que produce una enfermedad infecciosa o para tratar una enfermedad infecciosa. Los conjugados a modo de ejemplo pueden usarse, en consecuencia, en diversas configuraciones para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente. Los conjugados fármaco-enlazador-ligando pueden usarse para suministrar un fármaco a una célula diana. En una realización, la unidad de ligando se une a la célula de la enfermedad infecciosa.

65 En una realización, los conjugados destruyen o inhiben la multiplicación de células que producen una enfermedad infecciosa particular.



Los tipos particulares de enfermedades infecciosas que pueden tratarse con los conjugados a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los desvelados en la Tabla 5.

TABLA 5

- 5 Enfermedades bacterianas:  
 difteria, tosferina, bacteriemia oculta, infección del tracto urinario, gastroenteritis, celulitis, epiglotitis, traqueitis, hipertrofia de la adenoides, absceso retrofaringeo, impétigo, ectima, neumonía, endocarditis, artritis séptica, neumococos, peritonitis, bacteriemia, meningitis, meningitis purulenta aguda, uretritis, cervicitis, proctitis, faringitis, salpingitis, epididimitis, gonorrea, sífilis, listeriosis, ántrax, nocardiosis, salmonella, fiebre tifoidea,
- 10 disentería, conjuntivitis, sinusitis, brucelosis, tularemia, cólera, peste bubónica, tétanos, enteritis necrotizante, actinomicosis, infecciones anaerobias mixtas, sífilis, fiebre recurrente, leptospirosis, enfermedad de Lyme, fiebre por mordedura de rata, tuberculosis, linfadenitis, lepra, clamidia, neumonía por clamidia, tracoma, conjuntivitis por inclusión
- Enfermedades fúngicas sistémicas:  
 15 Histoplasmosis, coccidioidomycosis, blastomicosis, esporotricosis, criptococosis, candidiasis sistémica, aspergilosis, mucormycosis, micetoma, cromomicosis
- Enfermedades por Rickettsias:  
 Tifus, rickettsiosis exantemática, ehrlichiosis, rickettsiosis transmitida por garrapatas orientales, rickettsiosis pustulosa, fiebre Q, bartonelosis
- 20 Enfermedades parasitarias:  
 Malaria, babesiosis, enfermedad del sueño africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, fiebre Dum-Dum, toxoplasmosis, meningoencefalitis, queratitis, entamebiasis, giardiasis, criptosporidiasis, isosporiasis, ciclosporiasis, microsporidiosis, ascariasis, infección por tricuros, infección por anquilostoma, infección por nematodos, larva migratoria ocular, triquinosis, dracunculosis, filariasis linfática, loiasis, oncocercosis, infección canina por *Dirofilaria immitis*, esquistosomiasis, cercariosis cutánea, infección por *Paragonimus westermanii*, infección por *Clonorchis sinensis*, fascioliasis, fasciolopsiasis, opistorquiasis, infecciones por tenia, hidatidosis, hidatidosis alveolar
- 25 Enfermedades virales:  
 Sarampión, panencefalitis esclerosante subaguda, resfriado común, paperas, rubeola, roseola, eritema infeccioso, varicela, infección por virus sincitial respiratorio, crup, bronquiolitis, mononucleosis infecciosa, poliomielititis, herpangina, fiebre aftosa, enfermedad de Bornholm, herpes genital, verrugas genitales, meningitis aséptica, miocarditis, pericarditis, gastroenteritis, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), síndrome de Reye, síndrome de Kawasaki, gripe, bronquitis, neumonía errante viral, enfermedad respiratoria febril aguda, fiebre faringoconjuntival aguda, queratoconjuntivitis epidémica, virus del herpes simple 1 (HSV-1), virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2), herpes zóster, citomegalovirus, rabia, leucoencefalopatía multifocal progresiva, Kuru, insomnio letal familiar, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, paraparesia espástica tropical, encefalitis equina occidental, encefalitis de California, encefalitis de San Luis, fiebre amarilla, dengue, coriomeningitis linfocítica, fiebre de Lassa, fiebre hemorrágica, síndrome pulmonar por Hantavirus, infecciones por virus de Marburgo, infecciones por virus del Ébola, viruela
- 30  
35  
40

**Terapia de enfermedades infecciosas con múltiples fármacos**

- 45 Se desvelan métodos para el tratamiento de una enfermedad infecciosa incluyendo la administración a un paciente que lo necesita un conjugado a modo de ejemplo y otro agente terapéutico que es un agente anti-enfermedad infecciosa. En una realización, el agente anti-enfermedad infecciosa es, pero no se limita a, agentes enumerados en la Tabla 6.

TABLA 6

- 50 Antibióticos β-lactámicos:  
 Penicilina G, penicilina V, Cloxacilina, dicloxacilina, metilina, nafcilina, oxacilina, ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, azlocilina, carbenicilina, mezlocilina, piperacilina, ticarcilina
- Aminoglucósidos:  
 Amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina
- 55 Macrólidos:  
 Azitromicina, claritromicina eritromicina, lincomicina, clindamicina
- Tetraciclinas:  
 Demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina
- Quinolonas:  
 60 Cinoxacina, ácido nalidíxico
- Fluoroquinolonas:  
 Ciprofloxacino, enoxacino, grepafloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, norfloxacino, ofloxacino, esparfloxacino, trovafloxacino
- Polipéptidos:  
 65 Bacitracina, colistina, polimixina B
- Sulfonamidas:

Sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfametizol, sulfacetamida

Agentes antibacterianos diversos:

Trimetoprim, sulfametazol, cloranfenicol, vancomicina, metronidazol, quinupristina, dalfopristina, rifampicina, espectinomicina, nitrofurantoina

5 Agentes antivirales:

Agentes antivirales generales:

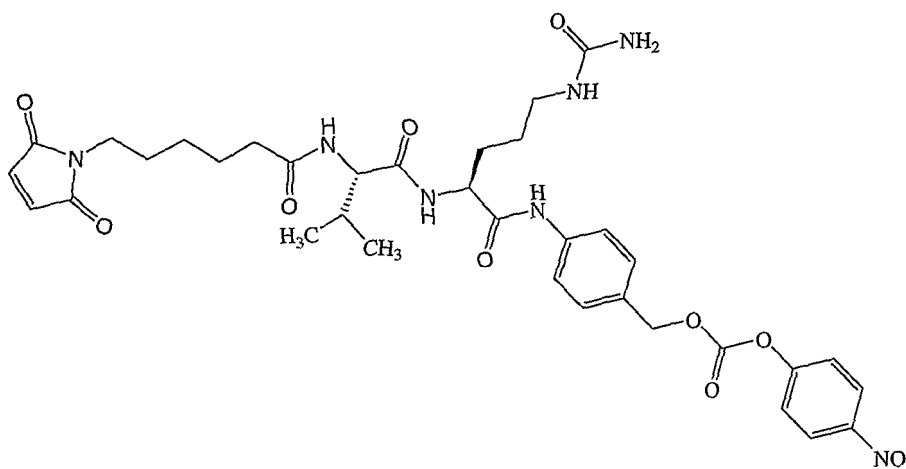
Idoxuradina, vidarabina, trifluridina, aciclovir, famciclovir, penciclovir, valaciclovir, ganciclovir, foscarnet, ribavirina, amantadina, rimantadina, cidofovir, oligonucleótidos antisentido, inmunoglobulinas, interferones

Fármacos para la infección por VIH:

10 Tenofovir, emtricitabina, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, nevirapina, delavirdina, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir

## Ejemplos

### 15 **Ejemplo 1** - Preparación del compuesto AB

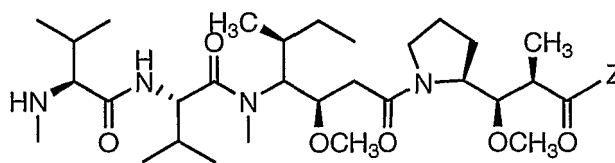


**AB**

20 Se diluyó Fmoc-val-cit-PAB-OH (14,61 g, 24,3<sup>o</sup>mmol, 1,0 eq.; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n.º 6.214.345 a Firestone *et al.*) con DMF (120 ml, 0,2 M) y a esta solución se le añadió una dietilamina (60 ml). La reacción se controló mediante HPLC y se descubrió que se completó en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se precipitó usando acetato de etilo (aproximadamente 100 ml) con ultrasonidos durante 10 min. Se añadió éter (200 ml) y el precipitado se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos adicionales. La solución se dejó reposar durante 30 min sin agitación y después se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 8,84 g (96 %). Se diluyó Val-cit-PAB-OH (8,0 g, 21<sup>o</sup>mmol) con DMF (110 ml) y la solución resultante se trató con MC-OSu (Willner *et al.*, 1993, *Bioconjugate Chem.* 4: 521; 6,5 g, 21<sup>o</sup>mmol, 1,0 eq.). La reacción se completó de acuerdo con el análisis por HPLC después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se precipitó usando acetato de etilo (50 ml). Después del tratamiento con ultrasonidos durante 15 minutos, se añadió éter (400 ml) y la mezcla se sometió a ultrasonidos adicionalmente hasta que todas las partículas grandes se rompieron. Después, la solución se filtró y el sólido se secó para proporcionar un intermedio sólido de color blanquecino. Rendimiento: 11,63 g (96 %); EN-EM *m/z* 757,9 [M-H]

35 El intermedio sólido de color blanquecino (8,0 g, 14,0<sup>o</sup>mmol) se diluyó con DMF (120 ml, 0,12 M) y a la solución resultante se le añadió bis(4-nitrofenil)carbonato (8,5 g, 28,0<sup>o</sup>mmol, 2,0 eq.) y DIEA (3,66 ml, 21,0<sup>o</sup>mmol, 1,5 eq.). La reacción se completó en 1 h de acuerdo con el análisis por HPLC. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite que se precipitó con EtOAc y después se trituró con EtOAc (aproximadamente 25 ml). El soluto se precipitó adicionalmente con éter (aproximadamente 200 ml) y se trituró durante 15 minutos. El sólido se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar el Compuesto **AB**, que tenía una pureza del 93 % de acuerdo con el análisis por HPLC y se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 9,7 g (94 %).

### 40 **Ejemplo 2** - Preparación de compuestos MMAZ mediante síntesis en fase sólida



MeVal-Val-Dip-Dap-Z (MMAZ)

Se prepararon resinas Fmoc-aminoácido-2-clorotritilo (**SP1**) de acuerdo con el Procedimiento General SP(a). Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de ciertas resinas.

5

#### Resina de Fmoc-2-cloro-Phe-2-clorotritilo (SP1-z)

Se disolvió Fmoc-2-cloro-L-fenilalanina (354 mg, 0,84°mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (4 ml) y DIEA (585 µl, 3,36°mmol, 4 equiv). La solución resultante se añadió a una jeringa de 10 ml que contenía resina de cloruro de 2-clorotritilo (500 mg, 0,70°mmol, 1,4°mmol/g). La mezcla se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró, se lavó con DCM/MeOH/DIEA (17:2:1; 5 ml, 4 veces), MeOH (5 ml, 1 vez), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 2 veces) y éter etílico (5 ml, 4 veces) y se secó al vacío durante 2 h. La resina se dejó al vacío durante la noche. La carga se determinó mediante cuantificación de Fmoc. Una cantidad conocida (4,4 mg) de resina de 2-cloro-Phe-2-clorotritilo se pesó en un matraz aforado de 10 ml. Al matraz se le transfirió piperidina al 20 %/DMF (2 ml). La mezcla se dejó escindir durante 1 h, con agitación ocasional a mano. Al matraz se le transfirió DMF (8 ml) para llevar el volumen total a 10 ml. Una solución de blanco se preparó con 10 ml de piperidina al 20 %/DMF en un matraz aforado de 10 ml. El espectrofotómetro se puso a cero con la solución de blanco. La absorbancia se midió a 301 nm y el nivel de carga se proporcionó por:

20

$$\text{Carga (mmol/g)} = A_{301} \times 10 \text{ ml}/7800 \times \text{peso}$$

A<sub>301</sub> es la absorbancia a 301 nm, 7800 es el coeficiente de extinción del aducto de piperidina-fluorenona y peso es el peso de la resina utilizada en miligramos. La cuantificación de Fmoc se realiza generalmente por duplicado. Se determinó que el nivel de carga de la resina Fmoc-2-cloro-Phe-2-clorotritilo era de 0,612°mmol/g.

25

#### Resina de Fmoc-Me-Phe-2-clorotritilo (SP1-b)

Se cargó Fmoc-Me-L-fenilalanina (337 mg, 0,84°mmol) en resina de cloruro de 2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(a). Se determinó que el nivel de carga de la resina de Fmoc-Me-L-Phe-2-clorotritilo era de 0,4908°mmol/g.

30

#### Resina de Fmoc-Tic-2-clorotritilo (SP1-c)

Se cargó Fmoc-Tic-OH (335 mg, 0,84°mmol) en resina de cloruro de 2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(a). Se determinó que el nivel de carga de la resina de Fmoc-Tic-2-clorotritilo era de 0,638°mmol/g.

35

#### Resina de Fmoc-L-β-homoPhe-2-clorotritilo (SP1-d)

Se cargó Fmoc-L-β-homofenilalanina (337 mg, 0,84°mmol) en resina de cloruro de 2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(a). Se determinó que el nivel de carga de la resina de Fmoc-L-β-homoPhe-2-clorotritilo era de 0,579°mmol/g.

40

#### Resina de Boc-p-amino-Phe(Fmoc)-2-clorotritilo (SP1-e)

45

Se cargó Boc-p-amino-Phe(Fmoc)-OH (704 mg, 0,70°mmol) en resina de cloruro de 2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(a). Se determinó que el nivel de carga de la resina de Boc-p-amino-Phe(Fmoc)-2-clorotritilo era de 0,650°mmol/g.

50

#### Resina de Fmoc-3-ciclohexil-L-Ala-2-clorotritilo (SP1-f)

Se cargó Fmoc-3-ciclohexil-L-alanina (550 mg, 0,70°mmol) en resina de cloruro de 2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(a). Se determinó que el nivel de carga de la resina de Fmoc-3-ciclohexil-L-Ala-2-clorotritilo era de 0,660°mmol/g.

55

#### Resina de Fmoc-L-4-Tiazolilalanina-2-clorotritilo (SP1-g)

Se cargó Fmoc-L-4-Tiazolilalanina (552 mg, 0,70°mmol) en resina de cloruro de 2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(a). Se determinó que el nivel de carga de la resina de Fmoc-L-4-Tiazolilalanina-2-

clorotritilo era de 0,790°mmol/g.

Resina de Fmoc-3-(3-piridil)-L-Ala-2-clorotritilo (SP1-h)

- 5 Se cargó Fmoc-3-(3-piridil)-L-alanina (543 mg, 0,70°mmol) en resina de cloruro de 2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(a). Se determinó que el nivel de carga de la resina de Fmoc-3-(3-piridil)-L-Ala-2-clorotritilo era de 0,790°mmol/g.

10 La cuantificación de Fmoc de resinas pre-cargados disponibles en el mercado se realizó de acuerdo con el Procedimiento General SP(b).

Resina de H-Leu-2-clorotritilo (SP1-i)

- 15 Se disolvió Fmoc-Cl (259 mg, 1°mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (2 ml) para hacer una solución de trabajo 0,5 M. La solución se transfirió a una jeringa de plástico de 3 ml que contenía resina de H-Leu-2-clorotritilo (25 mg, 0,86°mmol/g, 0,0215°mmol). La mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró y se lavó con DMF (5 ml, 2 veces), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml, 2 veces) y éter etílico (5 ml, 2 veces) y se secó al vacío durante 2 horas. La resina se ensayó mediante el ensayo de amina de Kaiser. Tras los resultados negativos (amina libre completamente protegida), se realizó la cuantificación de Fmoc para obtener el nivel de carga, como se ha descrito en el Procedimiento general SP(a). Se determinó que nivel de carga de la resina de H-Leu-2-clorotritilo era de 0,85°mmol/g.

Resina de H-Met-2-clorotritilo (SP1-j)

- 25 Se aciló resina de H-Met-2-clorotritilo (25 mg, 0,64°mmol/g, 0,016°mmol) con un exceso de Fmoc-Cl (259 mg, 1°mmol), como se ha descrito en el Procedimiento general SP(b). Se determinó que el nivel de carga de la resina de H-Met-2-clorotritilo era de 0,27°mmol/g.

Resina de H-Trp(Boc)-2-clorotritilo (SP1-k)

- 30 Se aciló resina de H-Trp(Boc)-2-clorotritilo (25 mg, 0,74°mmol/g, 0,033°mmol) con un exceso de Fmoc-Cl (259 mg, 1°mmol), como se ha descrito en el Procedimiento general SP(b). Se determinó que el nivel de carga de la resina de H-Trp(Boc)-2-clorotritilo era de 0,70°mmol/g.

H-Glu(OtBu)-2-clorotritilo resina (SP1-l)

- 35 Se aciló resina de H-Glu(OtBu)-2-clorotritilo (25 mg, 0,90°mmol/g, 0,022°mmol) con un exceso de Fmoc-Cl (259 mg, 1°mmol), como se ha descrito en el Procedimiento general SP(b). Se determinó que el nivel de carga de la resina de H-Glu(OtBu)-2-clorotritilo era de 0,88°mmol/g.

40 Resina de MeVal-Val-Dil-Dap-2-cloro-Phe-2-clorotritilo

- Se preparó resina de MeVal-Val-Dil-Dap-2-cloro-Phe-2-clorotritilo siguiendo el Procedimiento general SP(c). Brevemente, se añadió una piperidina al 20 % en solución de DMF (5 ml) a la jeringa que contenía resina de Fmoc-2-cloro-Phe-2-clorotritilo y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró, se lavó con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces) y éter etílico (5 ml, 4 veces) y se secó al vacío durante 2 h.

- 50 Se disolvieron Fmoc-Dap (278 mg, 0,680°mmol) y HATU (259 mg, 0,680°mmol, 2 equiv.) en DMF anhidro (5 ml) y DIEA (237 µl, 1,36°mmol, 4 equiv.). La solución resultante se transfirió a la jeringa de plástico de 10 ml que contenía resina de H-2-cloro-Phe-2-clorotritilo (555,6 mg, 0,340°mmol). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se determinó mediante el ensayo de amina de Kaiser y el análisis por CLEM de material retirado por escisión de una pequeña cantidad de resina (usando TFA al 2 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La resina se filtró, se lavó con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces) y éter etílico (5 ml, 4 veces) y se secó al vacío durante 2 h.

- 55 Se añadió piperidina al 20 % en solución de DMF (5 ml) a la jeringa que contenía resina de Fmoc-Dap-2-cloro-Phe-2-clorotritilo y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró, se lavó con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces) y éter etílico (5 ml, 4 veces) y se secó al vacío durante 2 h.

- 60 Se disolvieron Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH (510 mg, 0,680°mmol, 2 equiv.) y HATU (259 mg, 0,680°mmol, 2 equiv.) en DMF anhidro (5 ml) y DIEA (237 µl, 1,70°mmol, 5 equiv.). La solución resultante se transfirió a la jeringa de plástico de 10 ml que contenía resina de H-Dap-2-cloro-Phe-2-clorotritilo. La mezcla se agitó durante 6 horas. La finalización de la reacción se determinó mediante análisis por CLEM del material retirado por escisión de una pequeña cantidad de resina (usando TFA al 2 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La resina se filtró, se lavó con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces) y éter etílico (5 ml, 4 veces) y se secó al vacío durante 2 h.

MeVal-Val-Dil-Dap-2-cloro-Phe-OH (SP2-a)

5 Se preparó MeVal-Val-Dil-Dap-2-cloro-Phe siguiendo el Procedimiento general SP(d). Brevemente, se añadió piperidina al 20 % en solución de DMF (5 ml) a la jeringa que contenía la resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-2-cloro-Phe-2-clorotritilo y la mezcla se agitó durante 2 horas. La resina se filtró, se lavó con DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces), DMF (5 ml, 4 veces), DCM (5 ml, 4 veces) y éter etílico (5 ml, 4 veces) y se secó al vacío durante 2 h. Se consiguió un secado adicional dejando resina durante la noche al vacío.

10 Una solución de TFA al 2 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) se transfirió a una jeringa de plástico de 10 ml que contenía resina de MeVal-Val-Dil-Dap-2-cloro-Phe-2-clorotritilo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. El filtrado se recogió en un matraz de fondo redondo de 100 ml. El proceso se repitió tres veces. El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 200 mg (67 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 96 % a los 6,72 minutos. CL-EM *m/z* (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>39</sub>H<sub>64</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>8</sub>, 765,44; encontrado 767,063 (M+H)<sup>+</sup>.

15 Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Me-Phe-2-clorotritilo

20 Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en resina de H-Me-L-Phe-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

MeVal-Val-Dil-Dap-Me-Phe-OH (SP2-b)

25 Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-Me-Phe-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 62,3 mg (26 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,88 minutos. CL-EM *m/z* (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>40</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>, 745,5; encontrado 746,908 (M+H)<sup>+</sup>.

Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Tic-2-clorotritilo

30 Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en resina de H-Tic-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

MeVal-Val-Dil-Dap-Tic-OH (SP2-c)

35 Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-Tic-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 178,40 mg (55 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,74 minutos. CL-EM *m/z* (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>40</sub>H<sub>65</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>, 743,48; encontrado, 744,839 (M+H)<sup>+</sup>.

40 Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-L-β-homoPhe-2-clorotritilo

Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en resina de resina de H-L-β-homoPhe-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

45 MeVal-Val-Dil-Dap-L-β-homoPhe-OH (SP2-d)

50 Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-L-β-homoPhe-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 282,9 mg (99 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,65 minutos. CL-EM *m/z* (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>40</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>, 745,5; encontrado, 746,869 (M+H)<sup>+</sup>.

Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Boc-p-amino-Phe-2-clorotritilo

55 Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en una resina de Boc-p-amino-Phe-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

MeVal-Val-Dil-Dap-Boc-p-amino-Phe-OH (SP2-e)

60 Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-Boc-p-amino-Phe-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 210,6 mg (48 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % en 6,9 minutos. CL-EM *m/z* (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>44</sub>H<sub>74</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>, 846,55; encontrado, 847,459 (M+H)<sup>+</sup>.

Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-3-ciclohexil-L-Ala-2-clorotritilo

Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en una resina de H-3-ciclohexil-L-Ala-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

5

MeVal-Val-Dil-Dap-3-ciclohexil-L-Ala-OH (SP2-f)

Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-3-ciclohexil-L-Ala-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 343,4 mg (99 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,87 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S, 737,53; encontrado, 738,974 (M+H)<sup>+</sup>.

10

Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-L-4-Tiazolilalanina-2-clorotritilo

Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en resina de H-L-4-Tiazolilalanina-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

15

MeVal-Val-Dil-Dap-L-4-Tiazolilalanina (SP2-g)

Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-L-4-Tiazolilalanina por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 357 mg (87 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,23 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>39</sub>H<sub>62</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>S, 738,43; encontrado, 739,889 (M+H)<sup>+</sup>.

20

Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-3-(3-piridil)-L-Ala-2-clorotritilo

Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en resina de H-3-(3-piridil)-L-Ala-2-Clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

25

MeVal-Val-Dil-Dap-3 (3-piridil)-L-Ala-OH (SP2-h)

Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-3-(3-piridil)-L-Ala-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 388,6 mg (94 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,13 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>38</sub>H<sub>64</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>, 732,48; encontrado, 733,842 (M+H)<sup>+</sup>.

30

35

Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Leu-2-clorotritilo

Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en resina de H-Leu-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

40

MeVal-Val-Dil-Dap-Leu-OH (SP2-i)

Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-Leu-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 217,4 mg (62 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,43 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>36</sub>H<sub>67</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>, 697,5; encontrado 698,999 (M+H)<sup>+</sup>.

45

Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Met-2-clorotritilo

Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en resina de H-Met-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

50

MeVal-Val-Dil-Dap-Met-OH (SP2-j)

Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-Met-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 90,7 mg (82 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,39 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>35</sub>H<sub>65</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S, 715,46; encontrado 716,399 (M+H)<sup>+</sup>.

55

60

Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Trp(Boc)-2-clorotritilo

Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en resina de H-Trp-(Boc)-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

65

Trp MeVal-Val-Dil-DAP-OH (Boc) (P2-k)

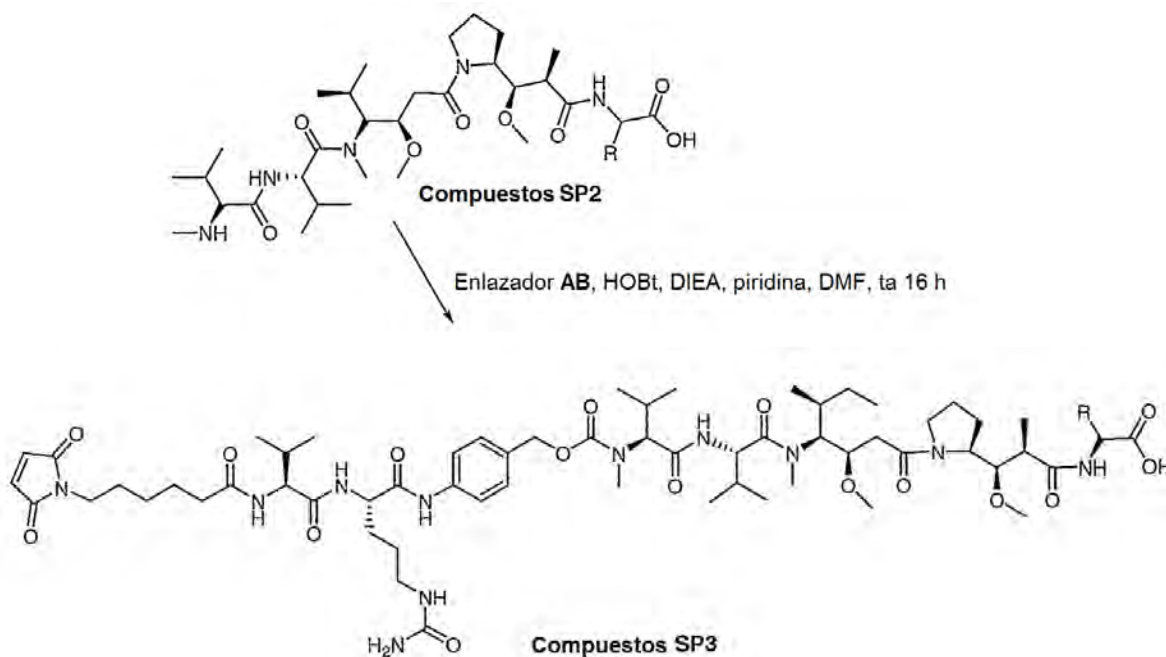
- 5 Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-Trp(Boc)-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 151,7 mg (42 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 7,39 minutos. CL-EM  $m/z$  ( $EN^+$ ) calculado para  $C_{46}H_{74}N_6O_{10}$ , 870,55; encontrado 871,645 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

Resina de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Glu(OtBu)-2-clorotritilo

- 10 Se acoplaron Fmoc-Dap-OH y Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH, respectivamente, en resina de H-Glu(OtBu)-2-clorotritilo como se ha descrito en el Procedimiento general SP(c).

MeVal-Val-Dil-Dap-Glu(OtBu)-OH (SP2-1)

- 15 Se retiró MeVal-Val-Dil-Dap-Glu(OtBu)-OH por escisión de la resina como se ha descrito en el Procedimiento general SP(d). El filtrado se evaporó para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 219,4 mg (55 % de sal de TFA) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,67 minutos. CL-EM  $m/z$  ( $EN^+$ ) calculado para  $C_{39}H_{71}N_5O_{10}$ , 769,52; encontrado 770,989 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

20 Ejemplo 3. Preparación de MC-Val-Cit-PAB-MMAZ25 Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-DAP-2-cloro-Phe-OH (SP3-a)

- Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-2-cloro-Phe-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 13,50 mg (14 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 96 % a los 7,23 minutos. CL-EM  $m/z$  ( $EN^+$ ) calculado para  $C_{68}H_{102}ClN_{11}O_{16}$ , 1363,72; encontrado 1364,766 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

30 Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-Me-Phe-OH (SP3-b)

- 35 Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-Me-Phe-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 17,1 mg (13 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 96 % a los 7,24 minutos. CL-EM  $m/z$  ( $EN^+$ ) calculado para  $C_{69}H_{105}N_{11}O_{16}$ , 1343,77; encontrado,  $m/z$  1344,835 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-Tic-OH (SP3-c)

- 40 Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-Tic-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 2,7 mg (2 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 95 % a los 7,21 minutos. CL-EM  $m/z$  ( $EN^+$ ) calculado para  $C_{69}H_{103}N_{11}O_{16}$ ,

1341,76; encontrado,  $m/z$  1342,844 (M+H)<sup>+</sup>.

Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-L-β-homoPhe-OH (SP3-d)

- 5 Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-L-β-homoPhe-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 3,1 mg (1,5 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 95 % a los 7,26 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>69</sub>H<sub>105</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub>, 1343,77; encontrado,  $m/z$  1344,788 (M+H)<sup>+</sup>.

10 Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-p-amino-Phe-OH (SP3-e)

- Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-Boc-p-amino-Phe-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 4,4 mg (2,5 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 95 % a los 7,54 min. CLEM calculado para C<sub>73</sub>H<sub>112</sub>N<sub>12</sub>O<sub>18</sub> (MH)<sup>+</sup> 1.444,82; encontrado,  $m/z$  1445,972. Una solución al 50 % de TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml) se transfirió a maleimidocaproil-Val-Cit-PABC-MeVal-Val-Dil-Dap-Boc-p-amino-Phe-OH (3,0 mg, 0,00263<sup>o</sup>mmol). La desprotección del grupo Boc se completó después de 3 horas. El disolvente se retiró para dejar un sólido de color blanco. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 2,3 mg (82 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 96 % a los 7,54 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>68</sub>H<sub>104</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>, 1344,77; encontrado, 1345,539 (M+H)<sup>+</sup>.

20 Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-DAP-3-ciclohexil-L-Ala-OH (SP3-f)

- Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-3-ciclohexilo-L-Ala-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 1,5 mg (1 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 95 % a los 7,28 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>68</sub>H<sub>109</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub>, 1336,66; encontrado, 1337,166 (M+H)<sup>+</sup>.

Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-L-4-Tiazolilalanina (SP3-g)

- 30 Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-L-4-Tiazolilalanina como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 0,5 mg (0,2 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 96 % a los 6,91 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>65</sub>H<sub>100</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>S, 1336,71; encontrado, 1337,867 (M+H)<sup>+</sup>.

35 Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-3 (3-piridil)-L-Ala-OH (SP3-h)

- Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-3-(3-piridil)-L-Ala-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 4,4 mg (1,6 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 6,94 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>67</sub>H<sub>102</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>, 1330,75; encontrado, 1331,682 (M+H)<sup>+</sup>.

Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-Leu-OH (SP3-i)

- 45 Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-Leu-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 10,3 mg (4,1 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 7,16 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>65</sub>H<sub>105</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub>, 1295,77; encontrado, 1296,524 (M+H)<sup>+</sup>.

Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-Met-OH (SP3-j)

- 50 Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-Met-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 7,2 mg (6 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 7,06 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>64</sub>H<sub>103</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub>S, 1313,73; encontrado 1314,729 (M+H)<sup>+</sup>.

55 Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-Trp(Boc)-OH (SP3-k)

- Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-Trp(Boc)-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 7,4 mg (12 %) de un sólido de color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 98 % a los 7,62 minutos. CL-EM  $m/z$  (EN<sup>+</sup>) calculado para C<sub>75</sub>H<sub>112</sub>N<sub>12</sub>O<sub>18</sub>, 1468,82; encontrado 1469,471 (M+H)<sup>+</sup>.

Maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-MeVal-Val-Dil-Dap-Glu(OtBu)-OH (SP3-1)

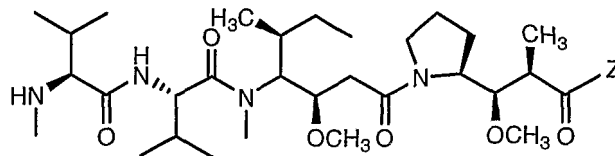
- 65 Se unió maleimidocaproil-Val-Cit-PAB-OCOpNP a MeVal-Val-Dil-Dap-Glu(OtBu)-OH como se ha descrito en el Procedimiento general H. La purificación mediante HPLC preparativa proporcionó 2,9 mg (1,6 %) de un sólido de



color blanco. Análisis por HPLC de fase inversa: 95 % a los 7,47 minutos. CL-EM  $m/z$  ( $EN^+$ ) calculado para  $C_{68}H_{109}N_{11}O_{18}$ , 1367,8; encontrado 1368,452 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

#### Ejemplo 4. Preparación de MMAZ (1) en fase de solución

5



MeVal-Val-Dil-Dap-Z (MMAZ)

La síntesis de MMAZ se describe en los Esquemas 5 y 6. Pueden prepararse aminoácidos protegidos con Fmoc a partir de aminoácidos no protegidos usando, por ejemplo, Fmoc-OSu a través de procedimientos bien establecidos (véase, por ejemplo, Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª edición, 1991, John Wiley & Sons, p. 506).

10

#### Preparación de Fmoc-Dolaproína (Fmoc-Dap)

15 Se suspendió Boc-Dolaproína (58,8 g, 0,205 mol) en HCl 4 N en 1,4-dioxano (256 ml, 1,02 mol, Aldrich). Después de agitar durante 1,5 horas, el análisis por TLC indicó que la reacción se había completado (MeOH al 10 %/ $CH_2Cl_2$ ) y la mezcla se concentró hasta casi sequedad. Se cargó de 1,4-dioxano (50 ml) adicional y la mezcla se concentró a sequedad y se secó al vacío durante la noche. El sólido de color blanco resultante se disolvió en  $H_2O$  (400 ml) y se transfirió a un matraz de de fondo redondo de 3 l, de tres bocas, con un agitador mecánico y sonda de temperatura.

20 Se añadió N,N-diisopropiletilamina (214,3 ml, 1,23 mol, Acros) a lo largo de un minuto, causando una exotermia de 20,5 a 28,2 °C (interna). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió 1,4-dioxano (400 ml). Una solución de Fmoc-OSu (89,90 g, 0,267 mol, Advanced Chem Tech) en 1,4-dioxano (400 ml) se añadió desde un embudo de adición durante 15 minutos, manteniendo la temperatura de reacción por debajo de 9 °C. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 19 horas, después de lo cual la mezcla se concentró por evaporación rotatoria a una suspensión acuosa (390 g). La suspensión se diluyó con  $H_2O$  (750 ml) y  $Et_2O$  (750 ml). Las capas se separaron, manteniendo cualquier sólido con la capa orgánica. La capa acuosa se acidificó usando HCl conc. (30 ml) y se extrajo con EtOAc (500 ml, 3 veces). Los extractos combinados se secaron sobre  $MgSO_4$ , se filtraron y se concentraron. El extracto de  $Et_2O$  se extrajo una vez con una solución sat de  $NaHCO_3$  (200 ml), manteniendo cualquier sólido con la fase acuosa. La suspensión acuosa se acidificó usando HCl conc. (50 ml) y se extrajo con  $Et_2O$  (50 ml), manteniendo cualquier sólido con la capa orgánica. La capa orgánica se filtró y se concentró. Los dos productos se combinaron y se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con  $CH_2Cl_2$  (3,5 l), después MeOH al 3 %/ $CH_2Cl_2$  (9 l) para proporcionar 68,23 g de Fmoc-Dolaproína en forma de una espuma de color blanco (81 %, pureza del 97,5 % mediante HPLC (ABC)).

#### 35 Preparación de Fmoc-Dap-Z

La sal y/o forma protegida del bioisómero de fenilalanina (3°mmol), N-Boc-Dolaproína (668 mg, 1 eq.), DEPC (820  $\mu$ l, 1,5 eq.) y DIEA (1,2 ml) se diluyeron con diclorometano (3 ml). Después de 2 horas (h) a temperatura ambiente (aproximadamente 28 grados Celsius), la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (20 ml), se lavó sucesivamente con una solución acuosa saturada (ac.) de  $NaHCO_3$  (10 ml, 2 veces) y solución ac. de NaCl (10 ml, 2 veces). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se resuspendió en acetato de etilo y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones pertinentes se combinaron y se concentraron para proporcionar el dipéptido. Los grupos protectores se escindieron por métodos conocidos para los expertos en la materia.

45

#### Preparación alternativa de Fmoc-Dap-Z

Se suspendió Aminoácido Z con el grupo carboxi protegido (48,3°mmol) en DMF anhidra (105 ml, Acros) durante 5 minutos y se agregó Fmoc-Dap (19,80 g, 48,3°mmol). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió TBTU (17,08 g, 53,20°mmol, Innovaciones Matrix). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (25,3 ml, 145,0°mmol, Acros) mediante una jeringa durante 3 min. Después de 1 hora, el baño de hielo se retiró y la mezcla se dejó calentar durante 30 min. La mezcla se vertió en agua (1 l) y se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Después de la separación, la capa acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo (150 ml, 2 veces). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (150 ml), se secaron ( $MgSO_4$ ) y se filtraron (papel de filtro) para retirar los productos insolubles (inorgánicos y algunos de dibenzofulveno). Después de la concentración, el residuo se adsorbió sobre sílice (41 g) y se purificó mediante cromatografía (columna de 22°cm  $\times$  8°cm; heptano al 65 %/ $EtOAc$  (2,5 l); heptano al 33 %/ $EtOAc$  (3,8 l), para proporcionar el producto.

55

## Preparación de Dap-Z

Un matraz de fondo redondo de 1 l se cargó con Fmoc-Dap-Z, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (122 ml) y dietilamina (61 ml, Acros). La solución se agitó a temperatura ambiente y la finalización se controló mediante HPLC. Después de 7 horas, la mezcla se concentró (temperatura del baño < 30 °C). El residuo se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 ml) y se concentró. Esto se repitió dos veces. Al residuo se le añadió MeOH (20 ml) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 ml) y la solución se concentró. El residuo se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) y tolueno (400 ml), se concentró y el residuo se dejó al vacío durante la noche para proporcionar el producto.

## 10 Preparación de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Z

El tripéptido Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu (preparado como se describe en el documento WO 02/088172, titulado "Pentapeptide Compound and Uses Related Thereto"; 0,73°mmol) se trató con TFA (3 ml) y diclorometano (3 ml) durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a sequedad. El residuo se co-evaporó con tolueno (20 ml, 3 veces) y se secó al vacío durante la noche. El residuo se diluyó con diclorometano (5 ml) y se añadió al dipéptido desprotegido (287 mg, 0,73°mmol), seguido de DIEA (550 µl, 4 eq.) y DEPC (201 µl, 1,1 eq.). Después de 2 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (50 ml), se lavó sucesivamente con ácido cítrico ac. al 10 % (20 ml, 2 veces), solución ac. de NaHCO<sub>3</sub> (10 ml, 2 veces) y NaCl ac. saturado (10 ml). La capa orgánica se separó y se concentró. El residuo resultante se resuspendió en acetato de etilo y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en acetato de etilo. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar Fmoc-MeVal-val-dil-dap-Z.

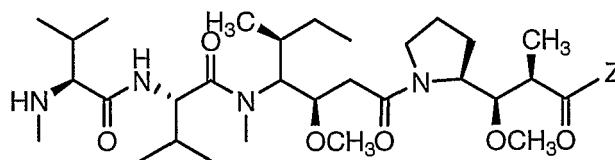
## Preparación alternativa de Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Z

Se suspendió Dap-Z en bruto (39,1°mmol) en DMF anhidro (135 ml, Acros) durante 5 minutos y se añadió Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH (24,94 g, 39,1°mmol, véase el Ejemplo 2 para la preparación). La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se añadió TBTU (13,81 g, 43,0°mmol, Matrix Innovations). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (20,5 ml, 117,3°mmol, Acros) mediante una jeringa durante 2 minutos. Después de 1 hora, el baño de hielo se retiró y la mezcla se dejó calentar durante 30 min. La mezcla se vertió en agua (1,5 l) y se diluyó con acetato de etilo (480 ml). Después de reposar durante 15 minutos, las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se filtraron (papel de filtro), para eliminar los productos insolubles (inorgánicos y algunos de dibenzofulveno). Después de la concentración, el residuo (49 g) se raspó del matraz y se adsorbió sobre sílice (49 g) y se purificó mediante cromatografía (columna de diámetro 15°cm × 10°cm; EtOAc/heptano 2:1 (3 l), EtOAc (5 l); fracciones 250 ml) para proporcionar Fmoc-MeVal-Val-Dil-Dap-Z.

## Preparación de MeVal-Val-Dil-Dap-Z

El producto (0,2°mmol) se diluyó con diclorometano (3 ml) y dietilamina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Los disolventes se retiraron para proporcionar un aceite que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice en un gradiente por etapas de MeOH al 0-10 % en diclorometano para proporcionar el Compuesto 1.

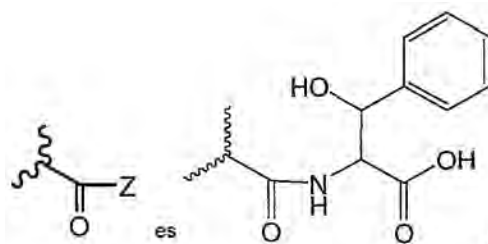
Utilizando el procedimiento anterior, se prepararon los compuestos de la siguiente fórmula:



MeVal-Val-Dil-Dap-Z (MMAZ)

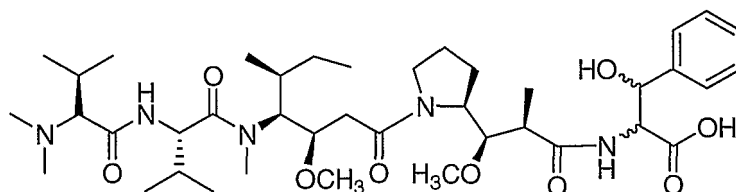
**Ejemplo 5 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

Esta síntesis se describe la preparación de compuestos de MMAZ en en los que



La 3-fenilserina está disponible en Aldrich.

## 5 Síntesis de dimetilvalina-Val-Dil-Dap-fenilserina

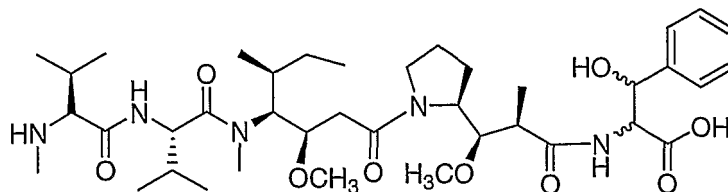


10 A una suspensión de Fmoc-Dap (1,2 g, 2,93<sup>o</sup>mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 ml) se le añadió carbonato de N,N'-disuccinimidilo (901 mg, 1,2 eq) seguido de DIEA (1,28 ml, 2,5 eq). La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se cargaron cantidades adicionales de carbonato de N,N'-disuccinimidilo (901 mg, 1,2 eq), seguido de DIEA (1,28 ml, 2,5 eq) y se continuó agitando durante 18 h más. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc; la capa orgánica se lavó con HCl ac. 0,1 M dos veces, después se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. La cromatografía en columna de gel de sílice en un gradiente escalonado de MeOH del 0 al 15 5 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> proporcionó 1,12 g (rendimiento del 75 %) de Fmoc-Dap-OSu en forma de una espuma de color blanco.

Se suspendió Fmoc-Dap-OSu (0,615 g, 1,21<sup>o</sup>mmol) en DMSO seco (6 ml). Se añadió D,L-treo-3-fenil serina (0,2 g, 1,1<sup>o</sup>mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se cargó 20 directamente en RP-HPLC preparativa y el producto se aisló en un gradiente lineal de MeCN del 10 al 90 % en TFA acuoso al 0,1 %. La Fmoc-Dap-fenilserina obtenida, 280 mg (rendimiento del 44 %), se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (2 ml) y se trató con dimetilamina (2 ml) durante 4 horas a temperatura ambiente. Los productos volátiles se retiraron a presión reducida. El residuo se co-evaporó con Et<sub>3</sub>N/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3 veces para retirar la mayor cantidad posible de dietilamina, después se secó al vacío durante la noche. El residuo se trituró con éter exhaustivamente para retirar el 25 DBF. La Dap-fenilserina se secó y se usó sin purificación adicional.

Se suspendieron dimetilVal-Val-Dil-COOH (130 mg, 0,3<sup>o</sup>mmol, 1 eq), N-hidroxisuccinimida (39 mg, 0,3<sup>o</sup>mmol, 1 eq) y DCC (93 mg, 1,5 eq) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (1,5 ml). A esto, se le añadió DMAP (1 mg, cat.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado se separó por filtración. El dimetilVal-Val-Dil-OSu 30 obtenido de este modo se suspendió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) y la mezcla se añadió a Dap-fenilserina, seguido de DMSO (4 ml) y DIEA (100  $\mu$ L). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado se separó por filtración. Se reemplazó el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por DMSO y el producto se aisló por RP-HPLC preparativa (gradiente lineal de MeCN, del 10 al 90 % en TFA ac. al 0,005 %) como dos diastereómeros. Isómero A: 84 mg, espuma de color blanco. CL-EM *m/z* (EN<sup>+</sup>) 762,67 (M+H)<sup>+</sup> a 10,58 min. Isómero B: 62 mg de sólido de color blanco. CL-EM *m/z* 35 (EN<sup>+</sup>) 762,54 (M+H)<sup>+</sup> a 10,67 min.

## Síntesis de N-metilvalina-Val-Dil-Dap-fenilserina



40 Puede prepararse MeVal-Val-Dil-Dap-fenilserina como se ha descrito anteriormente usando tripéptido de Fmoc-MeVal-Val-Dil. El Fmoc puede retirarse por escisión más tarde del fármaco final de acuerdo con el Procedimiento General E.

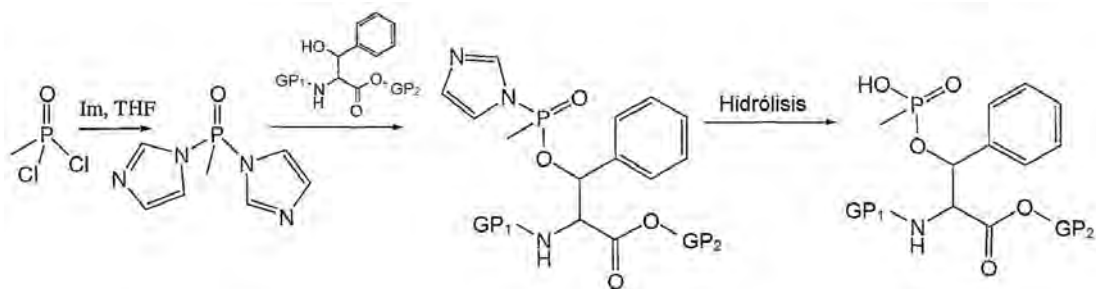
45

La 3-fenilserina apropiadamente protegida puede someterse a condiciones de oxidación, por ejemplo, clorocromato de piridinio (PCC)/piridina (véase, por ejemplo, *Syntheses*, 1982, 245, 881, revisión), a fin de proporcionar la cetona correspondiente. La cetona puede convertirse además en diversos hidrazonas (hidrazonas, acil hidrazonas, semicarbazonas, tiosemicarbazonas, etc.) como se describe, por ejemplo, por Kaneko *et al. Bioconjugate Chemistry*, 1991, 2(3), 133-141. Como alternativa el grupo hidroxilo de la 3-fenilserina protegida en el amino y el carboxilato puede condensarse fácilmente con diversos ácidos usando la química DCC/DMAP para proporcionar ésteres (Larock, R.C., *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH, 1999, pág.1937).

5

El éster de metilfosfonato de 3-fenilserina puede generarse haciendo reaccionar diimidazolida metilfosfónica (a partir de dicloruro metilfosfónico disponible en el mercado, Aldrich) con 3-fenilserina protegida seguida de hidrólisis acuosa.

10



15 Puede generarse éster de fosfato de 3-fenilserina mediante un procedimiento similar a partir de oxiclورو de fósforo (Aldrich). Pueden usarse químicas similares a las descritas anteriormente para la preparación de diversos derivados de serina y treonina.

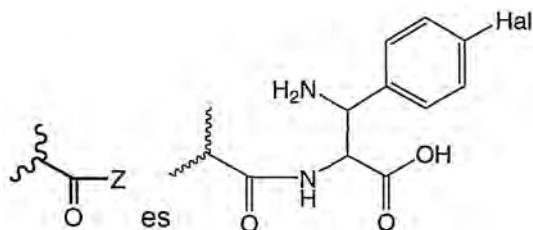
Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

20

#### Ejemplo 6 - Síntesis de compuestos de MMAZ

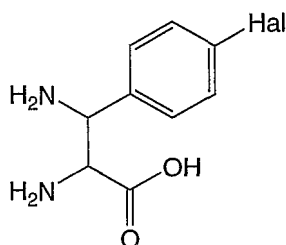
Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que

25



Pueden prepararse convenientemente diaminoácidos enantioméricamente puros que se muestran a continuación en los que Hal es un halógeno como se describe en Zhou *et al.* 1999, *Tetrahedron: Asymmetry* 10 (5): 855-862.

30

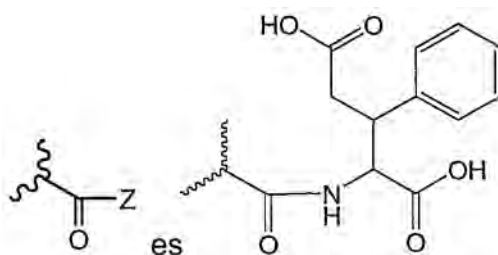


Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

35

#### Ejemplo 7 - Síntesis de compuestos de MMAZ

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:

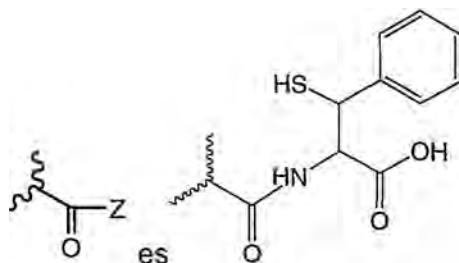


Pueden prepararse ácido 3-aryl-glutámico y otros ácidos glutámicos y piroglutámicos 3-sustituidos como se describe en *Tetrahedron* 9 (2): 217-229 (2002) o *Journal of Organic Chemistry* 66 (4): 1339-1350 (2001).

5 Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

#### 10 **Ejemplo 8 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:

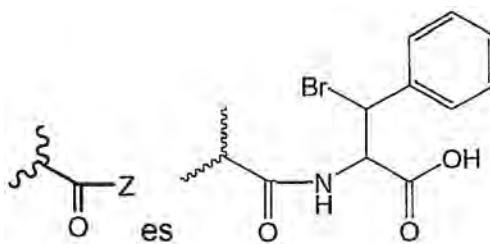


15 Puede prepararse 3-fenilcisteína como se describe en Lago *et al.*, 1992, *Journal of Organic Chemistry* 57 (12): 3493-6.

Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

#### 20 **Ejemplo 9 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:

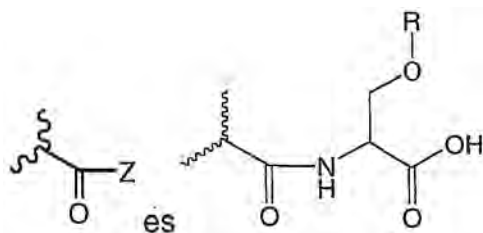


25 Puede sintetizarse 2-bromo-fenilalanina como se describe en Righi *et al.*, 1996, *Tetrahedron Letters* 37 (38): 6893-6896.

30 Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

#### **Ejemplo 10 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

35 Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:

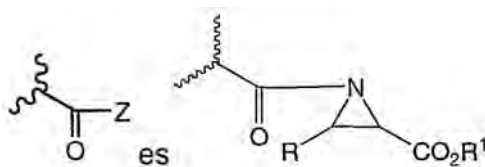


Los beta-alcóxi-aminoácidos anteriores, donde R = alquilo, ciclohexilo, fenilo, bencilo, etc., pueden sintetizarse como se describe en *Bulletin of the Chemicals Society of Japan*, 1982, 55 (9): 3049-50.

5 Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

#### 10 Ejemplo 11 - Síntesis de compuestos de MMAZ

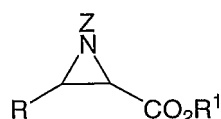
Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:



#### Azi

15 Los análogos de fenilalanina se sintetizan como se describe a continuación. Se escindieron aziridinas (**Azi**) (a continuación), en las que Z = PhCH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>C; R = H o Me y R<sup>1</sup> = PhCH<sub>2</sub> o Me, mediante alcoholes, R<sup>2</sup>OH, en los que R<sup>2</sup> = Me, Me<sub>2</sub>CH, EtCHMe, Me<sub>3</sub>C, ciclohexilo, PhCH<sub>2</sub>, Ph o similares, en presencia de BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O para proporcionar derivados de serina y treonina ópticamente puros R<sub>2</sub>OCHRCH(NHZ)CO<sub>2</sub>R<sup>1</sup>. Estos últimos se desprotegeron mediante hidrogenólisis y saponificación para proporcionar el correspondiente R<sub>2</sub>OCHRCH(NH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H.

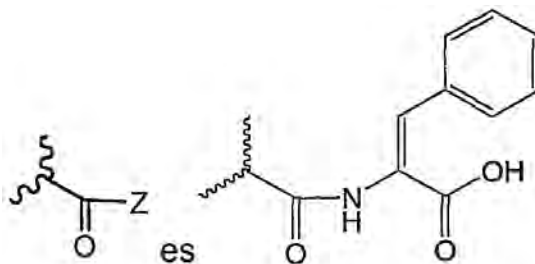
20



25 Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

#### Ejemplo 12 - Síntesis de compuestos de MMAZ

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:



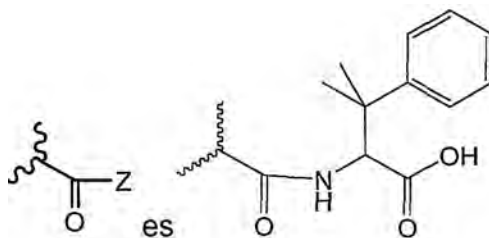
30

Se sintetizan deshidrofenilalanina y otros deshidroaminoácidos como se describe en Mathur *et al.*, 2004, *Biopolymers* 76 (2): 150-161.

35 Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

**Ejemplo 11 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:



5

Pueden sintetizarse  $\beta,\beta$ -dimetil-fenilalanina y  $\beta,\beta$ -dimetil-tirosina como se describe por Jonsson y Mikiver, 1976, *Acta Pharmaceutica Suecica* 13 (1): 75-8. El calentamiento a reflujo de  $\text{PhCMe}_2\text{CH}(\text{CN})\text{CO}_2\text{Et}$  con  $\text{N}_2\text{H}_4$  en MeOH proporciona un 93 % de la hidrazida con un producto secundario de pirazolidina con un rendimiento del 3,5 %. La diazotación secuencial, la degradación de Curtius y la hidrólisis proporcionan un 74 % de  $\text{PhCMe}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ . Puede prepararse  $\beta,\beta$ -dimetiltirosina de manera similar.

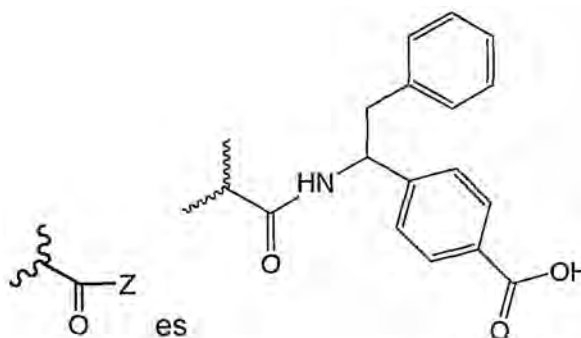
10

Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

15

**Ejemplo 14 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:



20

Puede prepararse ácido 4-(1-amino-2-feniletíl)benzoico como se describe en *Journal of Medicinal Chemistry* 38 (10): 1600-7 (1995).

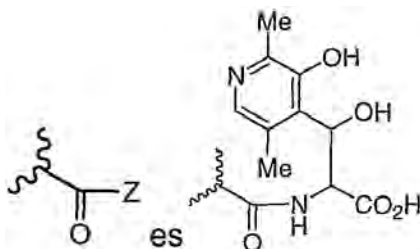
25

Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

**Ejemplo 15 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

30

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:



35

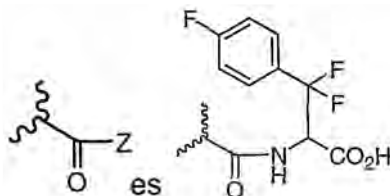
Los análogos de fenilalanina se sintetizan siguiendo los procedimientos descritos en Toth *et al.*, 2004, *Journal of the American Chemical Society* 126 (34): 10538-10539.

Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

#### Ejemplo 16 - Síntesis de compuestos de MMAZ

5

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:

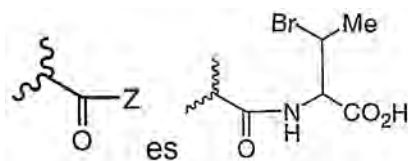


- 10 Se sintetizan análogos  $\beta,\beta$ -difluoro del ácido  $\alpha$ -oxo- $\beta$ -fenilpropiónico y fenilalanina como se muestra a continuación siguiendo los procedimientos descritos en Schlosser *et al.*, 2004, *Tetrahedron* 60 (35): 7731-7742 y Roff *et al.*, 2004, *Journal of the American Chemical Society* 126 (13): 4098-4099. Un procedimiento simple de tres etapas convierte los (2-bromo-1,1-difluoroetil)arenos fácilmente accesibles en  $\alpha$ -aril- $\alpha,\alpha$ -difluoroacetaldehídos. Los posteriores hidrocianación, hidrólisis, oxidación e hidrólisis adicional proporcionaron ácidos  $\beta$ -aril- $\beta,\beta$ -difluoro- $\alpha$ -oxopropiónicos.
- 15 La aminación reductora transforma los oxo ácidos en una mezcla separable de  $\alpha$ -hidroxiácidos y derivados de  $\beta,\beta$ -difluoro- $\beta$ -fenilalanina racémica. Se obtiene  $\beta,\beta$ -difluorofenilalanina enantioméricamente pura cuando se condensa  $\alpha,\alpha$ -difluoro- $\alpha$ -fenilacetaldehído con 1-feniletilamina homoquiral, se añade cianuro de hidrógeno a la imina resultante, la mezcla diastereomérica producida de este modo se hidroliza a las carboxamidas que se pueden separar mediante cristalización fraccionada o cromatografía.

20

#### Ejemplo 17 - Síntesis de compuestos de MMAZ

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:



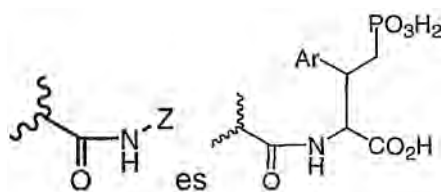
25

- Puede prepararse una serie de diastereoisómeros ((2R,3S)-, (2S,3R)-, (2S,3S)- y (2R,3R)) de análogos de  $\beta$ -metil- $\beta$ -arilalanina en forma enantioméricamente pura usando una combinación de quimiocatálisis y biocatálisis. A partir de MeL-treoninato, se obtiene una gama de dideshidroaminoácidos  $\beta,\beta$ -disustituidos en forma de sus isómeros (Z). La hidrogenación asimétrica, usando ya sea  $[\text{Rh}(\text{R,R})\text{-Et-DuPhos}(\text{COD})]\text{BF}_4$  o  $[\text{Rh}(\text{S,S})\text{-Et-DuPhos}(\text{COD})]\text{BF}_4$  como catalizador, seguida de hidrólisis proporcionó los isómeros (2R,3S) y (2S,3R), respectivamente. La posterior estereoinversión enzimática del isómero (2R,3S) con D-aminoácido oxidasa y la estereoinversión del isómero (2S,3R) con L-aminoácido oxidasa en combinación con  $\text{NH}_3\cdot\text{BH}_3$  proporcionan los isómeros (2S,3S) y (2R,3R) restantes, respectivamente.

35

#### Ejemplo 18 - Síntesis de compuestos de MMAZ

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:



40

Síntesis de ácidos 2-amino-4-fosfonobutanoicos:

- 45 Los ácidos 2-amino-4-fosfonobutanoicos anteriores, donde Ar = fenilo, 3-piridilo y 2-tienilo, se sintetizan como se describe en Ruiz *et al.*, 2003, *Journal of Organic Chemistry* 68 (20): 7634-7645.

Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

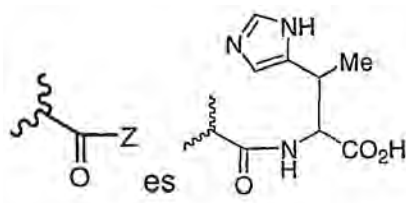


**Ejemplo 19 - Síntesis del MMAZ de la fórmula anterior en la que:**

Las adiciones de conjugado de éteres de bislactima litiados derivados de ciclo[Gly-Val] y ciclo[Ala-Val] a vinilfosfonatos  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\alpha,\beta$ -sustituídos permiten el acceso directo y estereoselectivo a diversos ácidos 2-amino-4-fosfonobutanoicos 3- o 4-monosustituídos y 2,3-, 2,4- o 3,4-disustituídos (derivados AP4) en forma enantioméricamente pura. La estereoquímica relativa puede asignarse mediante análisis por difracción de rayos X o estudios por RMN de derivados de 1,2-oxafosforinano. Se recurre a estructuras del estado de transición "compacto" y "relajado" de 8 miembros, competitivas, para racionalizar el resultado estereoquímico de las adiciones de conjugado.

**Ejemplo 20 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:

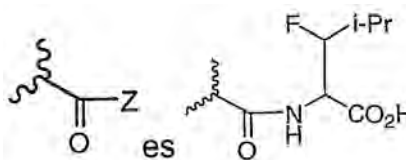


La síntesis de histidinas beta-sustituídas se describe en Wang *et al.*, 2000, *Tetrahedron Letters* 41 (9): 1307-1310.

Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

**Ejemplo 21 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:

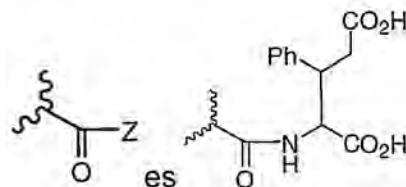


Se sintetizan beta-fluoroaminoácidos como se describe en Davis *et al.*, 1999, *Journal of Organic Chemistry* 64 (18): 6931-6934.

Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4.

**Ejemplo 22- Síntesis de compuestos de MMAZ**

Esta síntesis describe la preparación de compuestos de MMAZ en los que:



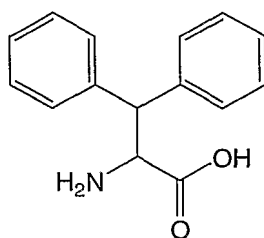
Pueden prepararse ácidos glutámicos beta-sustituídos, como el anterior, como se describe en Ezquerro *et al.*, 1999, *Journal of Organic Chemistry* 64 (18): 6554-6565. La reacción de los enolatos de litio de ésteres de glicina protegidos en N aquirales con complejos de cromo de alcóxialquencilcarbeno quirales proporciona los aductos de Michael correspondientes, con alta selectividad anti o sin dependiendo de la naturaleza del grupo protector de nitrógeno y alta selectividad diastereofacial cuando se emplean complejos de carbeno que contienen el grupo (-)-8-fenilmetiloxi. La posterior oxidación del resto de metalcarbeno seguida de la desprotección del grupo amina y la hidrólisis de ambos ésteres carboxílicos proporciona ácidos glutámicos 3-sustituídos enantioméricamente enriquecidos de estereoquímica natural así como no natural. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar complejo de carbeno con enolato de litio de glicina para proporcionar el aducto de adición de Michael, que puede oxidarse para

proporcionar un glutamato protegido sin ninguna pérdida de estereoquímica. El glutamato se desprotege en dos etapas para proporcionar sal de clorhidrato de ácido (2R,3S)-3-(3-fenil)glutámico. Como alternativa, cuando la etapa de desprotección se realiza antes de la oxidación, se forman complejos de aminocarbeno cíclicos, que conducirán a ácidos pirolutámicos 3-sustituídos ópticamente activos.

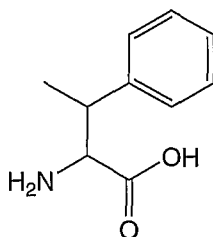
5 Se prepara MMAZ usando el análogo de fenilalanina anterior y conjugando con Fmoc-MeVal-val-dil-O-*t*-Bu siguiendo el procedimiento del Ejemplo 3.

#### 10 **Ejemplo 23 - Síntesis de otros compuestos de MMAZ**

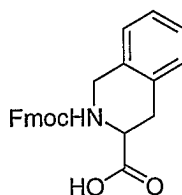
También pueden prepararse compuestos de MMAZ usando los siguientes análogos de fenilalanina disponibles en el mercado, ya sea en forma de sus aminoácidos protegidos o desprotegidos incorporados en la síntesis en fase sólida o de solución como se ha descrito anteriormente:



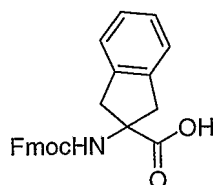
15 (disponible en el mercado de Tyger Scientific, Inc. Ewing, NJ);



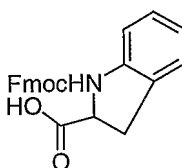
20 (disponible en el mercado de Acros Organics);



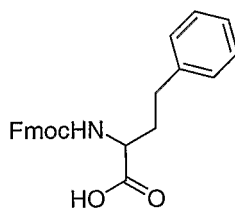
25 (disponible en el mercado de Advanced ChemTech);



30 (disponible en el mercado de Acros);

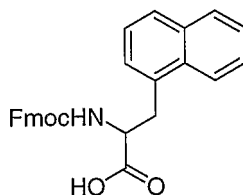


(disponible en el mercado de Advanced ChemTech);



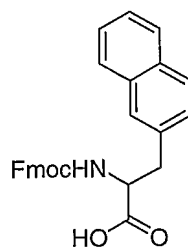
(disponible en el mercado de Advanced ChemTech);

5

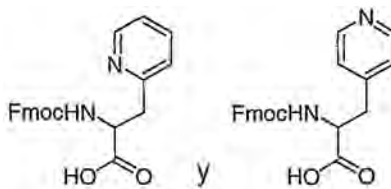


(disponible en el mercado de Pharmacore Products);

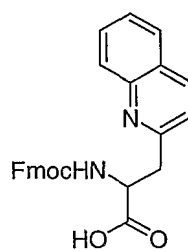
10



(disponible en el mercado de Fluka);

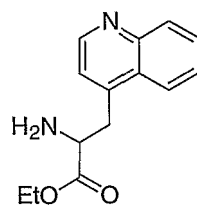


15 (disponibles en el mercado de Peptech),

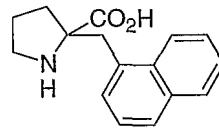


(disponible en el mercado de Bachem);

20

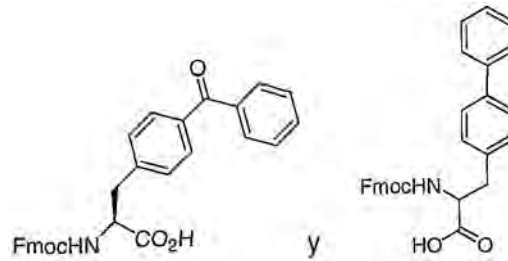


(disponible en el mercado de ChemStep);



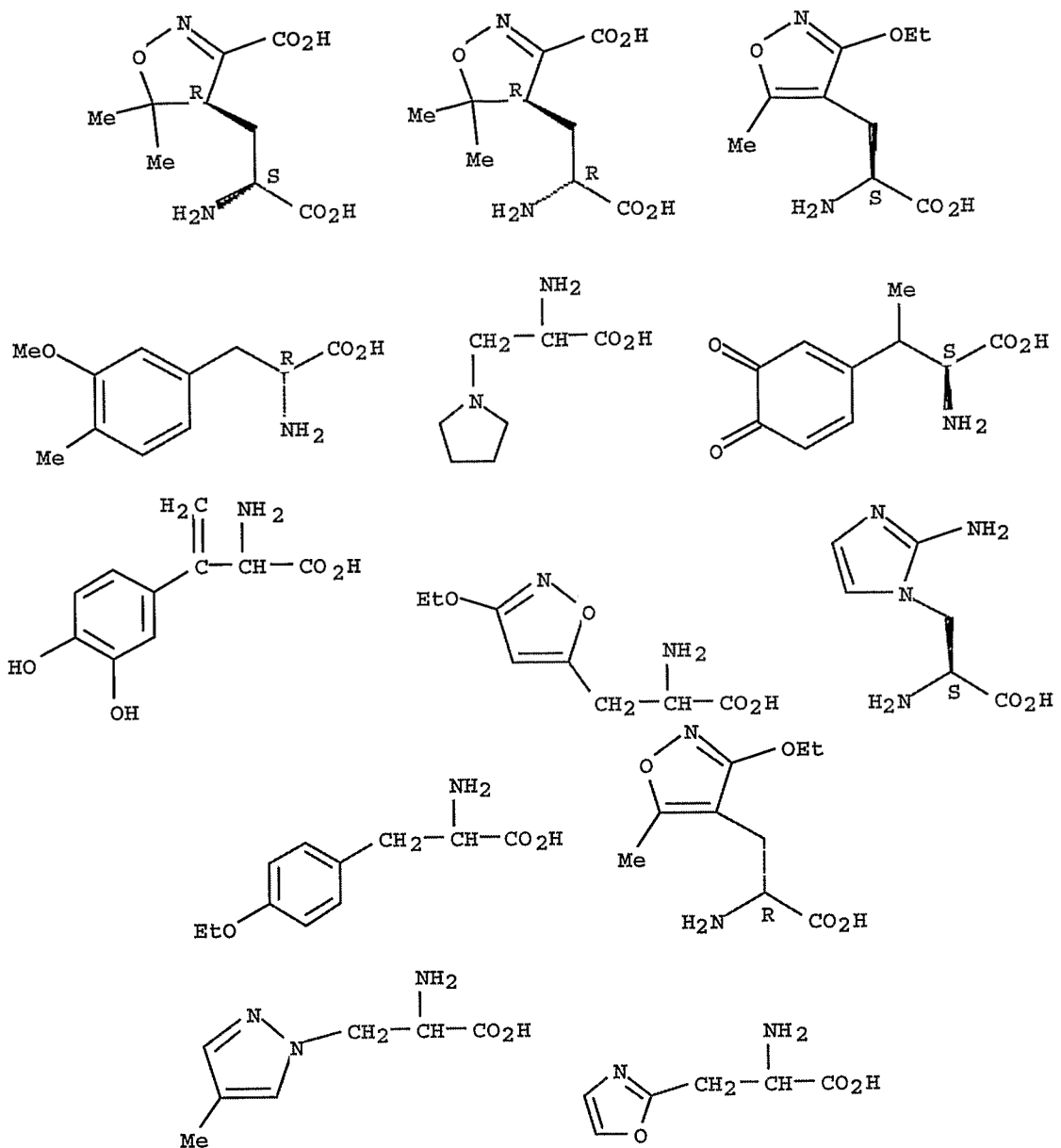
(disponible en el mercado de Chem IMPX);

5

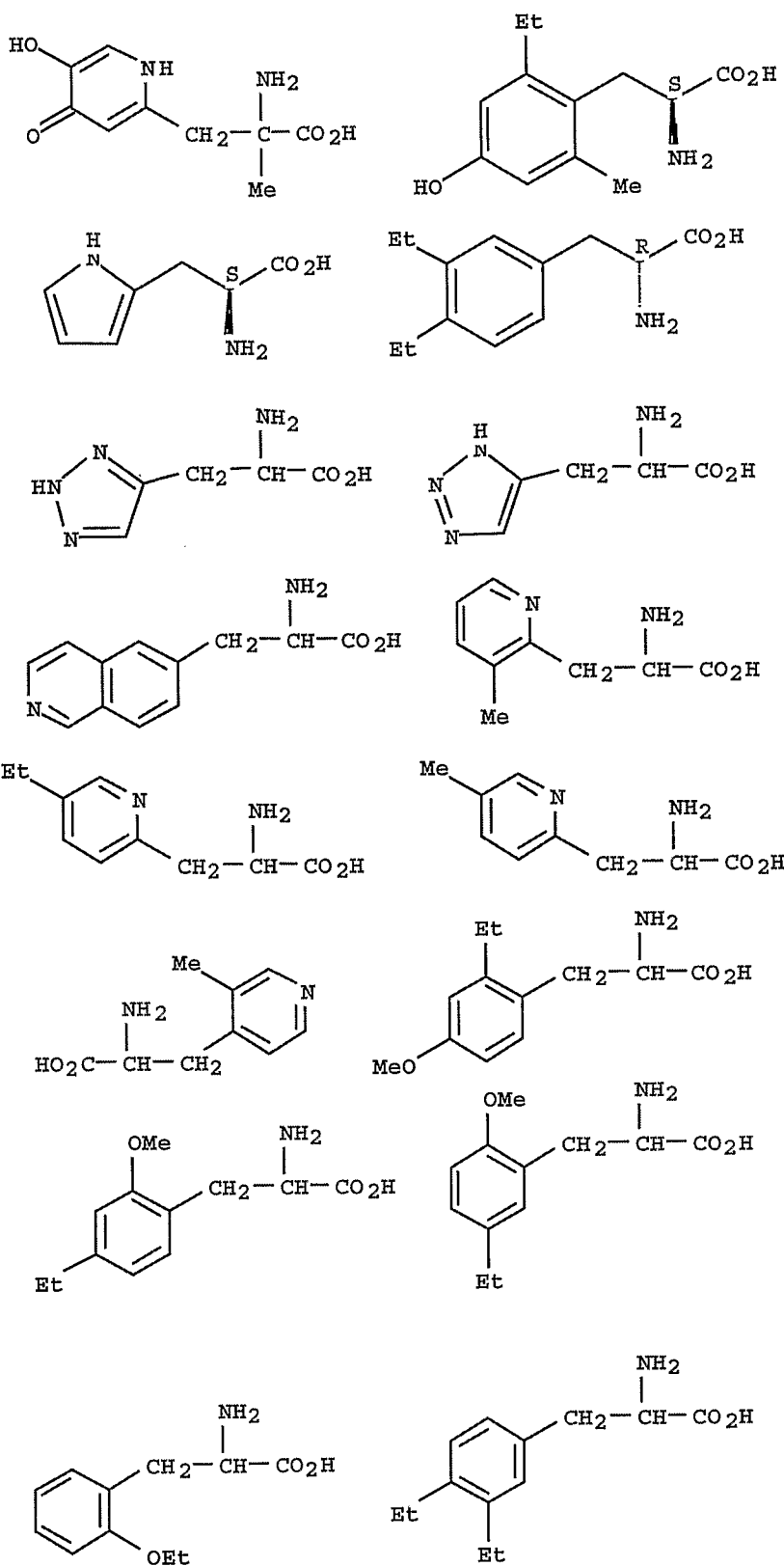


(disponibles en el mercado de Advanced ChemTech);

10

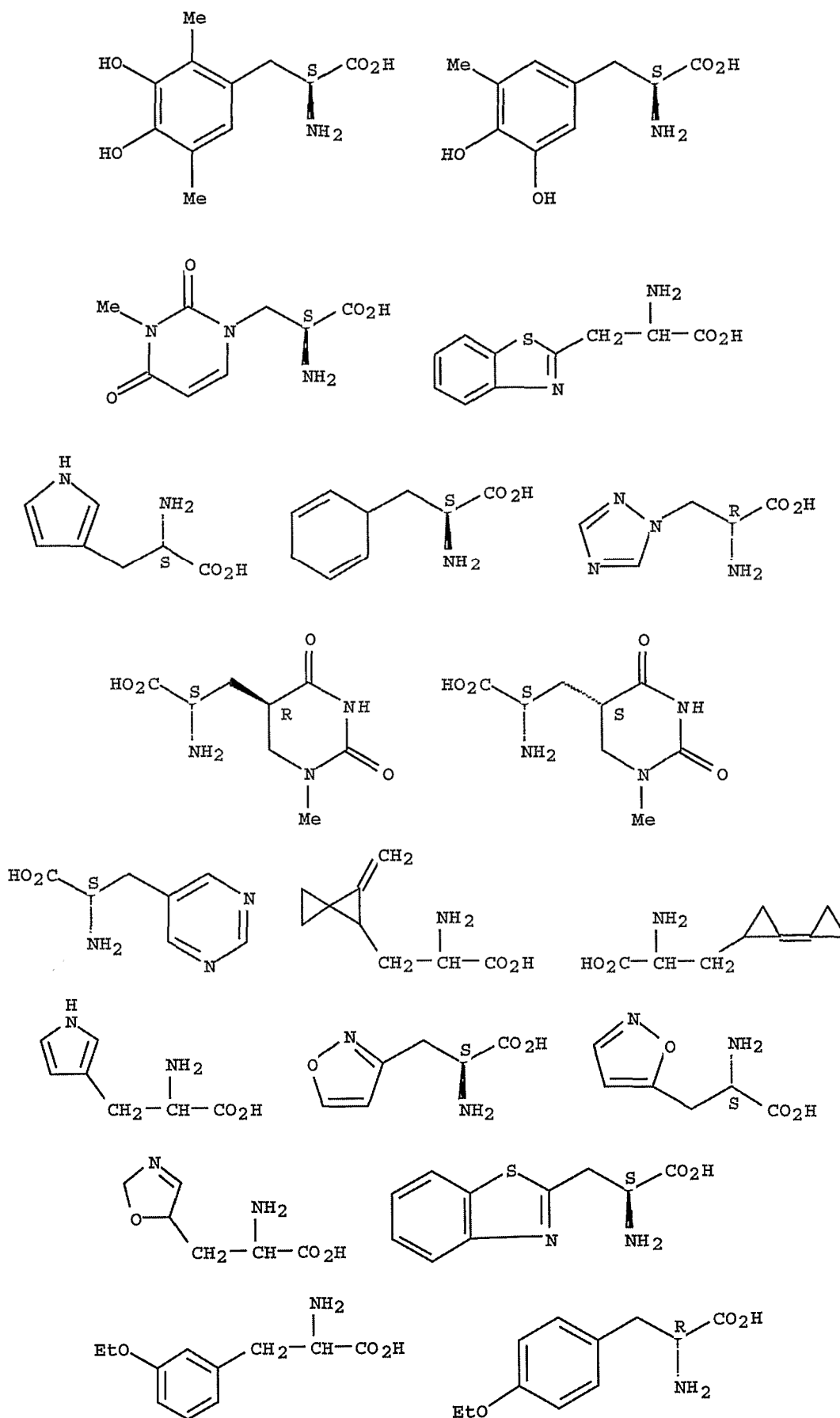


15

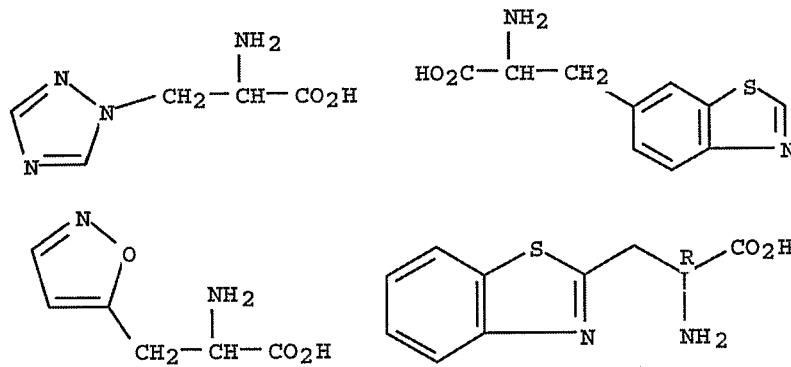


5

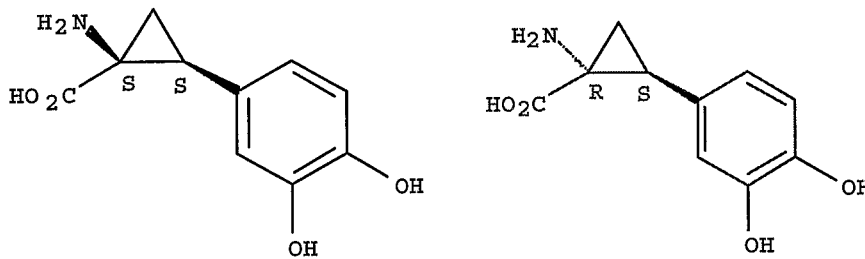
10



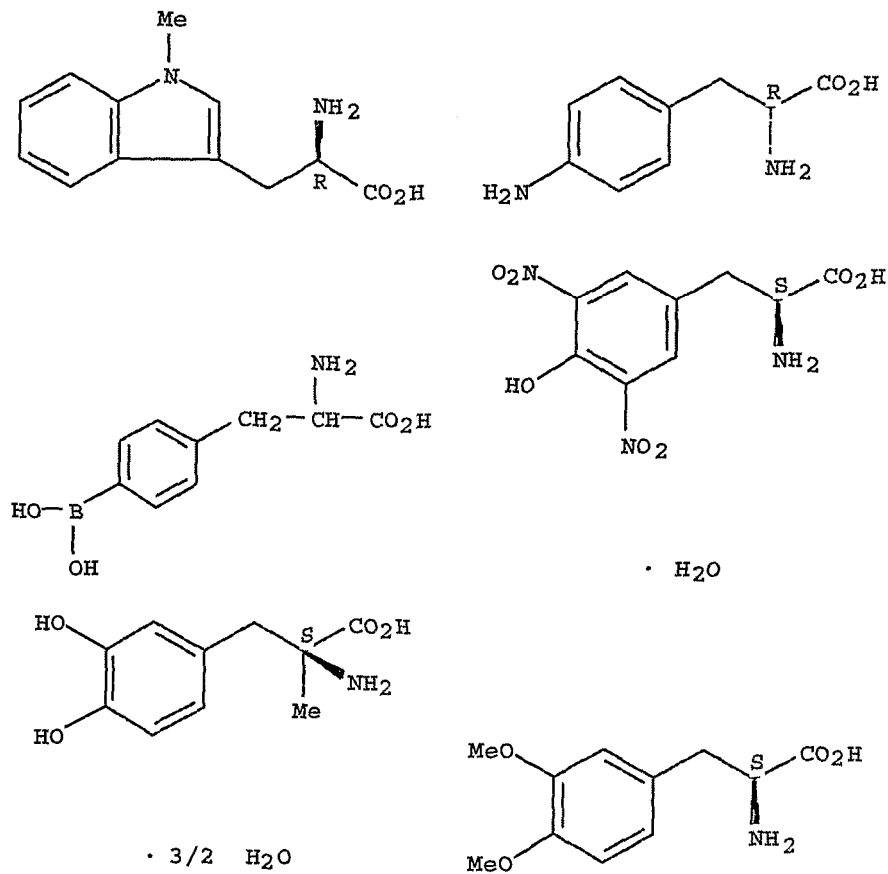
5



5 (disponibles en el mercado de Chemstep);

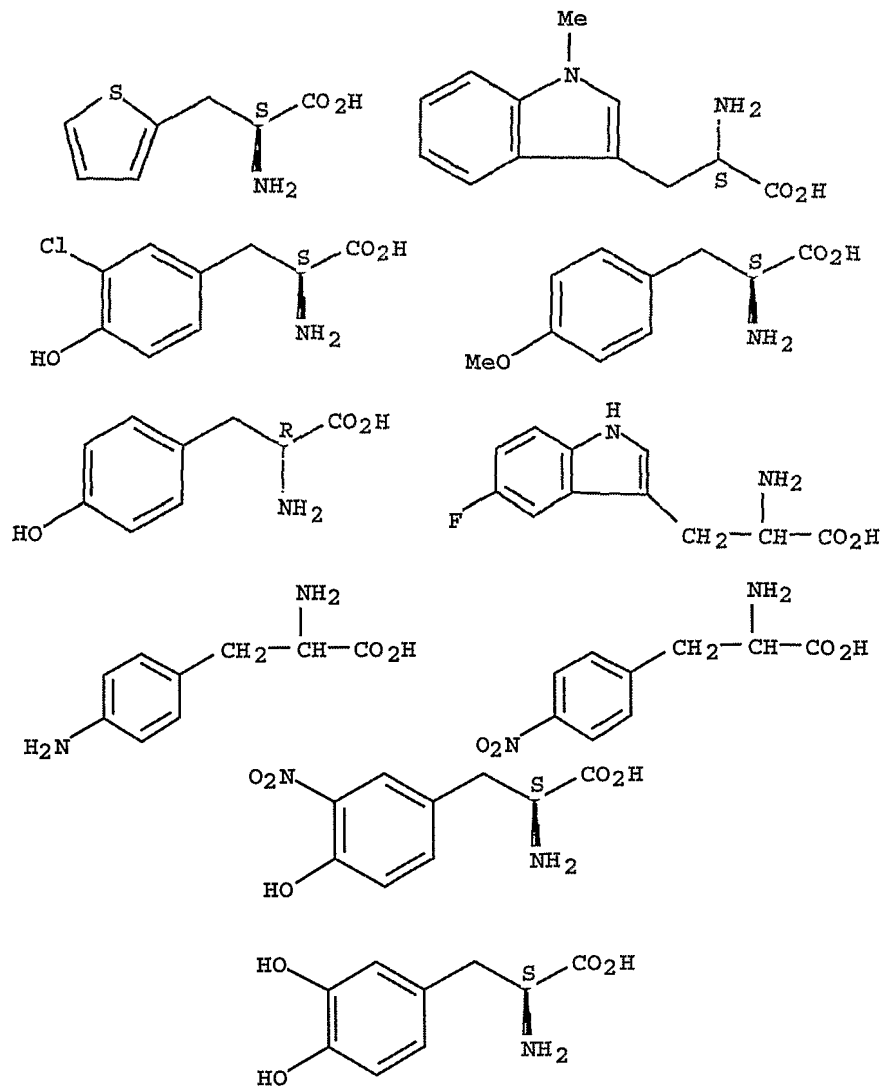


10 (disponibles en el mercado de Aldrich);

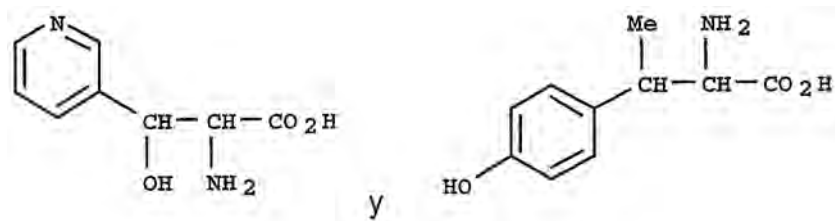


15

5

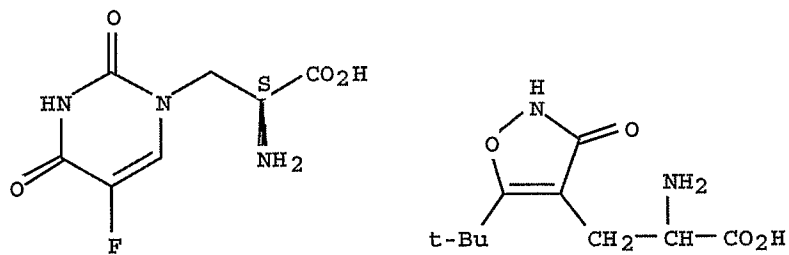


10



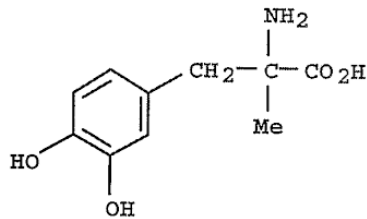
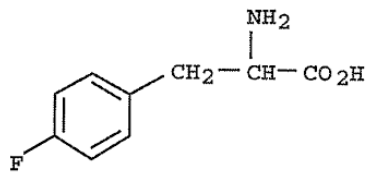
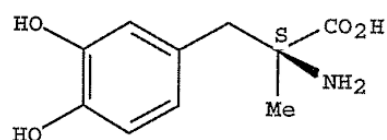
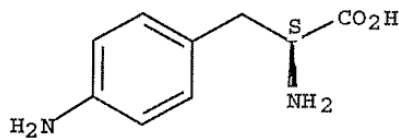
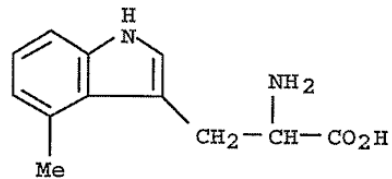
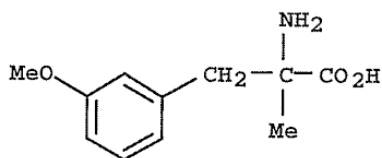
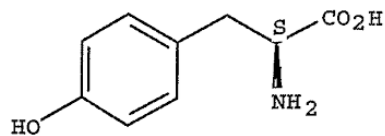
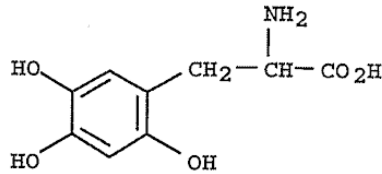
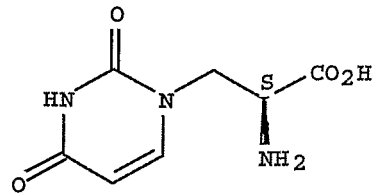
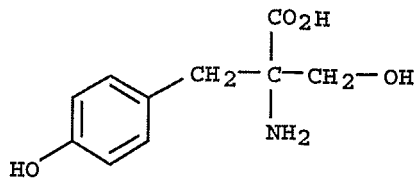
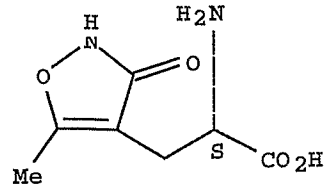
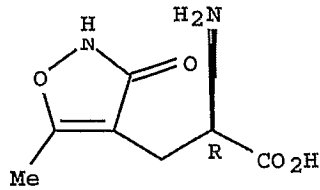
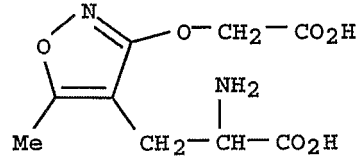
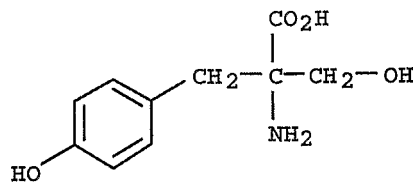
(disponibles en el mercado de Sigma);

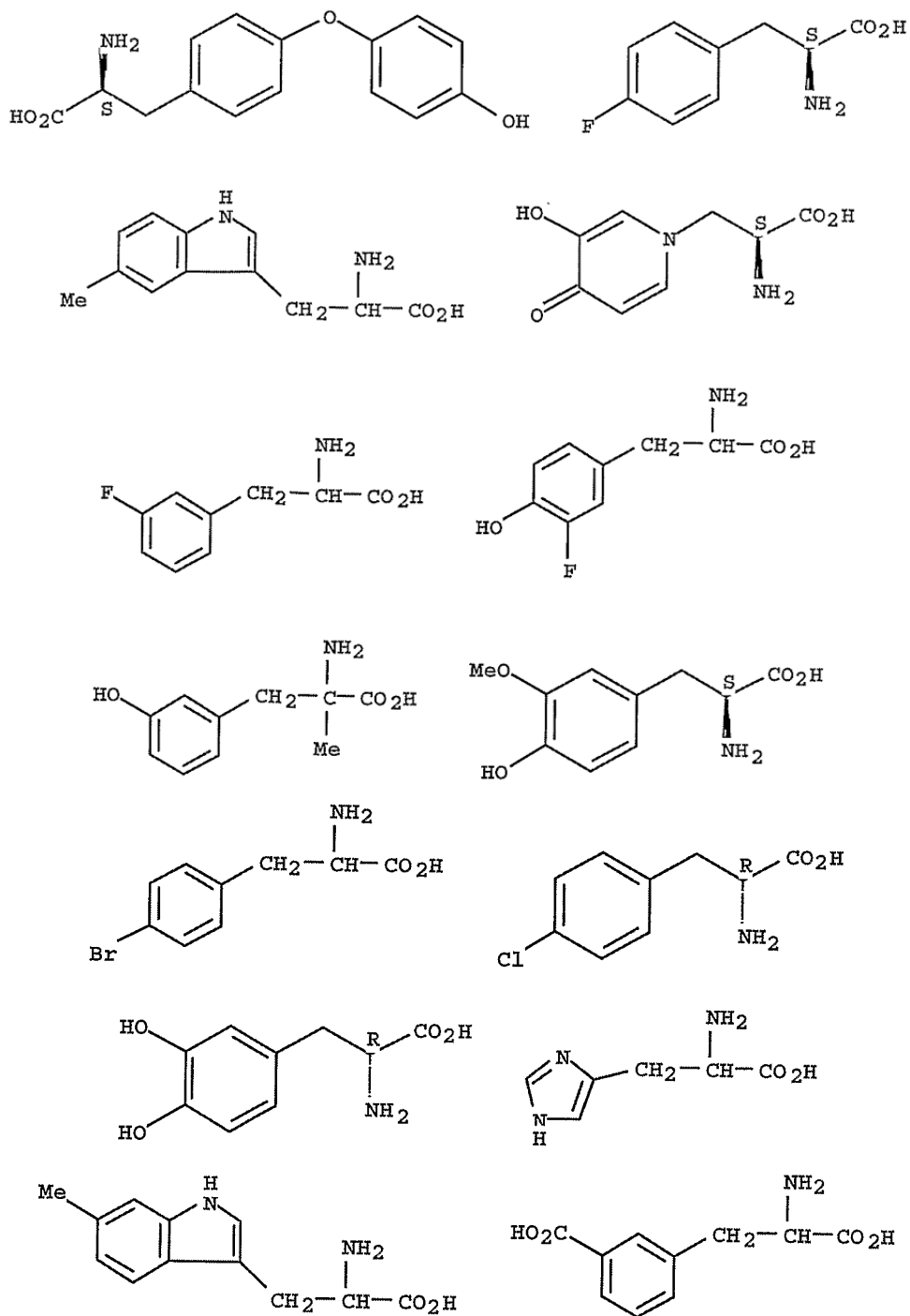
15





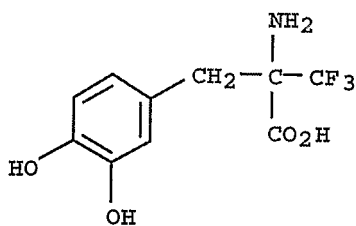
5



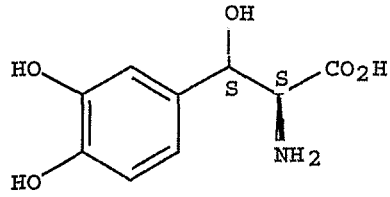
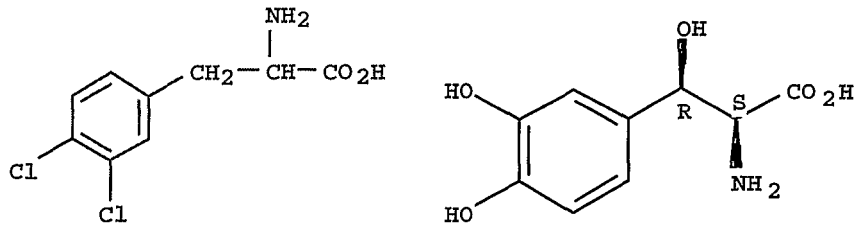


5

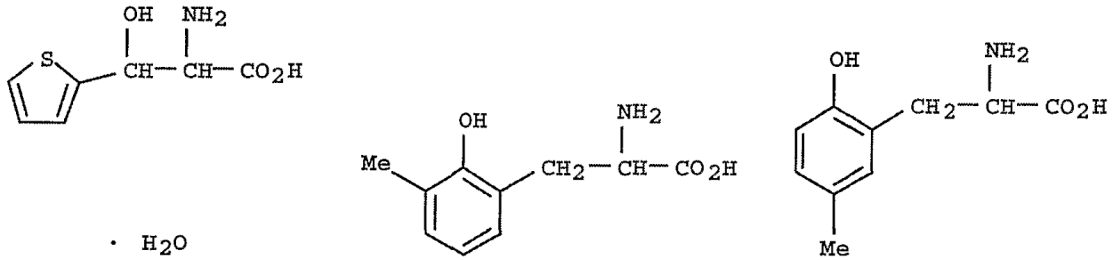
(disponibles en el mercado de Apolo Scientific Ltd.);



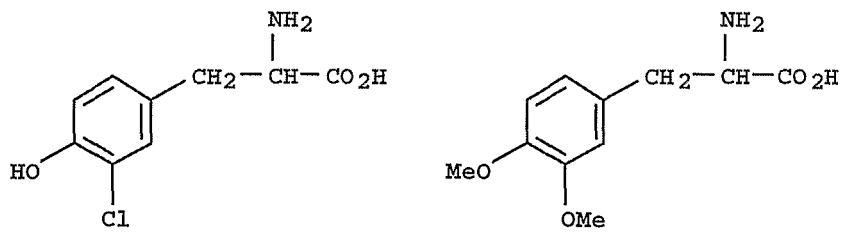
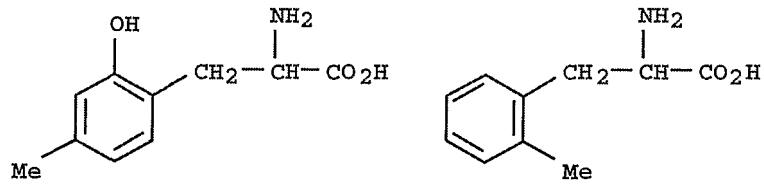
10 (disponible en el mercado de DSL Chemicals (Shanghai) Co., Ltd.);



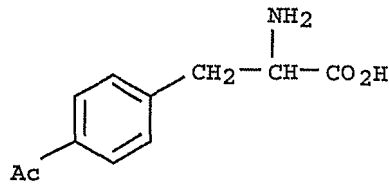
(disponibles en el mercado de Salor);



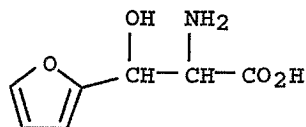
5 •  $\text{H}_2\text{O}$



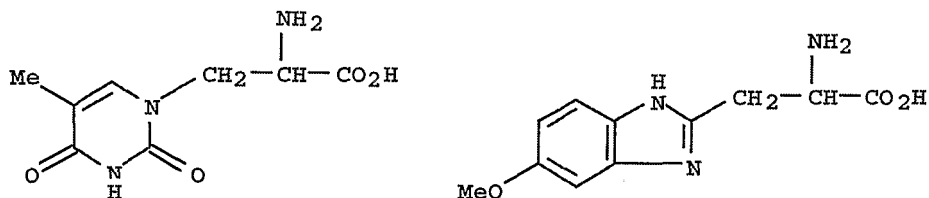
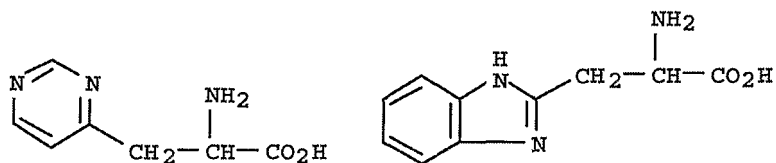
10 (disponibles en el mercado de Synchem OHG);



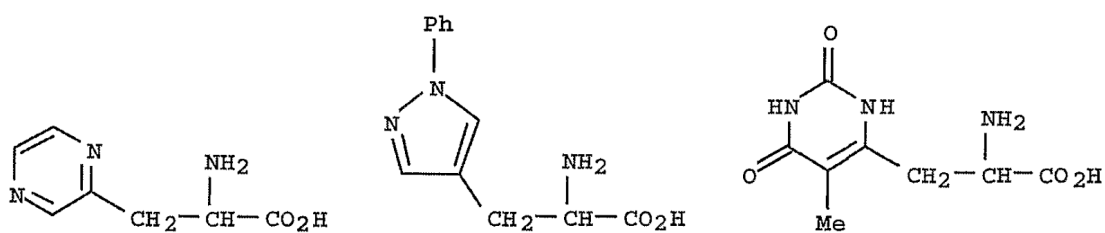
15 (disponible en el mercado de Sequoia Research Products Ltd.);



(disponible en el mercado de MicroChemistry Building Blocks);

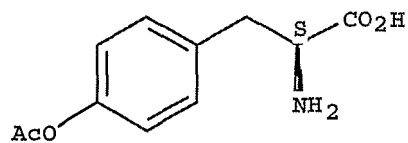


5

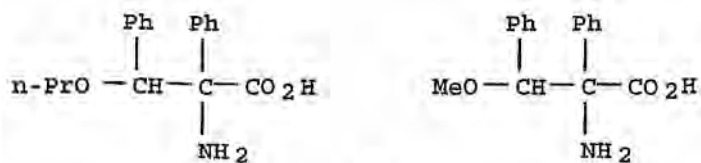


(disponibles en el mercado de Lancanster);

10

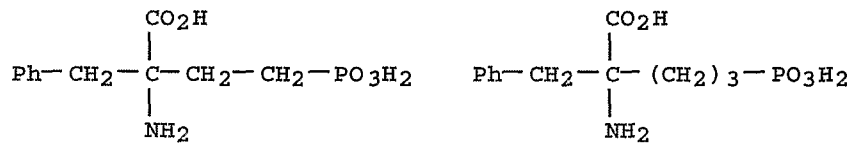
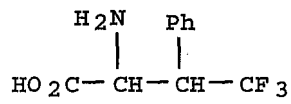
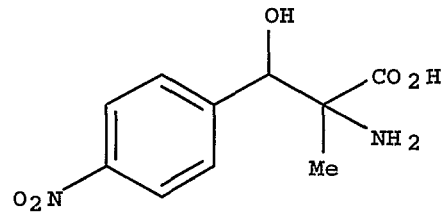
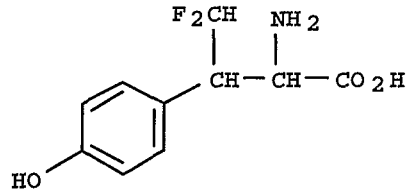
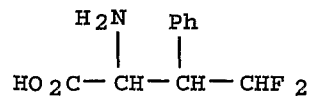


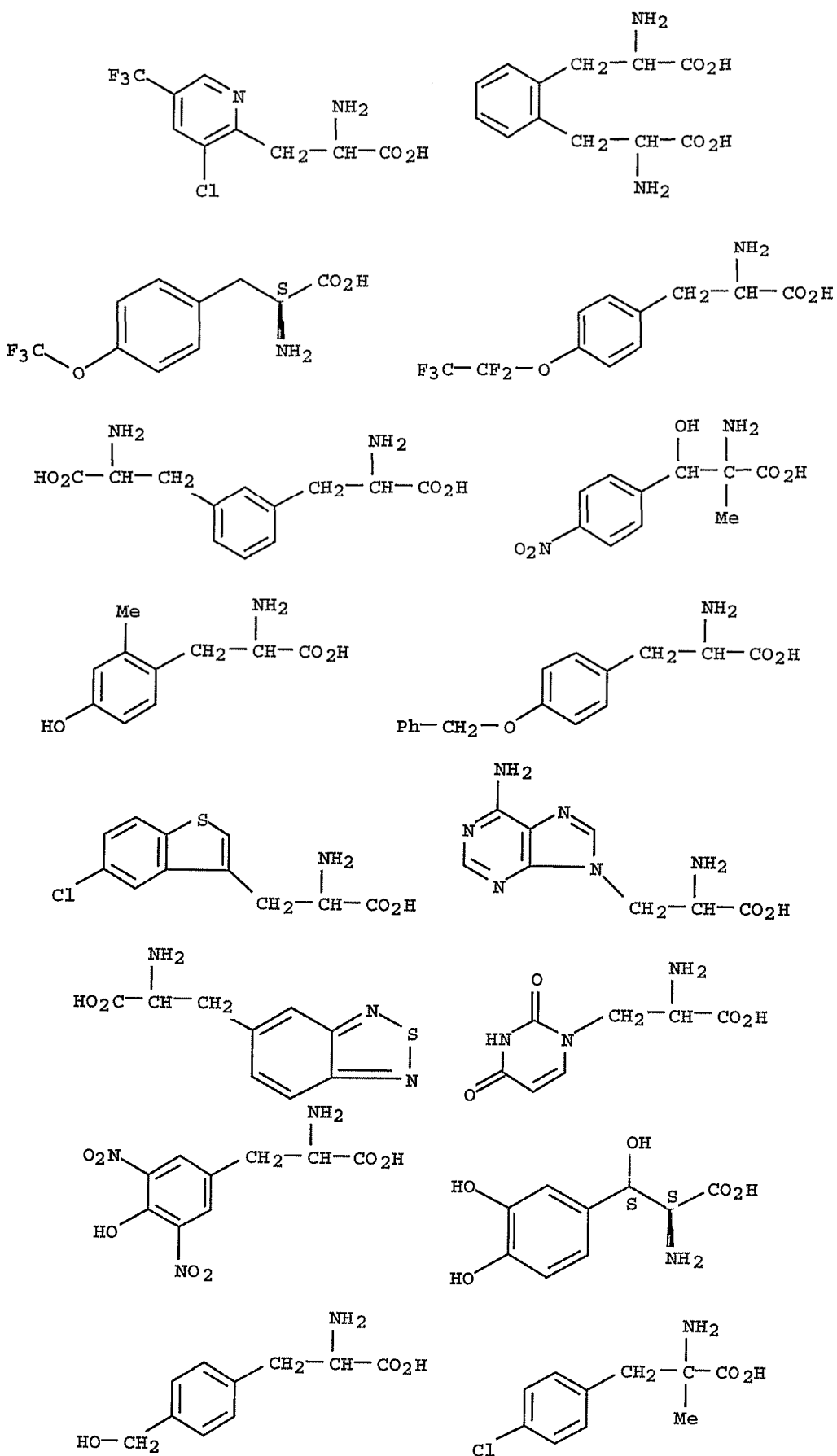
(disponible en el mercado de Ambinter, Paris, Francia);



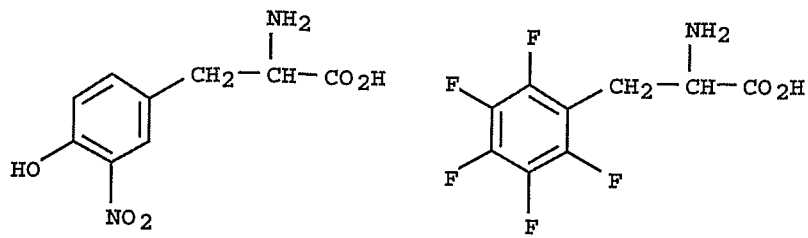
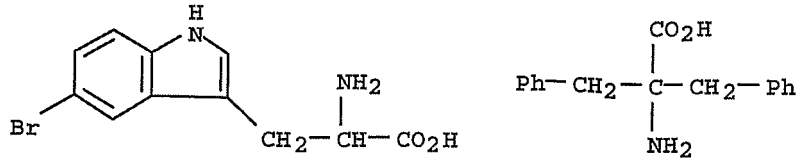
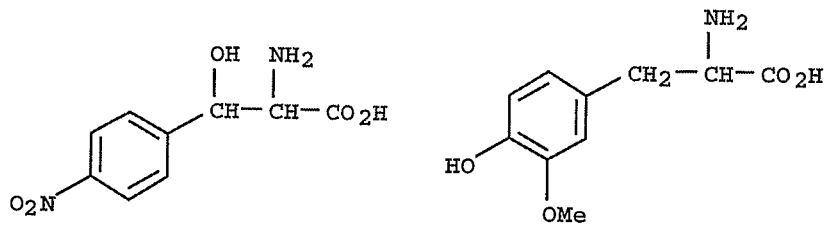
y

15

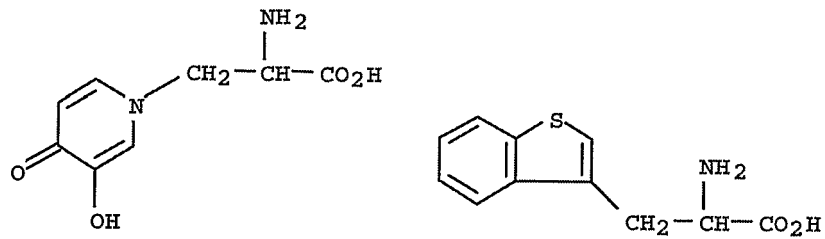


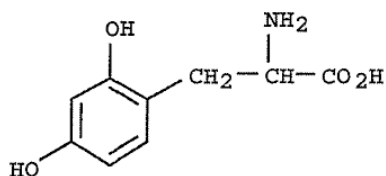
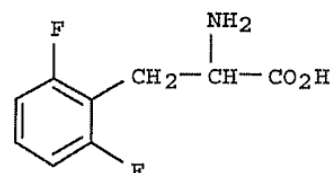
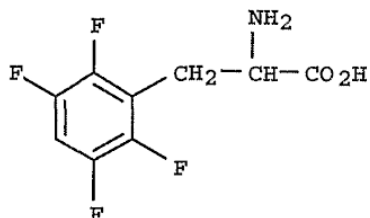
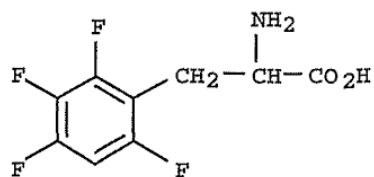
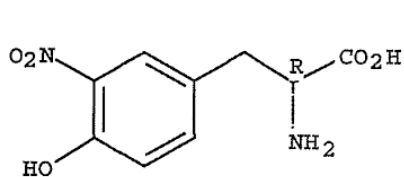
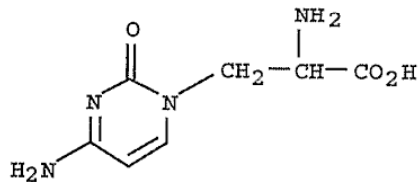
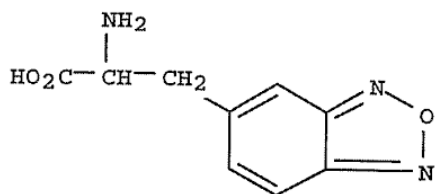
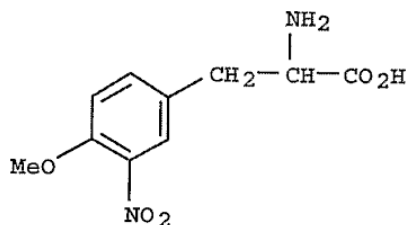
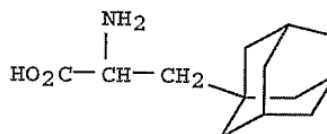
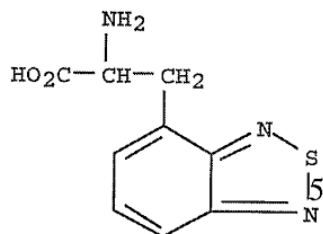
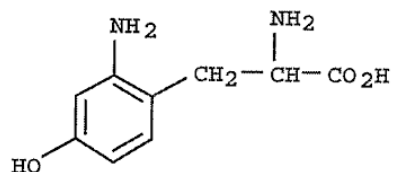
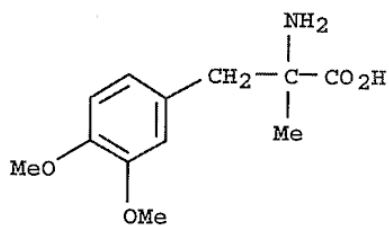


5

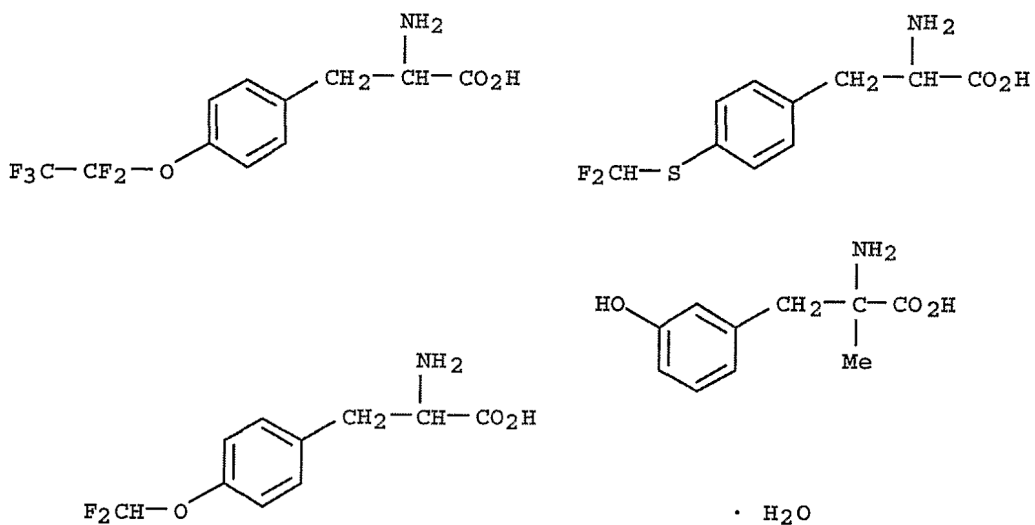


5

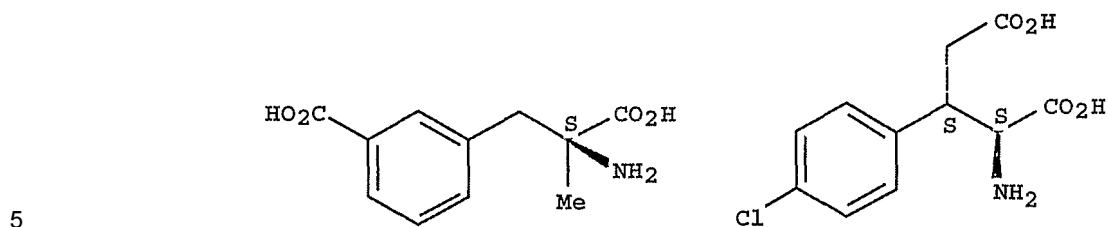




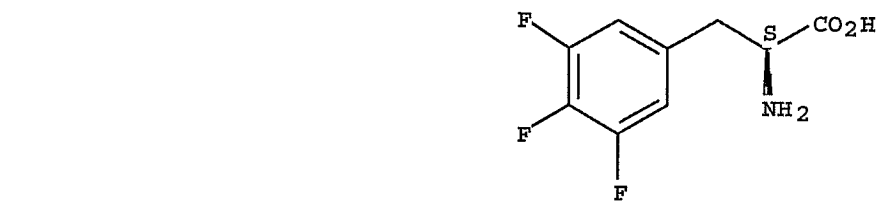




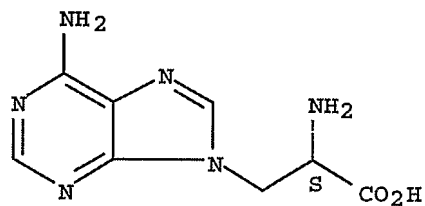
(disponibles en el mercado de Biomol Research Labs);



(disponibles en el mercado de AstaTech);

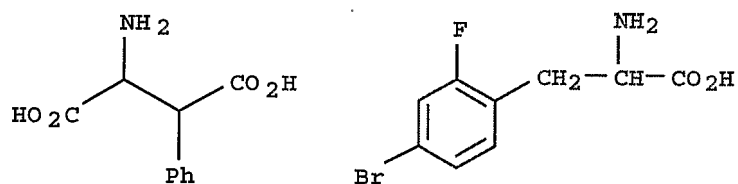


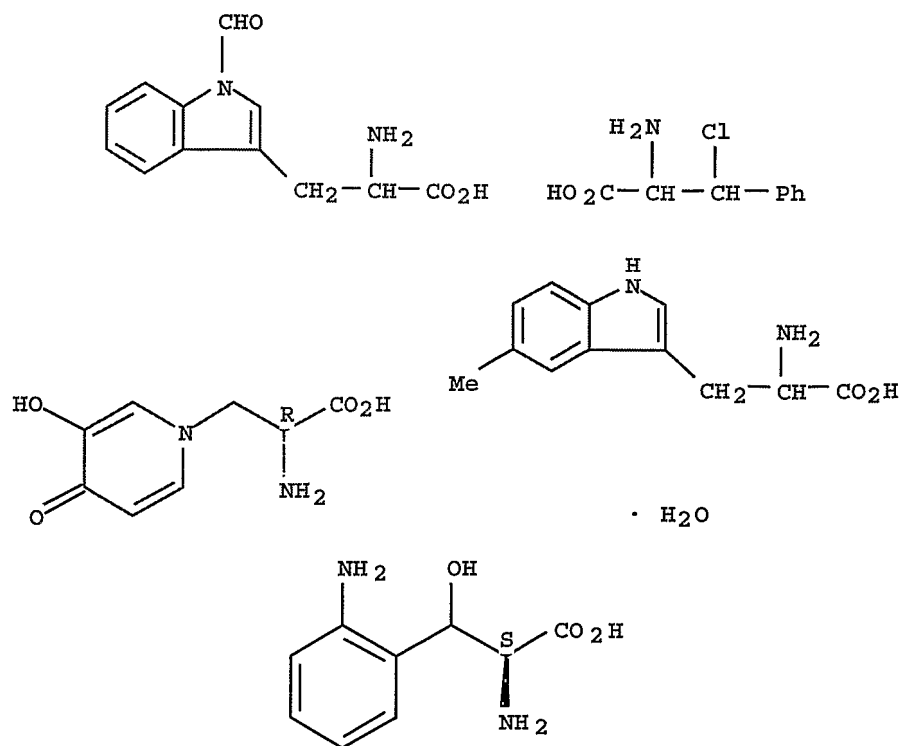
(disponible en el mercado de ChemBridge Screening Library);



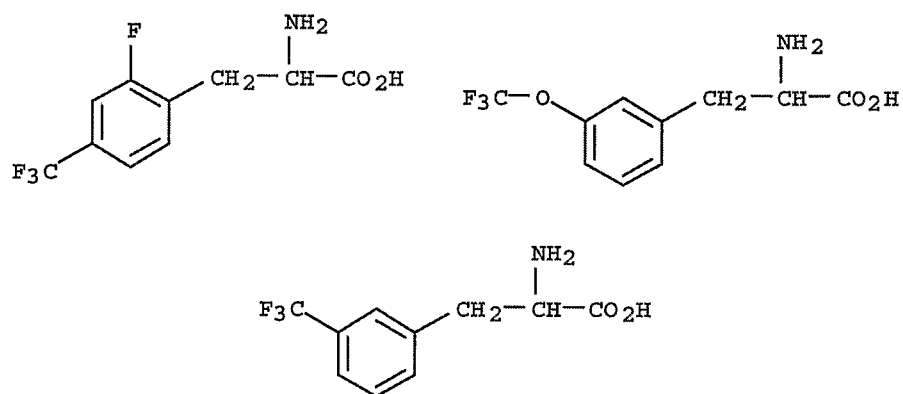
• H<sub>2</sub>O

15 (disponible en el mercado de LaboTest);

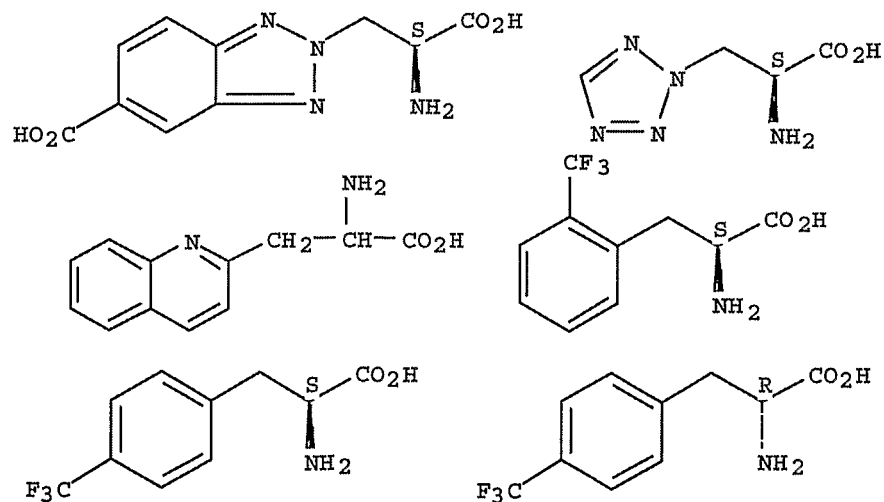




5 (disponibles en el mercado de JRD Fluorochemicals);

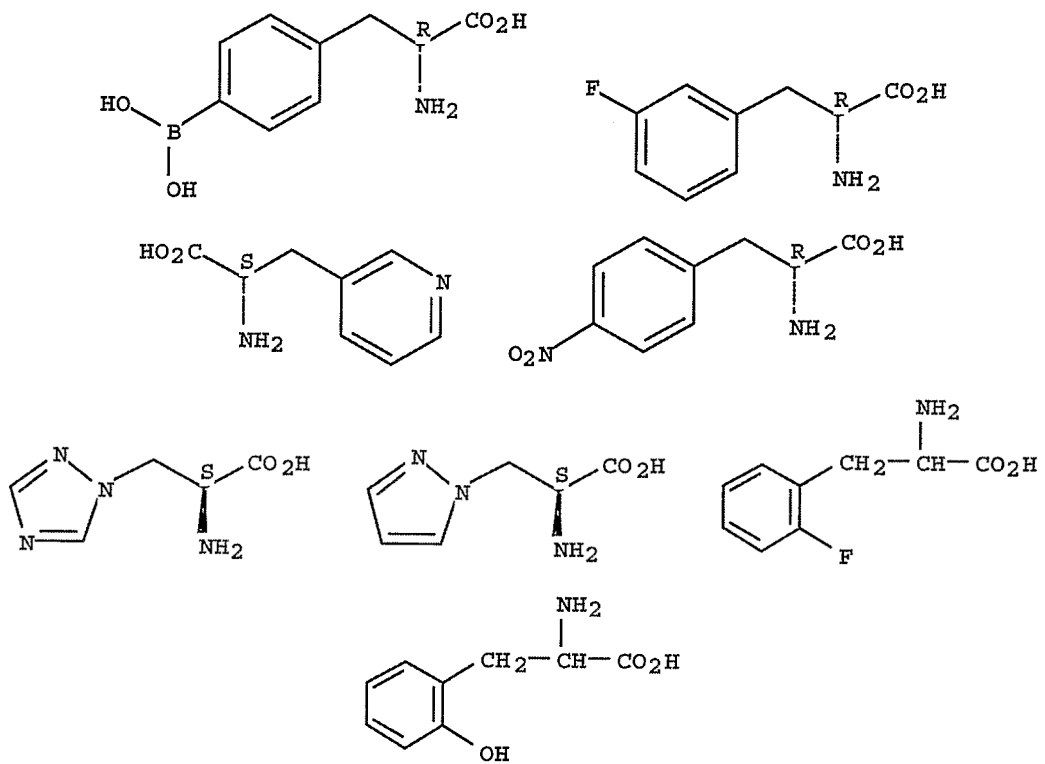


10 (disponibles en el mercado de Fluka);

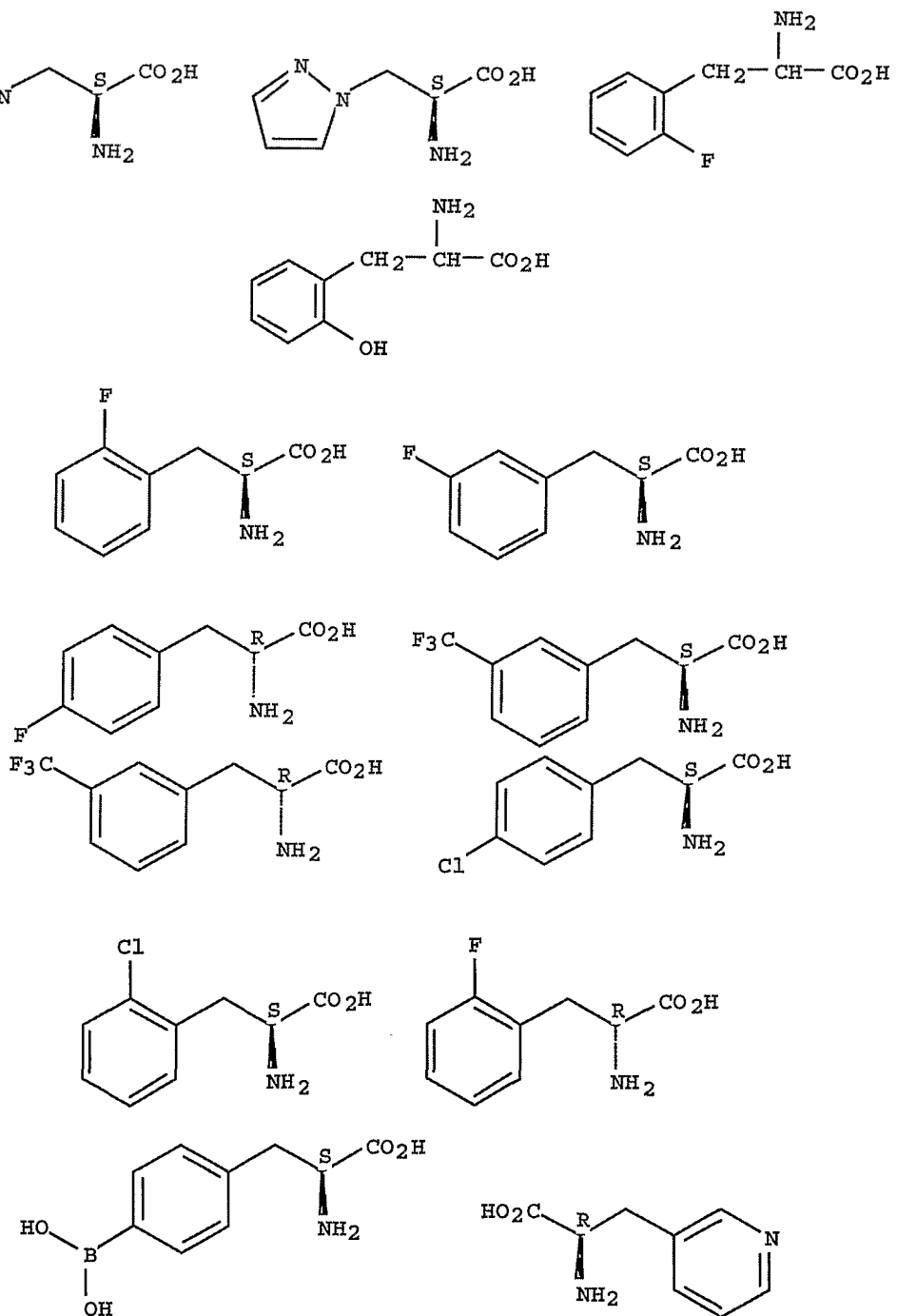


15

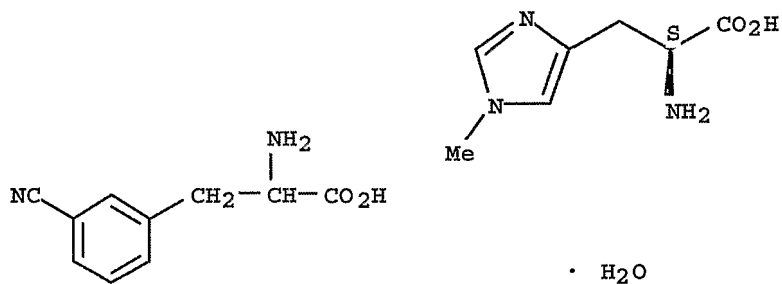
5



10

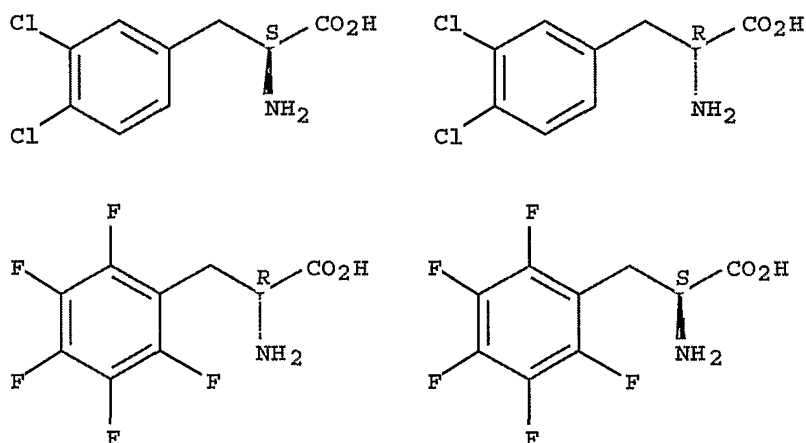


(disponibles en el mercado de Senn Chemicals AG);



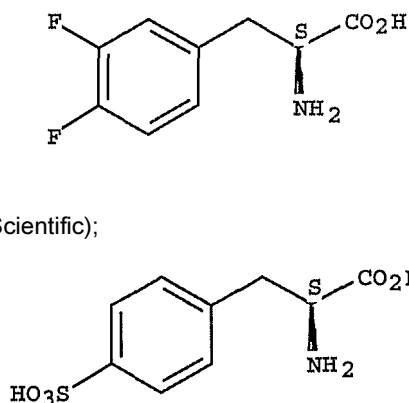
(disponibles en el mercado de Advanced ChemTech);

5



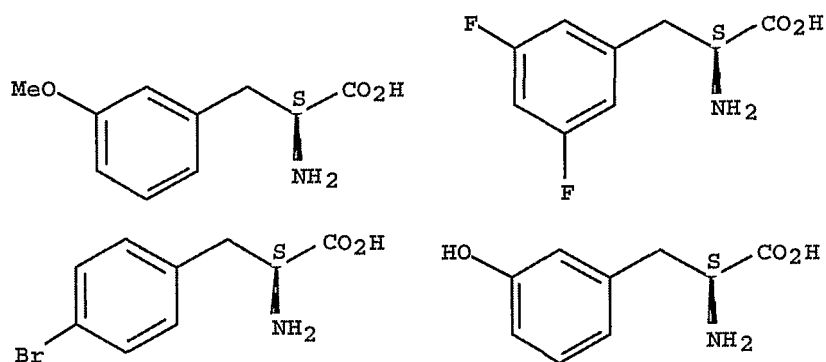
10

(disponibles en el mercado de Tyger Scientific);



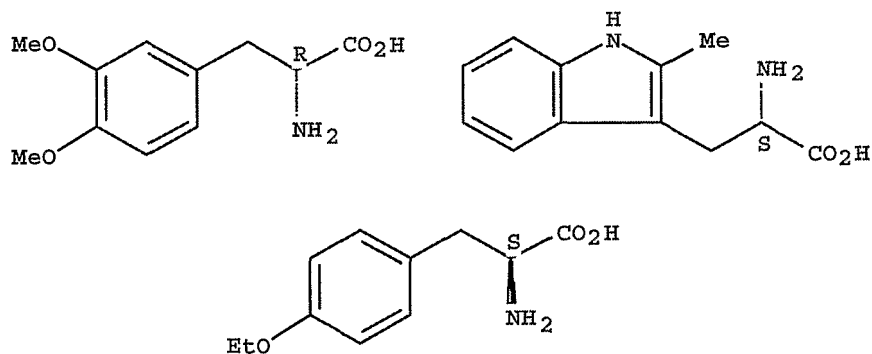
15

(disponible en el mercado de AMRI Fine Chemicals);

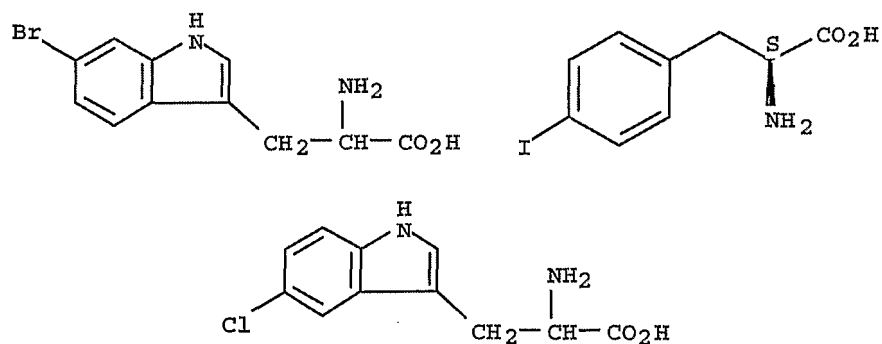


20

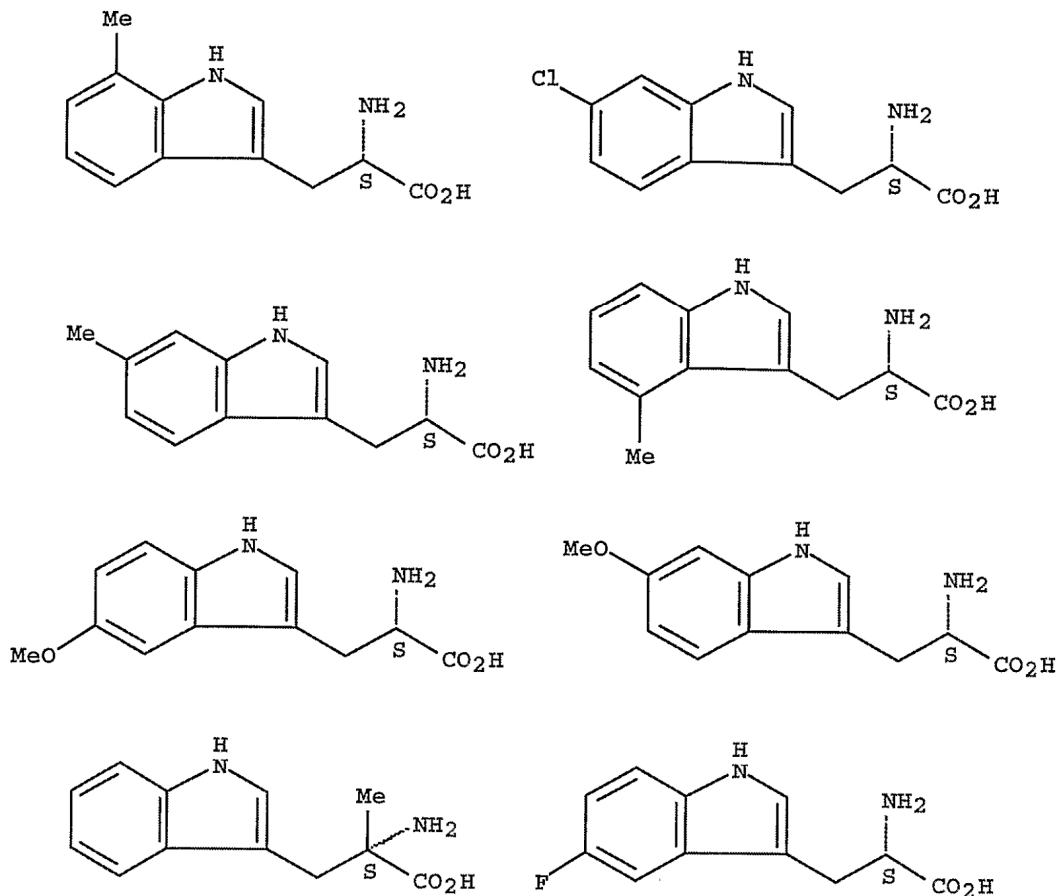
(disponibles en el mercado de Synthetech);



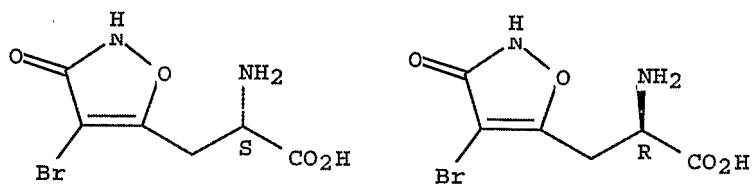
5 (disponibles en el mercado de Apin Chemicals);



10 (disponibles en el mercado de Biocatalytics, Inc.);

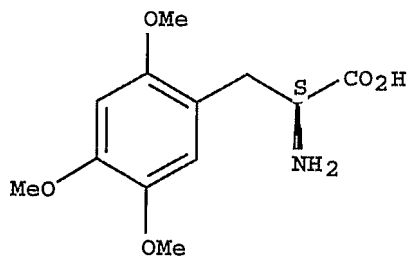


(disponibles en el mercado de AG Scientific);

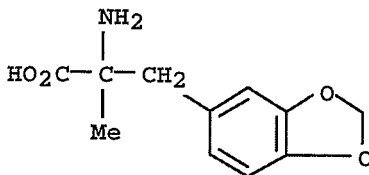


(disponibles en el mercado de Synthelec);

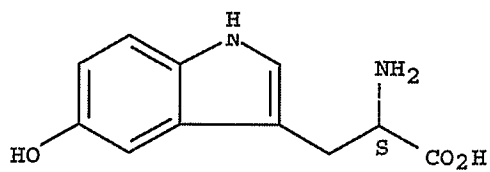
5



(disponible en el mercado de TimTec Stock Library);



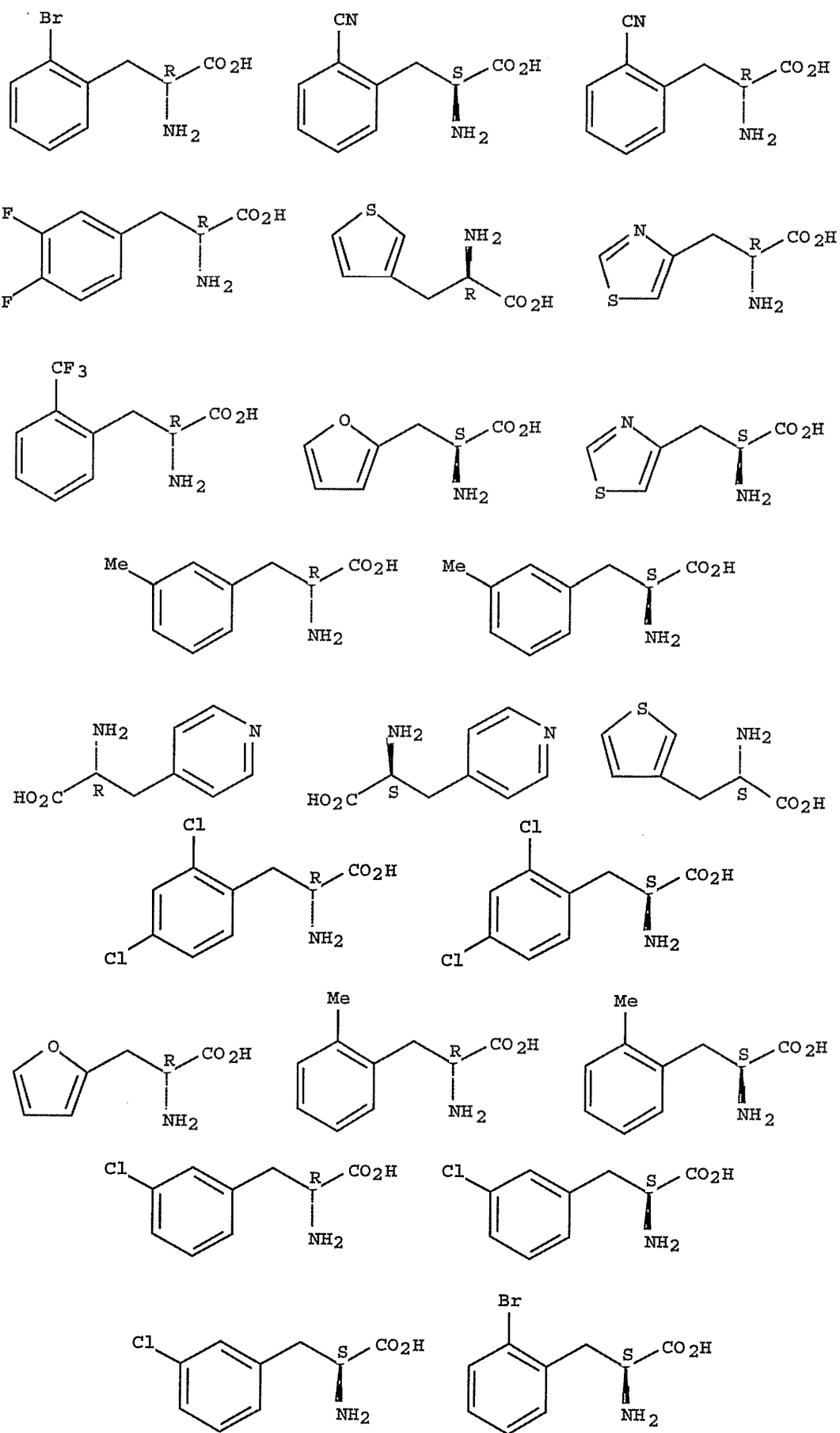
10



• H<sub>2</sub>O

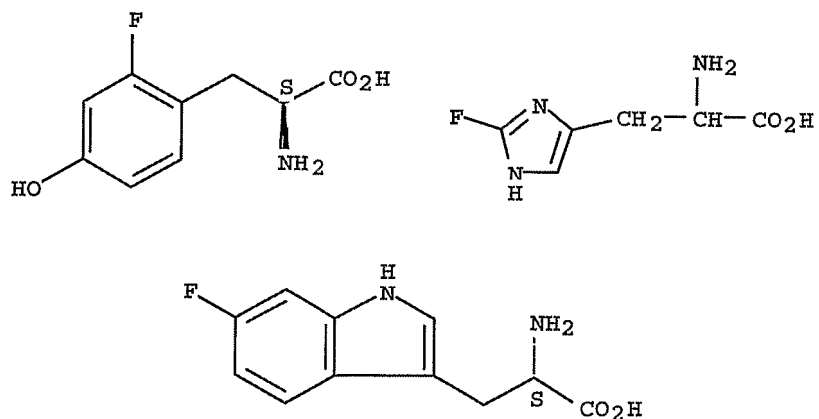
(disponibles en el mercado de CSPS);

15

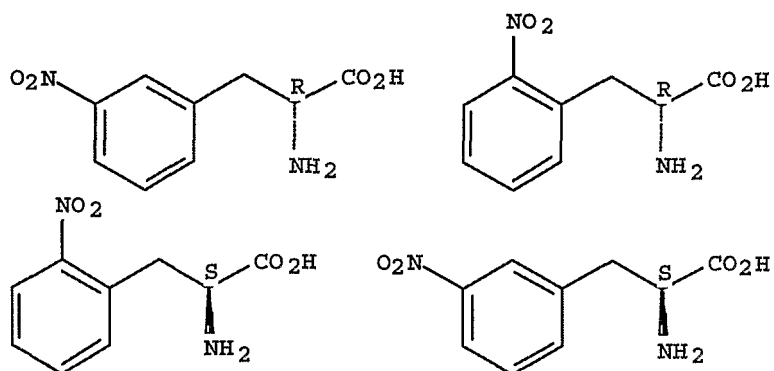


5

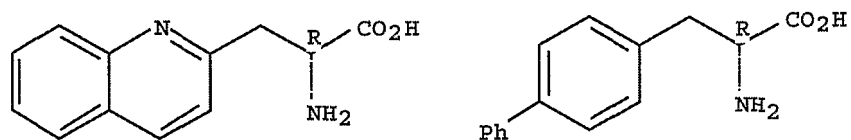
(disponibles en el mercado de Qventas);



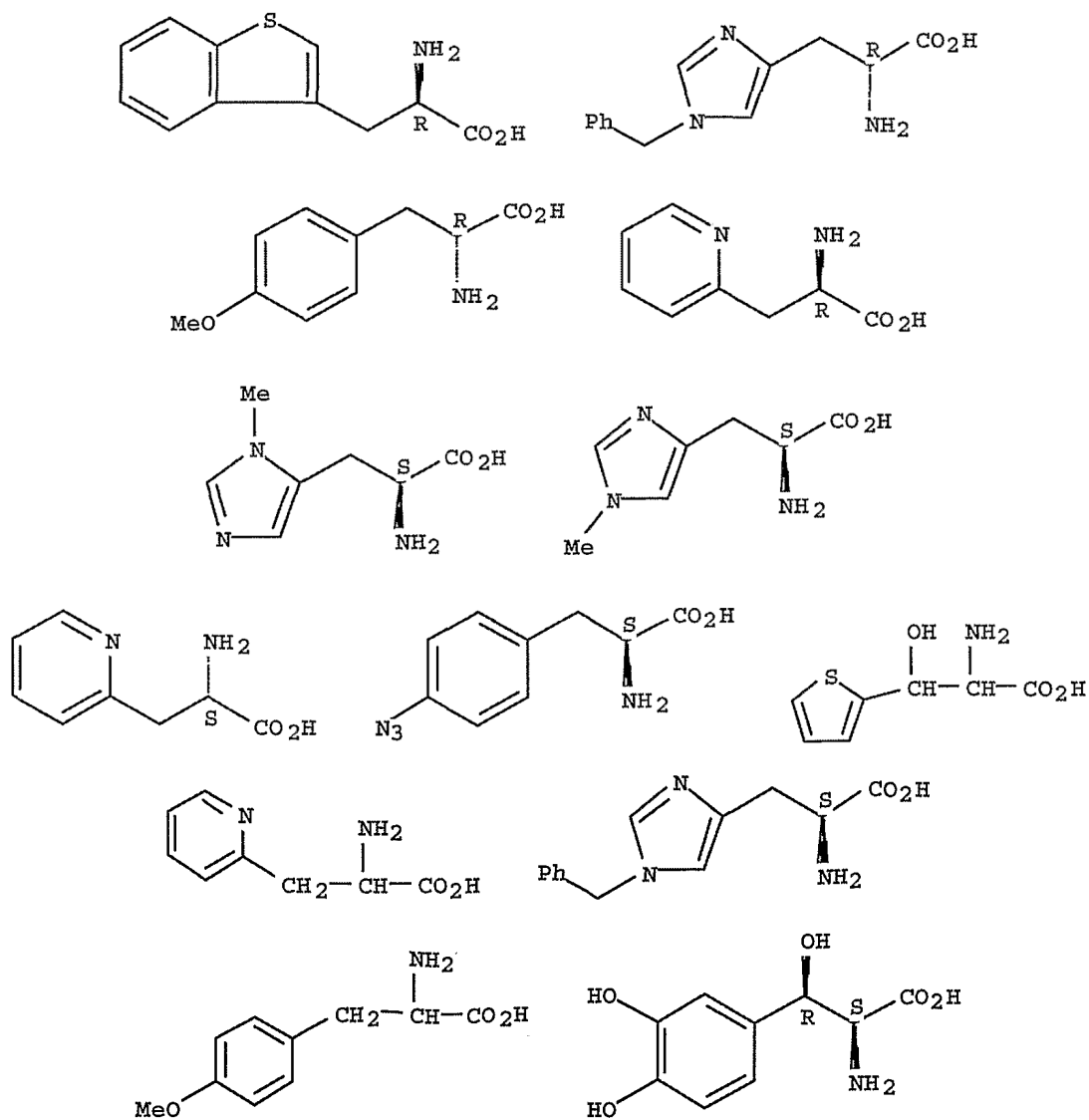
5 (disponibles en el mercado de Encyclopedia of Amino Acid Analogs and Chiral Building Blocks);



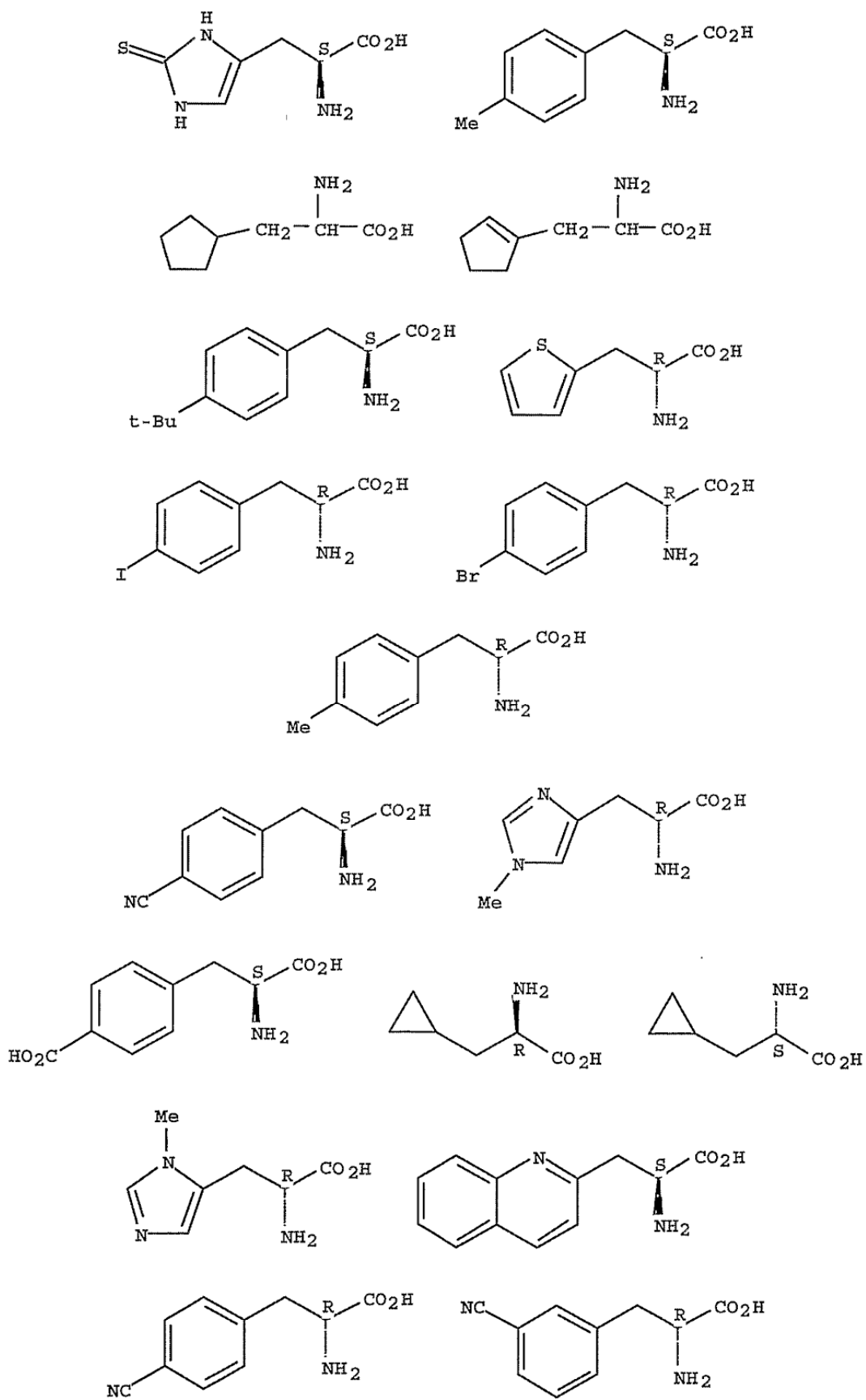
10 (disponibles en el mercado de Bachem);

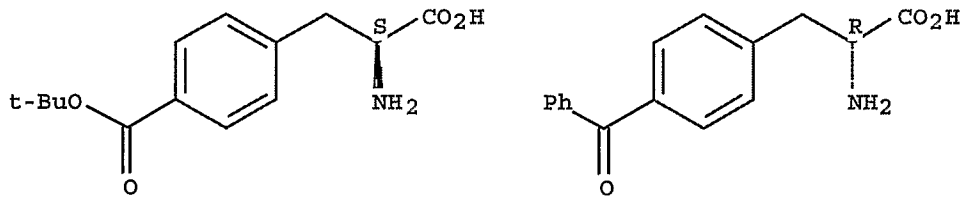






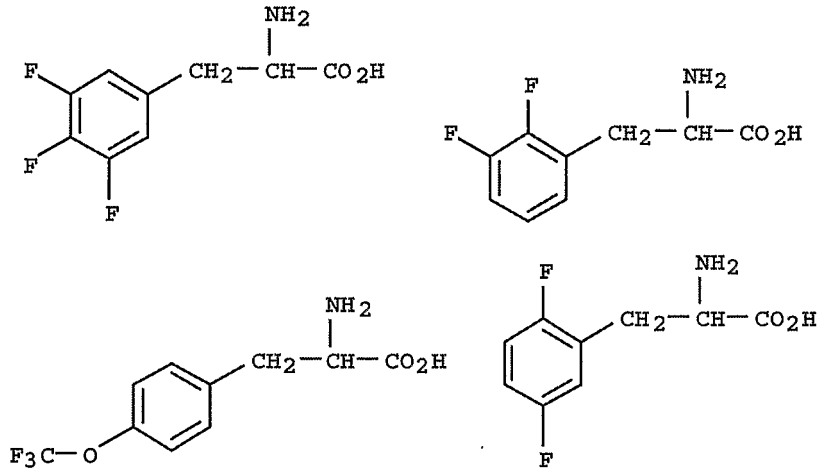
5



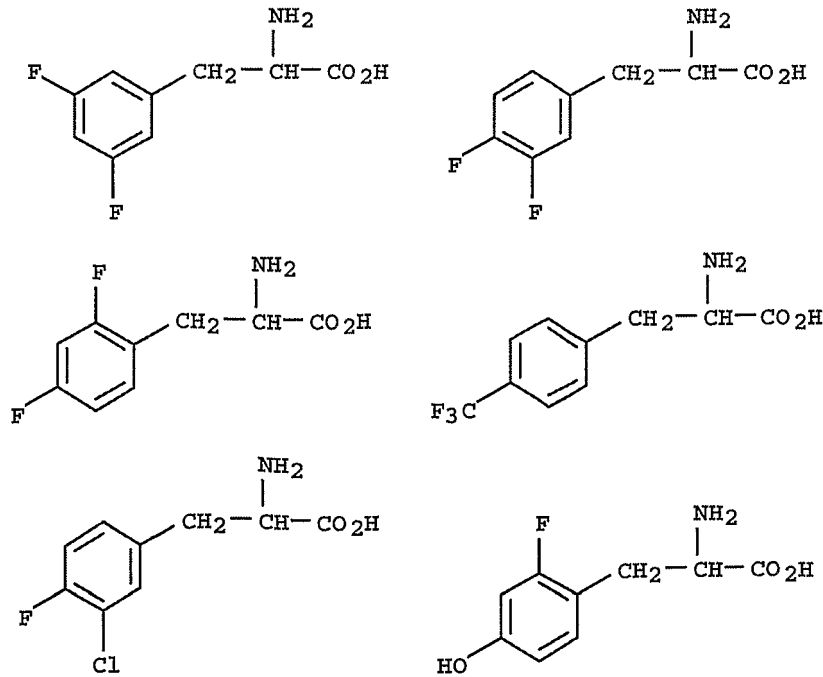


(disponibles en el mercado de Matrix Scientific);

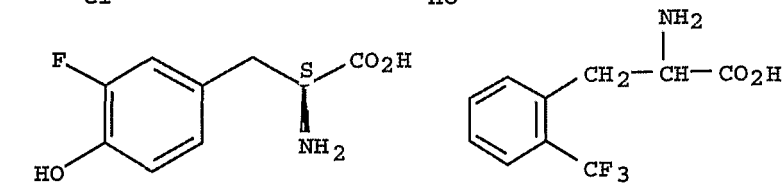
5



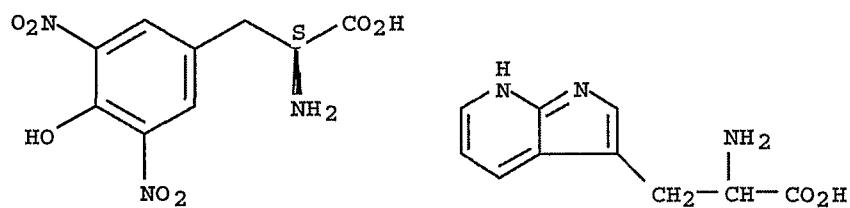
10



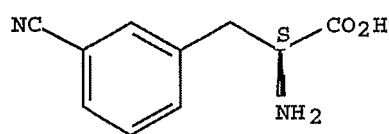
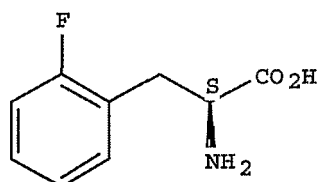
15



(disponibles en el mercado de TCI America);

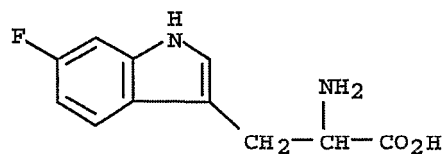
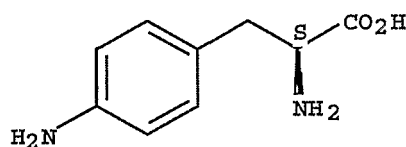


(disponibles en el mercado de Acros);

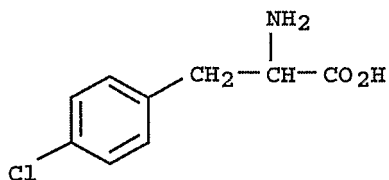


5  $\cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$

(disponible en el mercado de Organics);

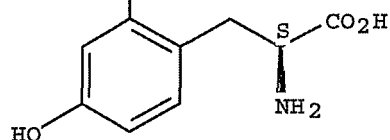
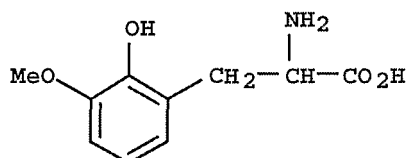
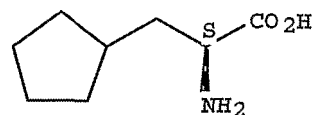
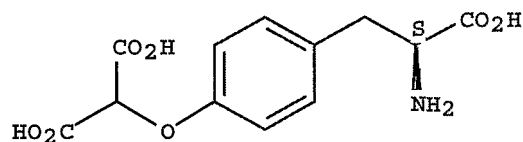


$\cdot \text{H}^+$

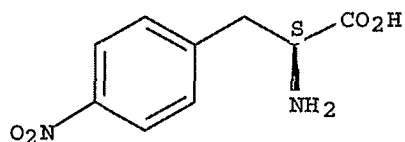
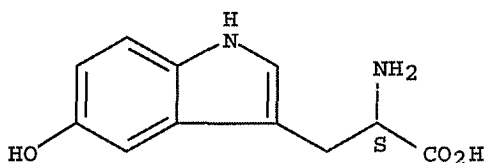


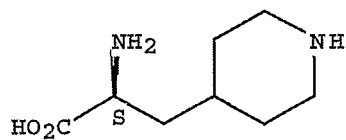
10

(disponibles en el mercado de ChemPacific);

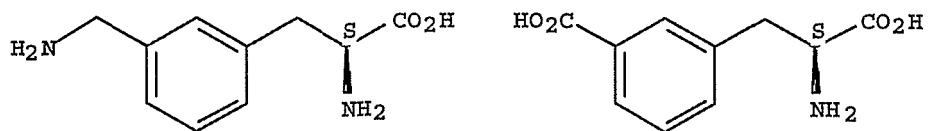


15



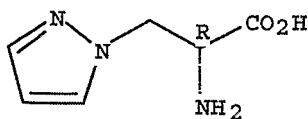


(disponible en el mercado de Rare Chemicals GmbH);



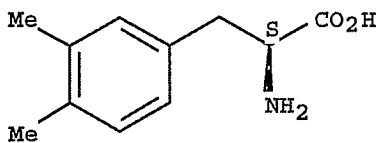
5

(disponible en el mercado de AstaTech);

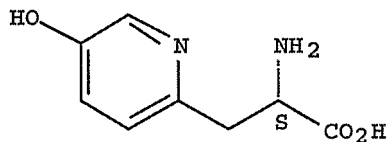


10

(disponible en el mercado de Austin);

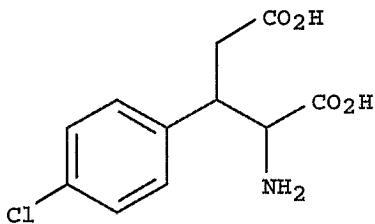


15 (disponible en el mercado de Advanced Asymmetrics, Inc.);

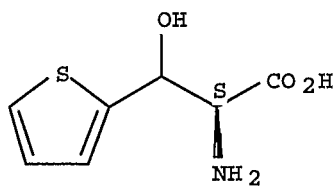


20

(disponible en el mercado de Tocris Cookson Inc.);



(disponible en el mercado de Chem Service, Inc.); y



25

• H<sub>2</sub>O

(disponible en el mercado de Synchem OHG, Alemania).

**Ejemplo 24 - Síntesis de compuestos de MMAZ**

5 También pueden prepararse compuestos de MMAZ usando los siguientes análogos de fenilalanina disponibles en el mercado, ya sea en forma de sus aminoácidos protegidos o no protegidos incorporados en la síntesis en fase sólida o en solución como se ha descrito anteriormente: 4-cloro-fenilalanina, 4-fluoro-fenilalanina, 4-nitro-fenilalanina, N- $\alpha$ -metil-fenilalanina,  $\alpha$ -metil-fenilalanina, ácido glutámico, ácido aspártico, triptófano, isoleucina, leucina, metionina, tirosina, glutamina, treonina, valina, asparagina, fenilglicina, O-bencil-serina, O-t-butil-serina, O-t-butil-treonina, 10 homofenilalanina, metionina-DL-sulfóxido, metionina-sulfona, ácido  $\alpha$ -aminobutírico, ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, ácido 4-amino-1-piperidina-4-carboxílico, ácido 4-amino-tetrahidropiran-4-carboxílico, ácido aspártico, benzotiazol-2-il-alanina,  $\alpha$ -t-butil-glicina, ciclohexilalanina, norleucina, norvalina, S-acetamidometilo-penicilamina,  $\beta$ -3-piperidin-3-il-alanina, piperidinilo-glicina, pirrolidinilalanina, selenocisteína, tetrahidropiran-4-il-glicina, O-bencil-treonina, O-t-butil-tirosina, 3-(p-acetilfenil)alanina, 3-fenilserina y ácido 1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-3-carboxílico.

**Ejemplo 25 - Síntesis de MC-MMAZ**

Puede prepararse maleimidocaproil-MeVal-Val-Dil-Dap-Z siguiendo el Procedimiento general S.

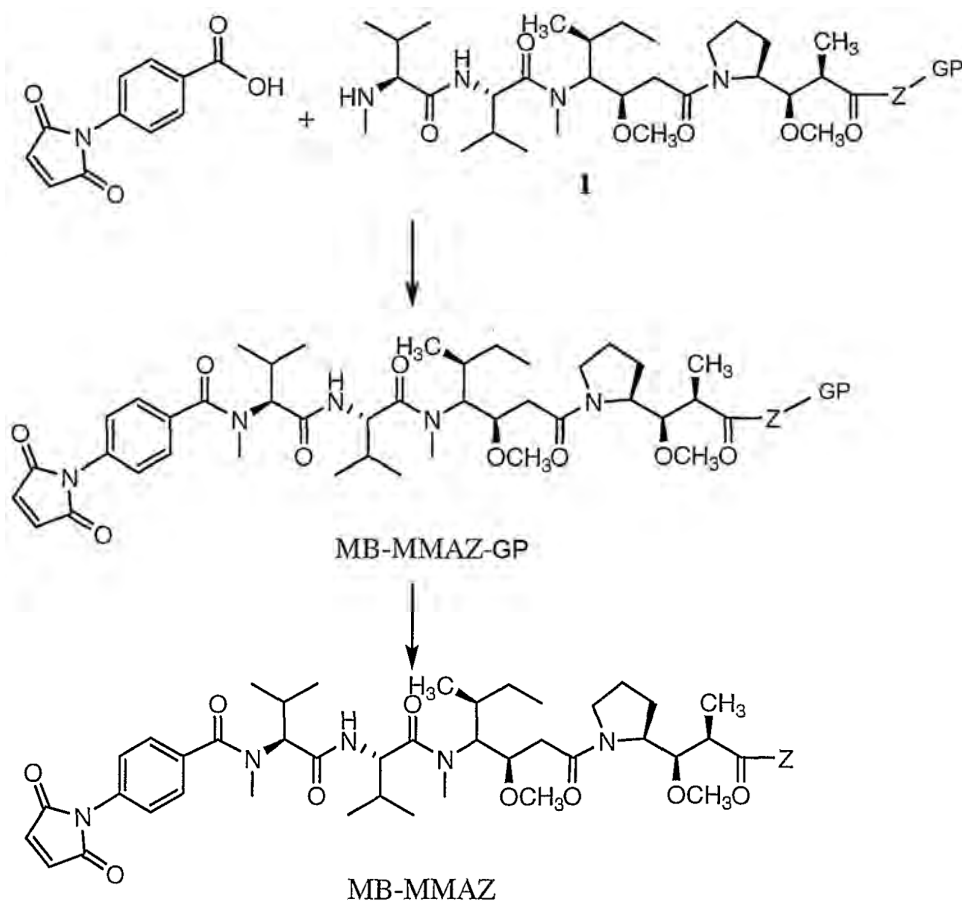
20 En resumen, se enfrían ácido maleimidocaproico (30 mg, Molecular BioSciences) y DMF anhidro (10  $\mu$ l) en un matraz de vidrio de 10 ml en atmósfera de Ar (globo), en hielo seco durante 5 min. A esta mezcla se le añade cloruro de oxalilo (1 ml) con una jeringa. (Se produce un aumento vigoroso de la reacción y la presión). Después de 5 min, la mezcla se deja calentar a temperatura ambiente y se deja durante 30 min con agitación manual ocasional. Los productos volátiles se retiran en rotavapor, el residuo se co-evapora con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (1 ml) y se seca en bomba 25 de vacío durante la noche. El producto se genera inicialmente en forma de un sólido de color blanco, volviéndose progresivamente un sólido de color blanquecino a marrón. RMN- $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$ : 1,26-1,32 (2H, m), 1,51-1,59 (2H, m), 1,63-1,70 (2H, m), 2,82 (2H, t), 3,46 (2H, t), 6,70 (2H, s) ppm. El material hidrolizado puede detectarse mediante un triplete a 2,35 ppm. El producto se usa si la integral del triplete a 2,42 ppm no excede del 20 % del triplete a 3,46 ppm.

30 Puede prepararse cloruro de maleimidocaproilo como se ha descrito anteriormente y se disuelve en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (3 ml).

35 Se disuelven MMAZ (1 eq.) y diisopropiletilamina (~ 4 eq.) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro en un matraz de vidrio equipado con barra de agitación magnética y tapón de goma. La mezcla de reacción se enfría en el baño de hielo durante 10 min y se añade solución de cloruro de maleimidocaproilo (-1,1 eq.) mediante una jeringa. Después de 15 min en hielo, se deja que la mezcla de reacción se caliente hasta la temperatura ambiente y la agitación continúa durante 2 horas más. Después, el disolvente se retira al vacío. El residuo se suspende en DMSO (0,5 ml). Después, se añade agua (100  $\mu$ l) y después de 0,5 h la mezcla se carga en una columna de HPLC preparativa para la separación: columna 40  $\text{C}_{12}$  Phenomenex Synergi MAX-RP, 4  $\mu$ l, 250  $\times$  10 $^\circ$ mm, 80 Å. El control se realiza a 215 nm. Las fracciones que contienen producto se concentran en rotavapor, se co-evaporan con acetonitrilo (5 ml, 2 veces), después con la mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y hexano para proporcionar el material final.

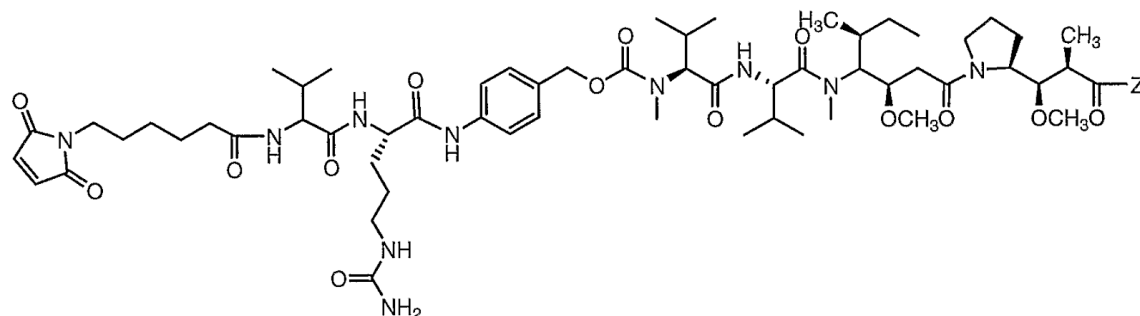
**Ejemplo 26 - Síntesis de un análogo de MC-MMAZ**

45 La síntesis de un análogo de MC-MMAZ se muestra a continuación.



Se suspende MeVal-Val-Dil-Dap-Z-GP (compuesto 1, 0,044<sup>o</sup>mmol) en DMF (0,250 ml). Se añaden ácido 4-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-pirrol-1-il)-benzoico (11 mg, 0,049<sup>o</sup>mmol) y HATU (17 mg, 0,044<sup>o</sup>mmol) seguidos de DIEA (0,031 ml, 0,17<sup>o</sup>mmol). Esta mezcla de reacción se deja en agitación durante 2,0 h. El análisis por HPLC indica el consumo completo del compuesto de partida 1. El producto se aísla mediante RP-HPLC preparatoria usando una columna de 80 Å Phenomenex C<sub>12</sub> Synergi Max-RP (250 × 21,20<sup>o</sup>mm). El eluyente es un gradiente lineal de MeCN del 10 % al 80 %/TFA al 0,05 % (ac.) durante 8 minutos, después, MeCN al 80 %/TFA al 0,05 % (ac.) isocrático durante 12 minutos adicionales. Se suspende MB-MeVal-Val-Dil-Dap-Z-GP (0,0385<sup>o</sup>mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml) y TFA (1 ml). La mezcla se agita durante 2 h y después los extractos orgánicos volátiles se evaporan a presión reducida. El producto (MB-MeVal-Val-Dil-Dap-Z) se purifica mediante RP-HPLC preparatoria, usando una columna de 80 Å Phenomenex C<sub>12</sub> Synergi Max-RP (250 × 21,20<sup>o</sup>mm). El eluyente es un gradiente lineal de MeCN del 10 % al 80 %/TFA al 0,05 % (ac.) durante 8 minutos, después, MeCN al 80 %/TFA al 0,05 % (ac.) isocrático durante 12 minutos adicionales..

#### Ejemplo 27 - Preparación de MC-val-cit-PAB-MMAZ (9)



9

Se recogen Compuesto 1 (0,11<sup>o</sup>mmol), Compuesto AB (85 mg, 0,12<sup>o</sup>mmol, 1,1 eq.) y HOBt (2,8 mg, 21<sup>o</sup>μmol, 0,2 eq.), en DMF seca (1,5 ml) y piridina (0,3 ml), mientras están en atmósfera de argón. Después de 30 h, se

encuentra que la reacción está esencialmente completa mediante HPLC. La mezcla se evapora, se recoge en una cantidad mínima de DMSO y se purifica mediante HPLC preparativa (columna C<sub>12</sub>-RP, 5 µl, 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contiene TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 25 ml/min) para proporcionar el Compuesto 9.

5 Se suspende Compuesto 8 (32°µmol) en cloruro de metileno (6 ml) seguido de la adición de TFA (3 ml). La solución resultante se deja en reposo durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y se purifica mediante HPLC preparativa (columna C<sub>12</sub>-RP, 5 µl, 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (que contiene TFA al 0,1 %) del 10 al 100 % en 40 min seguido de 20 min al 100 %, a un caudal de 25 ml/min). Las fracciones deseadas se  
10 concentran para proporcionar maleimidocaproil-valina-citrulina-p-hidroximetilaminobenceno-MMAZ (MC-val-cit-PAB-MMAZ) 9.

#### Ejemplo 28 - Preparación de AC10-MC-MMAZ por conjugación del anticuerpo y MC-MMAZ

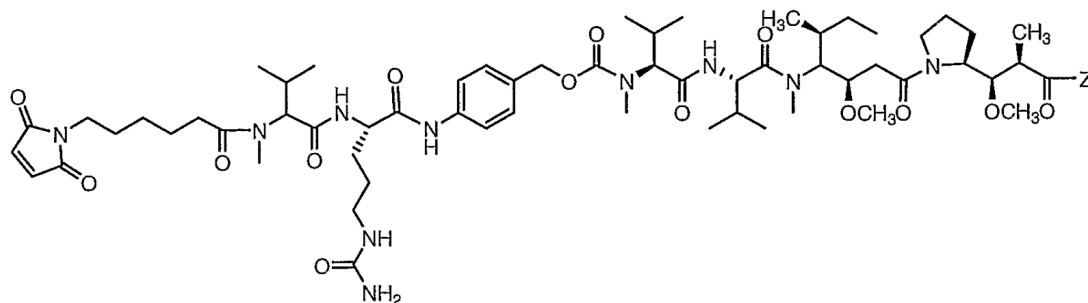
15 El anticuerpo (por ejemplo, AC10 o 1 F6), disuelto en borato de sodio 500°mM y cloruro de sodio 500°mM a pH 8,0, se trata con un exceso de ditioneitol 100°mM (DTT). Después de la incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambia por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1°mM. El valor de t<sub>iol</sub>/Ab se comprueba determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de t<sub>iol</sub> mediante la reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la  
20 determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfría en hielo.

El reactivo enlazador de fármaco, maleimidocaproil-monometil auristatina Z, es decir, MC-MMAZ, disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida y se añade al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para interrumpir la reacción y proteger  
25 con caperuza cualesquier grupos t<sub>iol</sub> de anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el anticuerpo-MC-MMAZ se purifica y se desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles y se congela para su almacenamiento.

30 Ejemplo 29 - Preparación de anticuerpo-MC-val-cit-PAB-MMAZ por conjugación de anticuerpo y MC-val-cit-PAB-MMAZ (SP3, 9)

Se prepara anticuerpo-MC-val-cit-PAB-MMAZ (por ejemplo, AC10-MC-val-cit-PAB-MMAZ o 1F6-MC-val-cit-PAB-MMAZ) por conjugación del anticuerpo y MC-val-cit-PAB-MMAZ (9,SP3) siguiendo el procedimiento del Ejemplo 28.

35 Ejemplo 30 - Preparación de MC-MeVal-Cit-PAB-MMAZ



40 A una suspensión a temperatura ambiente de Fmoc-MeVal-OH (3,03 g, 8,57°mmol) y carbonato de N,N'-disuccimidilo (3,29 g, 12,86°mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80 ml) se le añadió DIEA (4,48 ml, 25,71°mmol). Esta mezcla de reacción se deja en agitación durante 3 h y después se vierte en un embudo de decantación donde la mezcla orgánica se extrae con HCl 0,1 M (ac). El residuo orgánico en bruto se concentra a presión reducida y el producto se aísla mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente lineal de acetato de etilo al 20-100 %/hexanos (por ejemplo, puede recuperarse un total de 2,18 g de Fmoc-MeVal-OSu puro  
45 (4,80°mmoles, rendimiento del 56 %)).

A una suspensión a temperatura ambiente de Fmoc-MeVal-OSu (2,18 g, 4,84°mmol) en DME (13 ml) y THF (6,5 ml) se le añade una solución de L-citrulina (0,85 g, 4,84°mmol) y NaHCO<sub>3</sub> (0,41 g, 4,84°mmol) en H<sub>2</sub>O (13 ml). La suspensión se deja en agitación a temperatura ambiente durante 16 h, después se extrae en *tert*-BuOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O  
50 y se acidifica a pH = 2-3 con HCl 1 M. La fase orgánica se separa, se seca y se concentra a presión reducida. El residuo se tritura con éter dietílico dando como resultado Fmoc-MeVal-Cit-COOH (por ejemplo, 2,01 g) que se usa sin purificación adicional.

El Fmoc-MeVal-Cit-COOH en bruto se suspende en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 2:1 (100 ml) y se le añaden alcohol p-aminobencílico (0,97 g, 7,9°mmol) y EEDQ (1,95 g, 7,9°mmol). Esta suspensión se deja en agitación durante 125 h, después los extractos orgánicos volátiles se retiran a presión reducida y el residuo se purifica mediante



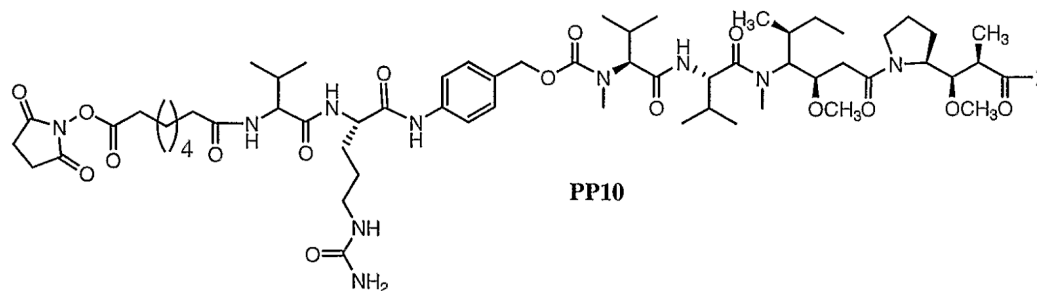
cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando MeOH al 10 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se recupera Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH puro (por ejemplo, 0,55 g, 0,896°mmol, rendimiento del 18,5 %).

5 A una suspensión de Fmoc-MeVal-Cit-PAB-OH (0,55 g, 0,896°mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 ml) se le añade STRATOSPHERES™ (piperazina-resina ligadas) (> 5°mmol/g, 150 mg). Después de agitarse a temperatura ambiente durante 16 h, la mezcla se filtra a través de celite (prelavado con MeOH) y se concentra a presión reducida. El residuo se tritura con éter dietílico y hexanos. El material sólido resultante, MeVal-Cit-PAB-OH, se suspende en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) y se le añaden MC-OSu (0,28 g, 0,896°mmol), DIEA (0,17 ml, 0,99°mmol) y DMF (15 ml). Esta suspensión se agita durante 16 h. Si el análisis por HPLC de la mezcla de reacción indica una reacción  
10 incompleta, la suspensión se concentra a presión reducida a un volumen de 6 ml, después se añade una solución al 10 % de NaHCO<sub>3</sub> (ac.) y la suspensión se agita durante 16 h adicionales. El disolvente se retira a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice usando un gradiente de MeOH al 0-10 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dando como resultado MC-MeVal-Cit-PAB-OH (por ejemplo, 42 mg (0,072°mmol, rendimiento del 8 %)).

15 A una suspensión de MC-MeVal-Cit-PAB-OH (2,37 g, 4,04°mmol) y bis(nitrofenil)carbonato (2,59 g, 8,52°mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) se le añade DIEA (1,06 ml, 6,06°mmol). Esta suspensión se agita durante 5,5 h, se concentra a presión reducida y se purifica mediante trituración con éter dietílico. Se suspende MC-MeVal-Cit-PAB-OCO-pNP (147 mg, 0,196°mmol) en una solución 1:5 de piridina/DMF (3 ml) y se les añaden HOBt (5 mg, 0,039°mmol), DIEA (0,17 ml, 0,978°mmol) y MMAZ (0,205°mmol). Esta mezcla de reacción se agita durante 16 horas a temperatura ambiente y después se purifica mediante RP-HPLC preparativa (3 veces), usando una columna de 80 Å Phenomenex C<sub>12</sub> Synergi Max-RP (250 x 21,20°mm). El eluyente es un gradiente lineal de MeCN del 10 % al 90 %/TFA al 0,05 % (ac) durante 30 minutos, después MeCN al 90 %/TFA al 0,05 % (ac) isocrático durante 20 minutos. Se obtiene MC-MeVal-Cit-PAB-MMAZ.

25

#### **Ejemplo 31 - Preparación de éster de succinimida de suberil-Val-Cit-PAB-MMAZ**



30 Se suspenden Compuesto 1 (0,38°mmol), Fmoc-Val-Cit-PAB-pNP (436 mg, 0,57°mmol, 1,5 eq.) en piridina anhidra, se añaden 5 ml de HOBt (10 mg, 0,076°mmol, 0,2 eq.) seguido de DIEA (199 µl, 1,14°mmol, 3 eq.). La mezcla de reacción se somete a ultrasonidos durante 10 min y después se agita durante la noche a temperatura ambiente. La piridina se retira a presión reducida y el residuo se resuspende en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La mezcla se separa mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice en un gradiente por etapas de MeOH, del 0 al 10 %, en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las  
35 fracciones que contienen el producto se recogen, se concentran y se secan al vacío durante la noche para proporcionar Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAZ.

40 Se suspende Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAZ en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml), dietilamina (2 ml) y DMF (2 ml). La mezcla se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. El disolvente se retira a presión reducida. El residuo se co-evapora con piridina (2 ml), después con tolueno (5 ml, 2 veces) y se seca al vacío. Se obtiene Val-Cit-PAB-MMAZ.

45 Todo el Val-Cit-PAB-MMAZ preparado a partir de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAZ se suspende en piridina (2 ml) y se añade a una solución de suberato de disuccinimidilo (74 mg, 0,2°mmol, 4 eq.), en piridina (1 ml). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente. Después de 3 horas se añade éter (20 ml). El precipitado se recoge y se lavó con una cantidad adicional de éter. El sólido de color rojizo se suspende en MeOH al 30 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se filtra a través de un lecho de gel de sílice con MeOH al 30 %/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente.

#### **Ejemplo 32 - Determinación de la citotoxicidad de compuestos seleccionados**

50 La actividad citotóxica de MMAZ y conjugados anticuerpo-fármaco se evalúa en las estirpes celulares positivas para CD70+, por ejemplo, Caki-1, carcinoma de células renales; L428, enfermedad de Hodgkin; U251, glioblastoma. Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos, las células pueden sembrarse a aproximadamente 5-10000 por pocillo en 150 µl de medio de cultivo, después, pueden tratarse con dosis graduadas de compuestos por cuadruplicado al inicio del ensayo. Los ensayos de citotoxicidad se realizan generalmente durante 96 horas después de la adición de los  
55 compuestos de ensayo. Pueden añadirse 50 µl de colorante de resazurina a cada pocillo durante las últimas 4 a 6 horas de la incubación para evaluar las células viables al final del cultivo. La reducción del colorante puede

determinarse mediante espectrometría de fluorescencia usando las longitudes de onda de excitación y de emisión de 535 nm y 590 nm, respectivamente. Para el análisis, el grado de reducción de la resazurina por las células tratadas puede compararse con el de las células de control sin tratar.

5 **Ejemplo 33 - Determinación de la citotoxicidad *in vitro* general**

10 Para evaluar la citotoxicidad de los conjugados, las células se siembran a aproximadamente 5-10000 por pocillo en 150 µl de medio de cultivo y después se tratan con dosis graduadas de conjugados por cuadruplicado al inicio del ensayo. Los ensayos de citotoxicidad se realizan durante 96 horas después de la adición de los compuestos de ensayo. Se añaden 50 µl de colorante de resazurina a cada pocillo durante las últimas 4 a 6 horas de la incubación para evaluar las células viables al final del cultivo. La reducción del colorante se determina mediante espectrometría de fluorescencia usando las longitudes de onda de excitación y de emisión de 535 nm y 590 nm, respectivamente. Para el análisis, el grado de reducción de la resazurina por las células tratadas se compara con el de las células de control sin tratar.

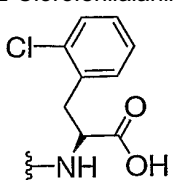
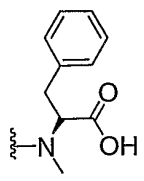
15 **Ejemplo 34 – Ensayo de proliferación celular *in vitro***

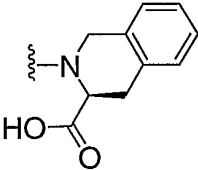
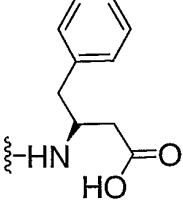
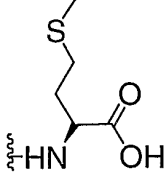
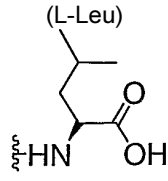
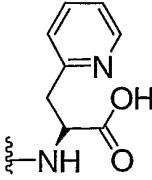
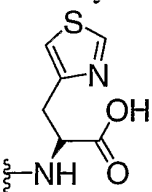
20 La eficacia del CAF puede medirse mediante un ensayo de proliferación celular que emplea el siguiente protocolo (Boletín técnico de Promega Corp. TB288; Mendoza *et al.*, 2002, *Cancer Res.* 62: 5485-5488):

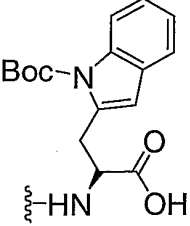
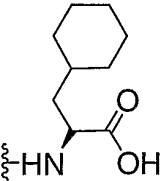
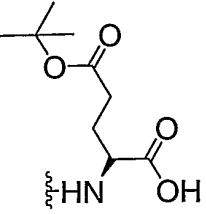
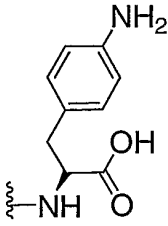
1. Una alícuota de 100 µl de cultivo celular que contiene aproximadamente 10<sup>4</sup> células (por ejemplo, SKBR-3, BT474, MCF7 o MDA-MB-468) en medio, se deposita en cada pocillo de una placa de paredes opacas de pocillos 96.
2. Se preparan pocillos de control que contienen medio y sin células.
- 25 3. Se añade CAF a los pocillos experimentales y se incuban durante 3-5 días.
4. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se añade un volumen de reactivo CellTiter-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
6. Los contenidos se mezclan durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
- 30 7. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. La luminiscencia se registra y se presenta en los gráficos como ULR = unidades de luminiscencia relativa.

35 La Tabla 7 muestra la actividad *in vitro* de los conjugados h1F6-anticuerpo-MMAZ (h1F6-mc-vc-PAB-MMAZ) contra estirpes celulares CD70+ (U251, L428 y Caki-1). Los conjugados contienen aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo.

Tabla 7.

| Cl <sub>50</sub> (ng/ml) de conjugados h1F6-MC-val-cit-PAB-MMAZ sobre estirpes celulares CD70+                                 |      |        |      |
|--|------|--------|------|
| Z  | U251 | Caki-1 | L428 |
| (L-2-Clorofenilalanina)<br><br><b>SP3-a</b> | 8    | 4,4    | 8    |
| (L-Me-Fenilalanina)<br><br><b>SP3-b</b>     | 8    | 6      | 6    |

|  |    |    |                                       |
|--|----|----|---------------------------------------|
| <p>(L-Tic)</p>  <p><b>SP3-c</b></p>                   | 20 | 28 | Inhibición máxima = 12 % a 1000 ng/ml |
| <p>(L-beta-homofenilalanina)</p>  <p><b>SP3-d</b></p> | 11 | 9  | 33                                    |
| <p>(L-Met)</p>  <p><b>SP3-j</b></p>                  | 23 | 18 | 43                                    |
| <p>(L-Leu)</p>  <p><b>SP3-i</b></p>                 | 14 | 16 | 105                                   |
| <p>(3-Piridil-L-alanina)</p>  <p><b>SP3-h</b></p>   | 16 | 16 | 12                                    |
| <p>(L-4-tiazolilalanina)</p>  <p><b>SP3-g</b></p>   | 6  | 7  | 4                                     |

|   |               |               |                                      |
|---|---------------|---------------|--------------------------------------|
| <p>(L-Trp)</p>  <p><b>SP3-k</b></p>                  | 7,5           | 6             | 11                                   |
| <p>(3-Ciclohexil-L-alanina)</p>  <p><b>SP3-f</b></p> | 8             | 10            | 105                                  |
| <p>(Glu(OtBu))</p>  <p><b>SP3-l</b></p>             | 43            | 51            | Inhibición máxima = 12 % a 141 ng/ml |
| <p>(p-Aminofenilalanina)</p>  <p><b>SP3-e</b></p>  | Ningún efecto | Ningún efecto | Inhibición máxima = 10 % a 100 ng/ml |
| fenilalanina (MMAF)   | 10            | 7             | 8                                    |

#### Ejemplo 35 - Aclaramiento plasmático en ratas

5 La farmacocinética del aclaramiento plasmático de conjugados de fármaco anticuerpo y del anticuerpo total se estudia en ratas Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, 250-275 gramos cada una). Los animales se tratan mediante inyección en la vena de la cola en embolada (inyección I.V. lenta). Se recogen aproximadamente 300  $\mu$ l de sangre completa a través de una cánula yugular o por pinchazo de la cola, en recipientes anticoagulantes con litio/heparina en cada punto temporal: 0 (antes de la dosis), 10 y 30 minutos; 1, 2, 4, 8, 24 y 36 horas; y 2, 3, 4, 7, 14, 21 y 28 días después de la dosis. El anticuerpo total se mide mediante ELISA-ECD/GxhuFc-HRP. El conjugado fármaco anticuerpo se mide mediante ELISA - M MAZ/ECD-Bio/SA-HRP.

#### Ejemplo 36 - Aclaramiento plasmático en monos

15 La farmacocinética del aclaramiento plasmático de conjugados de fármaco anticuerpo y del anticuerpo total puede estudiarse en macacos, usando un procedimiento similar al descrito anteriormente.

#### Ejemplo 37 – Eficacia *in vivo* sobre el volumen tumoral en ratones explantados transgénicos

20 Pueden obtenerse animales adecuados para experimentos transgénicos de fuentes comerciales convencionales tales como Taconic (Germantown, NY). Muchas cepas son adecuadas, pero se prefieren los ratones hembra FVB debido a su mayor susceptibilidad a la formación de tumores. Pueden usarse machos FVB para el apareamiento y pueden usarse sementales CD.1 vasectomizados para estimular la seudopreñez. Pueden obtenerse ratones

vasectomizados de cualquier proveedor comercial. Los fundadores pueden ser criarse ya sea con ratones FVB o con ratones heterocigotos 129/BL6 x FVB p53. Los ratones con heterocigosidad en el alelo p53 puede usarse para aumentar potencialmente la formación de tumores. Algunos tumores F1 son de cepa mixta. Los tumores fundadores pueden ser FVB solamente.

5 Los animales que tienen tumores (aloinjerto propagado desde ratones transgénicos Fo5 mmtv) pueden tratarse con una dosis única o múltiple mediante inyección I.V. de CAF. El volumen del tumor puede evaluarse en diversos puntos temporales después de la inyección.

#### 10 **Ejemplo 38 - Eficacia *in vivo* de conjugados anticuerpo-fármaco de mcMMAZ**

La eficacia de cAC10-mcMMAZ puede evaluarse en xenoinjertos de LCGA Karpas-299. Se usa AC10-mcMMAZ quimérico con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo (cAC10-mcF4). Las células de LCGA Karpas-299 humanas se implantan por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos. Cuando los tumores tienen un promedio de 15 volúmenes tumorales se calculan usando la fórmula ( $0,5 \times L \times A^2$ ) en la que L y A son la más larga y la más corta de dos mediciones bidireccionales.

#### *Eficacia de cBR96-mcMMAZ en xenoinjertos de CPNM L2987*

20 cBR96 es un anticuerpo quimérico que reconoce el antígeno Le<sup>Y</sup>. Para evaluar la eficacia *in vivo* de cBR96-mcMMAZ con 4 fármacos por anticuerpo (cBR96-mcF4), se implantan fragmentos de tumor de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) L2987 en ratones desnudos atímicos. Cuando los tumores tienen un promedio de aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividen en 3 grupos: sin tratamiento y 2 grupos con terapia. La eficacia de los conjugados anticuerpo fármaco se evaluó como se ha descrito anteriormente.

#### 25 **Depósitos en la ATCC**

Se hizo un depósito en la ATCC (American Type Culture Collection (Colección Estadounidense de Cultivos de Referencia) del anticuerpo monoclonal S2C6 el 25 de mayo de 1999 de conformidad con los términos del Tratado de Budapest acerca del reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines de procedimiento de patentes. A este depósito en la ATCC se le proporcionó el número de referencia PTA-110.

Se hizo un depósito en la ATCC del anticuerpo monoclonal murino AC10 el 26 de abril de 2005 de conformidad con los términos del Tratado de Budapest acerca del reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines de procedimiento de patentes. A este depósito en la ATCC se le proporcionó el número de referencia PTA-6679.

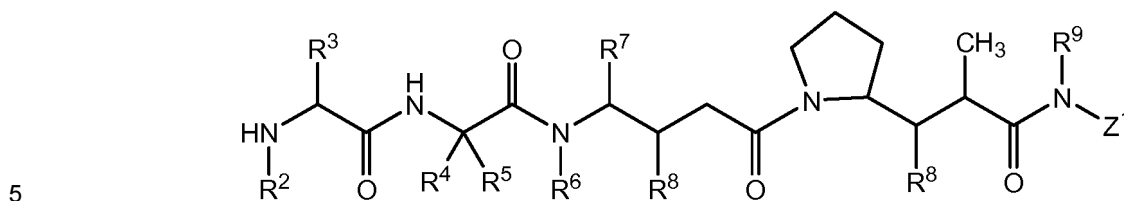
40 Se hizo un depósito en la ATCC del anticuerpo monoclonal humanizado AC10 el 23 de agosto de 2005 de conformidad con los términos del Tratado de Budapest acerca del reconocimiento internacional del depósito de microorganismos con fines de procedimiento de patentes. A este depósito en la ATCC se le proporcionó el número de referencia PTA-6951.

45 La ATCC se encuentra en University Boulevard, n.º 10801, Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU. Cualquier depósito se proporciona como una comodidad para los expertos en la materia y no es una admisión de que se requiera un depósito. Lo descrito en el presente documento no debe limitarse en su alcance por el anticuerpo depositado, puesto que la realización depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos y de cualquier anticuerpo que sea funcionalmente equivalente. El depósito de material del presente documento no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento sea inadecuada, ni debe interpretarse como una limitación del alcance de las ilustraciones específicas que representa. De hecho, diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se definen por las reivindicaciones adjuntas.

55 La presente divulgación no debe limitarse en su alcance por las realizaciones específicas desveladas en los ejemplos que pretenden ser ilustraciones de unos pocos aspectos y cualesquier realizaciones que sean funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la presente divulgación. De hecho, diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia y se definen por las reivindicaciones adjuntas.

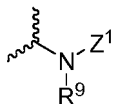
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en la que:

- 10  $R^2$  se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 $R^3$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$ , arilo, alquilarilo  $C_1-C_8$ ,  $X^1$ -  
(carbociclo  $C_3-C_8$ ), heterociclo  $C_3-C_8$  y  $X^1$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ );  
 $R^4$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$ , arilo,  $X^1$ -arilo, alquil  $C_1-C_8$ -  
(carbociclo  $C_3-C_8$ ), heterociclo  $C_3-C_8$  y  $X^1$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ );  
15  $R^5$  se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo;  
o  $R^4$  y  $R^5$  forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula  $-(CR^aR^b)_n-$  en la que  $R^a$  y  $R^b$  se  
seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_8$  y carbociclo  $C_3-C_8$  y  $n$  se  
selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;  
 $R^6$  se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo  $C_1-C_8$ ;  
 $R^7$  se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$ , arilo,  $X^1$ -arilo,  $X^1$ -(carbociclo  
20  $C_3-C_8$ ), heterociclo  $C_3-C_8$  y  $X^1$ -(heterociclo  $C_3-C_8$ );  
cada  $R^8$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo  $C_1-C_8$ , carbociclo  $C_3-C_8$   
y O-(alquilo  $C_1-C_8$ );  
cada  $X^1$  es independientemente alquilenos  $C_1-C_{10}$ ;  
25 el resto  $-NR^9Z^1$  es un bioisómero de fenilalanina con una cadena lateral de aminoácido modificado en donde el  
resto de bioisómero de fenilalanina



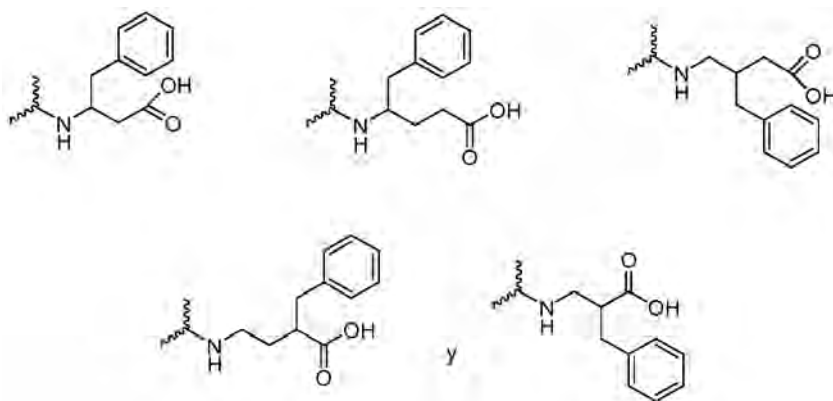
es

30



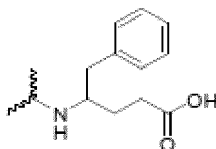
35 en la que  $R^9$  es H;  $R^{10}$  es bencilo;  $R^{11}$  es H;  $Z^2$  es  $CO_2H$ ; el subíndice  $n$  es un número entero de 0 a 2; y el  
subíndice  $o$  es un número entero de 0 a 2 a condición de que  $n + o$  sea al menos 1.

2. El compuesto de la reivindicación 1 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el  
resto de bioisómero de fenilalanina se selecciona entre el grupo que consiste en



3. El compuesto de la reivindicación 2 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el resto de bioisótero de fenilalanina es

5



4. Un compuesto que tiene la fórmula:

10

$L-((LU)_{0-1}-(D)_{1-4})_p$ , o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde,

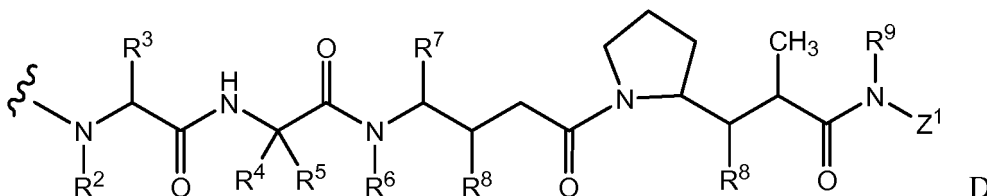
L- es una unidad de ligando;

LU es una unidad de enlazador;

p es un número entero de 1 a aproximadamente 20; y

D es un resto de fármaco que tiene la Fórmula D:

15



en la que,

20

R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

25

R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo;

o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

30

R<sup>6</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>7</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);

35

cada X<sup>1</sup> es independientemente alquilenos C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>; y

el resto -NR<sup>9</sup>Z<sup>1</sup> es un bioisótero de fenilalanina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Un compuesto de la reivindicación 4, que tiene la fórmula:

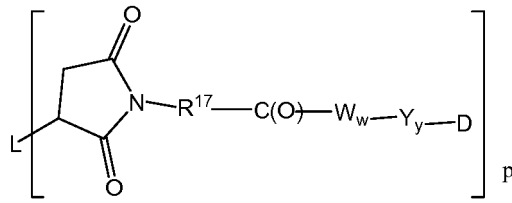
40

L-LU-D

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

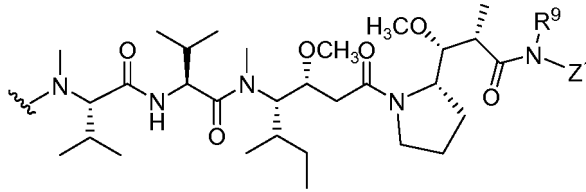




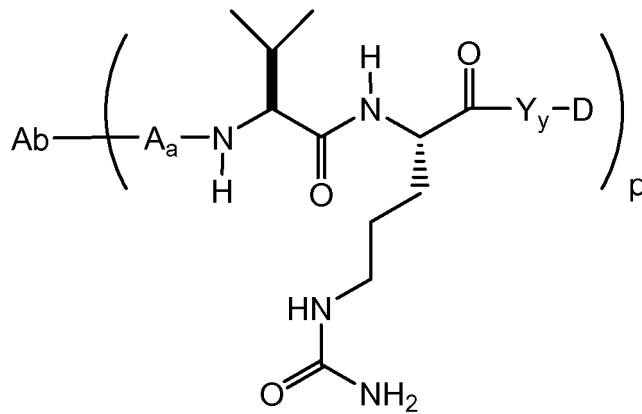


en la que w e y son cada uno 0.

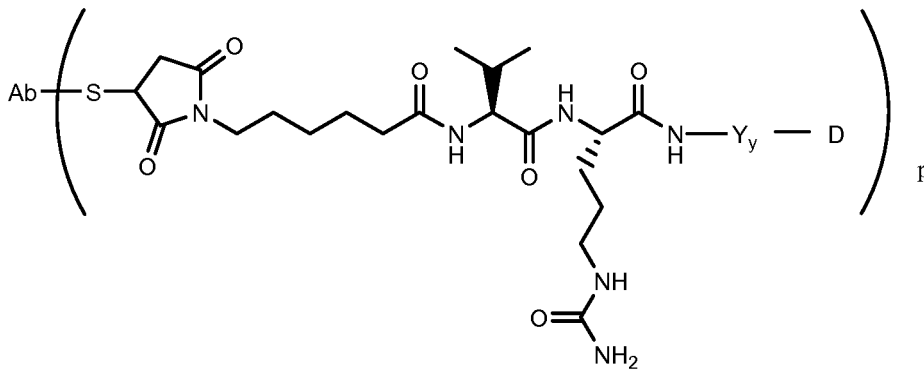
- 5 11. El compuesto de las reivindicaciones 9 o 10 en el que D tiene la fórmula:



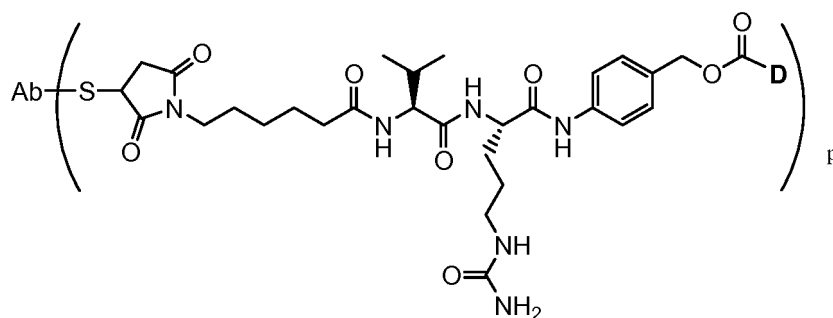
- 10 12. El compuesto de la reivindicación 7 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, que tiene la fórmula:



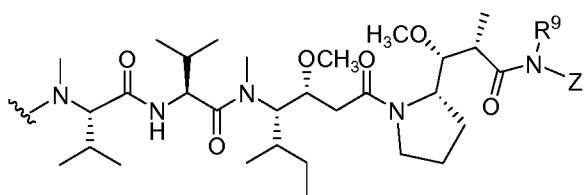
- 15 13. El compuesto de la reivindicación 7 que tiene la fórmula:



14. El compuesto de la reivindicación 7 que tiene la fórmula:

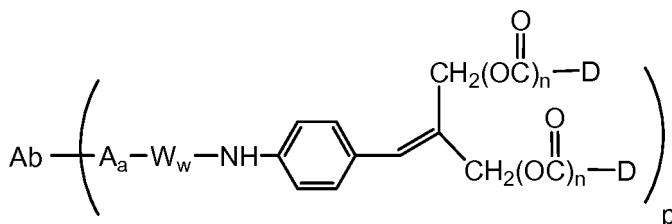


15. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en el que D tiene la fórmula:



5

16. El compuesto de la reivindicación 7 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, que tiene la fórmula:



10

17. El compuesto de la reivindicación 7 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que w es un número entero que varía de 2 a 12.

18. El compuesto de la reivindicación 11 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que w es 2.

19. El compuesto de la reivindicación 18 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que  $W_w$  es -valina-citrulina-.

20

20. El compuesto de la reivindicación 7 en el que  $W_w$  es ácido 5-aminovalérico, homo fenilalanina lisina, tetraisoquinolinacarboxilato lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido isonepecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina y ácido isonepecótico.

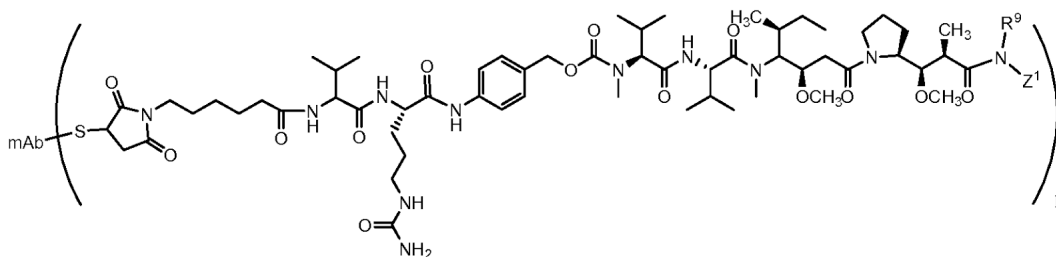
21. El compuesto de la reivindicación 7 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

22. El compuesto de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

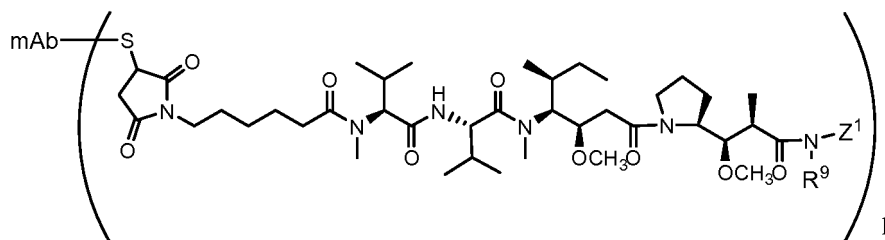
23. El compuesto de la reivindicación 8, en el que una cantidad sustancial del resto de fármaco no se escinde del anticuerpo hasta que el compuesto se internaliza en una célula con un receptor de la superficie celular específico para el anticuerpo del compuesto.

24. Un compuesto que tiene las fórmulas:

35



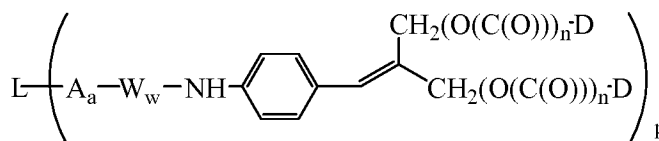
o



5

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en las que mAb es un anticuerpo monoclonal y D se define de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 21.

10 25. Un compuesto que tiene la fórmula:



15 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo en la que,

L- es una unidad de ligando;

-A- es una unidad de extensor;

a es 0 o 1;

20 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

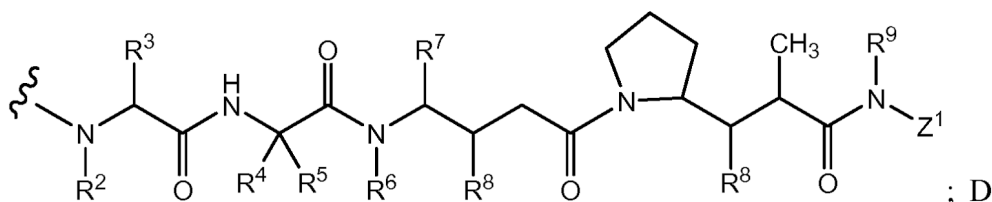
w es un número entero que varía de 0 a 12;

cada n es independientemente 0 o 1;

p es un número entero de 1 a 20; y

25 cada aparición de D es independientemente un resto de fármaco que tiene la Fórmula D:

25



R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

30 R<sup>3</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, alquilarilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, X<sup>1</sup>- (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>4</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, alquil C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>- (carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

R<sup>5</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo;

35 o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>n</sub>- en la que R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

R<sup>6</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>;

R<sup>7</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, arilo, X<sup>1</sup>-arilo, X<sup>1</sup>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> y X<sup>1</sup>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>);

40 cada R<sup>8</sup> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>

y O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>);  
 cada X<sup>1</sup> es independientemente alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>; y  
 el resto -NR<sup>9</sup>Z<sup>1</sup> es un bioisótero de fenilalanina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5 26. El compuesto de la reivindicación 7 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente a CD20, CD30, CD33, CD40, CD70, BCMA o antígeno Y de Lewis.

10 27. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 y 7 a 26, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

15 28. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 y 7 a 26, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso en un método para destruir o inhibir la proliferación de células tumorales o células cancerosas, comprendiendo el método tratar las células tumorales o las células cancerosas con una cantidad del compuesto, siendo la cantidad eficaz para destruir o inhibir la proliferación de las células tumorales o las células cancerosas.

20 29. El compuesto o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 y 7 a 26 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en el cáncer, la enfermedad autoinmune y una enfermedad infecciosa; comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad del compuesto o de una sal o de un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, siendo dicha cantidad eficaz para tratar el cáncer, la enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

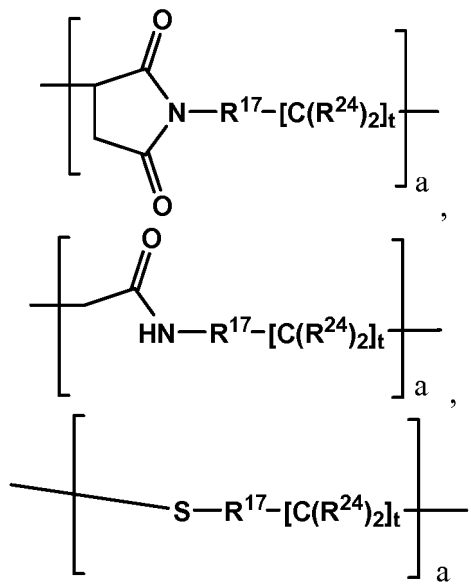
25 30. El compuesto de conjugado anticuerpo fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 y 7 a 26 para su uso en un método de inhibición de la proliferación celular, comprendiendo el método la exposición de células de mamífero en un medio de cultivo celular al conjugado anticuerpo fármaco y la medición de una actividad citotóxica del compuesto, con lo que se inhibe la proliferación de las células.

30 31. Un método *in vitro* de inhibición de la proliferación celular que comprende:

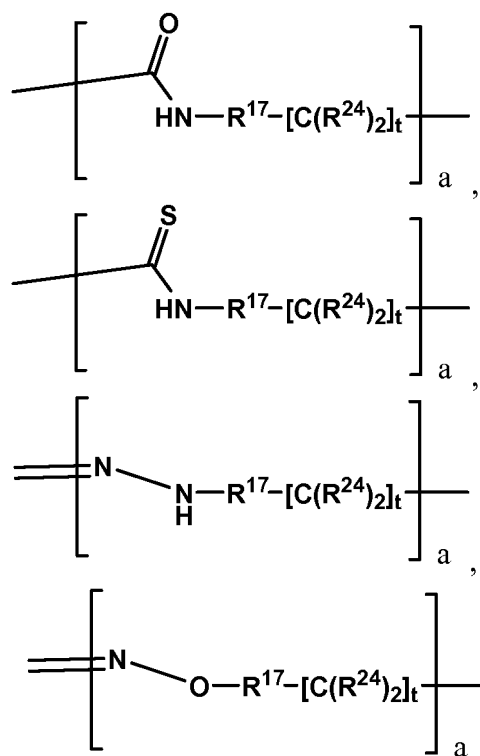
la exposición de células de mamífero en un medio de cultivo celular al compuesto de conjugado anticuerpo fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 y 7 a 26 y la medición de una actividad citotóxica del compuesto, con lo que se inhibe la proliferación de las células.

35 32. Un artículo de fabricación que comprende un compuesto de conjugado anticuerpo fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 25; un recipiente; y un prospecto o etiqueta que indica que el compuesto puede usarse para tratar el cáncer, caracterizado por la sobreexpresión de al menos uno de CD20, CD30, CD33, CD40, CD70, BCMA y antígeno Y de Lewis.

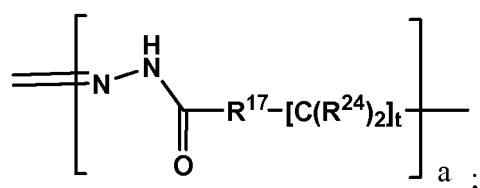
40 33. El compuesto de la reivindicación 7 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo, en el que la unidad de extensor tiene la fórmula seleccionada entre el grupo que consiste en:



45

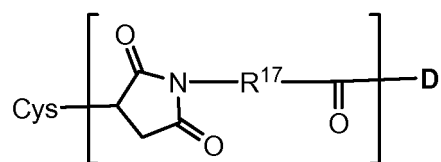


5 y



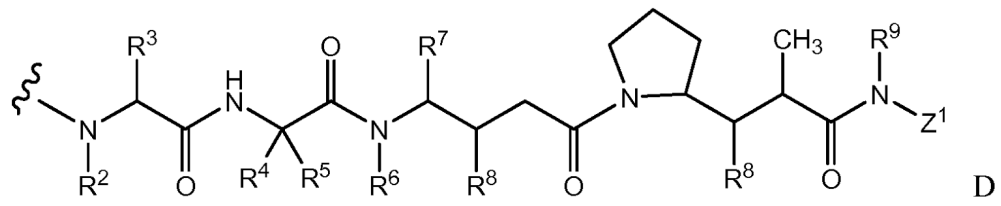
10 en donde L es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; R<sup>17</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -arileno-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, -arilen-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>- y -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>- y r es un número entero que varía de 1 a 10; t es un número entero de 0 a 1 y cada R<sup>24</sup> es H o se combinan para formar =O.

15 34. Un compuesto aislado y purificado que tiene la fórmula:



20 en la que R<sup>17</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-, -arileno-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-arileno-, -arilen-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>- o -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>- y r es un número entero que varía de 1 a 10; a es un número entero de 0 a 1 y D es un resto de fármaco que tiene la Fórmula D:

25



de acuerdo con la reivindicación 1.