

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 269**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2002 E 02804108 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 1443963**

54 Título: **Compuestos que eligen anticuerpos como diana**

30 Prioridad:

22.10.2001 US 344614 P

19.09.2002 US 412455 P

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

18.08.2014

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 NORTH TORREY PINES ROAD
LA JOLLA, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**BARBAS, CARLOS, F.;
RADER, CHRISTOPH;
SINHA, SUBHASH, C. y
LERNER, RICHARD**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 486 269 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).

Compuestos que eligen anticuerpos como diana**DESCRIPCIÓN****5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La invención se refiere a compuestos para elegir como diana moléculas biológicas y procedimientos de preparación y uso de los compuestos. Los fármacos farmacéuticos convencionalmente desarrollados y las moléculas efectoras biológicas son frecuentemente de uso limitado en terapia debido a la alta toxicidad. Se han usado diversos enfoques durante los años para mejorar el índice terapéutico de tales fármacos o efectores. Un enfoque ha sido acoplar un fármaco o efector a un agente que elige ligandos como diana tal como un anticuerpo. En este caso, el anticuerpo se usa para cambiar la distribución del fármaco o efector de forma que más de él pueda localizarse donde más se necesita *in vivo*. La elección de diana mejorada de fármacos o efectores de peso molecular pequeño se ha conseguido completando el fármaco o efector con un compuesto de mayor peso molecular. Por ejemplo, la patente europea EP 217577 desvela que la elevada semivida y la elección de diana por un agente se logra formando complejos *in vivo* entre agentes modificados con hapteno y anticuerpos anti-hapteno. Similarmente, la publicación de solicitud de patente internacional WO 98/22141 desvela conjugados de agentes terapéuticos y haptenos. Los conjugados se administran a un sujeto y circulan en la corriente sanguínea del sujeto. Los conjugados circulantes son reconocidos y unidos por anticuerpos existentes en el sujeto. Por tanto, Shokat y Schultz (J. Am. Chem. Soc., 1991, 113:1862-1864) han desvelado un procedimiento para redirigir la respuesta inmunitaria usando un procedimiento denominado inmunogenicidad mediada por ligandos. Según esta enseñanza, un antígeno invariante se compleja con un ligando específico y se administra a un sujeto. El antígeno invariante complejoado se une entonces a anticuerpos que se producen naturalmente presentes en el sujeto.

List y col. (nº 95(26); 1998) describen una dicetona de fluorescencia unida a un sitio catalítico del anticuerpo para aldolasa 38C2.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende uno o más agentes que eligen diana ligados covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa de ratón 38C2 o una versión humanizada o quimérica humana del mismo mediante un ligador de fórmula X-Y-Z en la que:

(i) X es una cadena de conexión lineal o ramificada de átomos que comprenden cualquiera de C, H, N, O, P, S, Si, F, Cl, Br y I, o una sal de los mismos, y que comprende una unidad de éter de repetición de entre 2-100 unidades,

(ii) Y es opcional y es un anillo saturado o insaturado homo- o heterocarbocíclico de 5 ó 6 miembros individual o condensado localizado dentro de 1-20 átomos de Z, y

(iii) Z es un grupo acil-beta-lactama para ligar covalentemente el uno o más agentes que eligen diana con una cadena lateral de un aminoácido reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo para aldolasa.

La presente invención también proporciona un procedimiento de producción de dicho anticuerpo, que comprende ligar covalentemente dicho agente que elige diana con el sitio de combinación del anticuerpo para aldolasa mediante dicho ligador.

BREVE RESUMEN DE LA DIVULGACION

La presente divulgación proporciona compuestos que eligen anticuerpos como diana con especificidad y propiedades biológicas únicas que son útiles en muchas aplicaciones. Los compuestos que eligen anticuerpos como diana de la divulgación comprenden uno o más agentes o agentes biológicos que eligen diana o se ligan tanto covalentemente como no covalentemente a un sitio de combinación de anticuerpos. Un ligador lineal o ramificado se usa preferentemente en enlace covalente y no covalente. Se desvelan características químicas del ligador. Dependiendo de las circunstancias, la especificidad del anticuerpo del sitio de combinación puede modificarse o eliminarse tras el enlace covalente o no covalente al agente que elige diana o biológico. En algunas realizaciones de la divulgación, la especificidad de unión del antígeno del anticuerpo antes del enlace covalente puede retenerse sustancialmente después del enlace covalente.

El compuesto que elige anticuerpos como diana confiere diversos beneficios con respecto a los propios componentes. Por ejemplo, la porción de anticuerpo del compuesto puede prolongar generalmente la semivida de un agente que elige diana o biológico de tamaño más pequeño *in vivo*. Por tanto, la potencia biológica u otra característica biológica de un agente que elige diana o biológico particular puede modificarse mediante la adición de función (funciones) efectora(s) proporcionada(s) por la porción de anticuerpo del compuesto (por ejemplo, funciones efectoras mediadas por complemento). Además, el agente que elige diana o agente de unión, mediante su elevado tamaño conferido por el enlace al anticuerpo, puede permitir que el agente que elige diana funcione en nuevas capacidades.

En algunas realizaciones de la divulgación, el agente que elige diana del compuesto puede unirse a una molécula diana de no inmunoglobulina o a una molécula diana de inmunoglobulina fuera del sitio de combinación de inmunoglobulina. Así, en estas realizaciones, el agente que elige diana es específico para un no anticuerpo o es específico para un anticuerpo, pero se une al anticuerpo fuera de su sitio de combinación. En un enfoque preferido, un anticuerpo catalítico puede modificarse en un compuesto que se une específicamente a una biomolécula. La porción de anticuerpo de los compuestos que eligen anticuerpos como diana puede incluir anticuerpo completo o fragmentos de anticuerpos únicos y pueden tener secuencia derivada de diversas especies de animales tales como una inmunoglobulina no humana o inmunoglobulina humana, incluyendo la última un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico humano.

En el presente documento también se desvelan procedimientos de producción de compuestos que eligen anticuerpos como diana de la divulgación. En una realización de la divulgación, un compuesto de agente-ligador que comprende un agente que elige diana y/o un agente biológico está ligado a un ligador que comprende un grupo reactivo para la reacción covalente con el sitio de combinación del anticuerpo. En otro enfoque se prepara un compuesto de anticuerpo-ligador en el que el ligador incluye un grupo reactivo para la reacción con dicho uno o más agentes que eligen diana o agentes biológicos. En otro enfoque más, los agentes y el anticuerpo pueden cada uno ligarse a ligadores con grupos reactivos compatibles de manera que se forme el compuesto que elige anticuerpos como diana cuando los dos ligadores se ligan covalentemente.

Adicionalmente, en el presente documento se desvelan compuestos de agente-ligador que comprenden un agente que elige diana, agente biológico, o ambos, que pueden ligarse covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo. En algunas realizaciones de la divulgación, el ligador incluye un grupo reactivo para ligar covalentemente el agente que elige diana con el sitio de combinación del anticuerpo. El enlace con el sitio de combinación de anticuerpos puede ser a una cadena lateral de un aminoácido reactivo en el sitio de combinación. En algunas realizaciones de la divulgación, el aminoácido reactivo es una lisina mientras que el grupo reactivo del ligador es una cetona, una dicetona, una beta-lactama, un éster activo de succinimida, halocetona, una lactona, un anhídrido, un epóxido, un aldehído, un haluro, un sulfonato, un fosfonato, una guanidina, una amidina, una imina, una eneamina, un cetol, un acetal o una maleimida.

Se describen diversas características químicas del compuesto de agente-ligador. En una realización de la divulgación, el ligador tiene la fórmula general X - Y - Z en la que X es una cadena de conexión lineal o ramificada de átomos que comprenden cualquiera de C, H, N, O, P, S, Si, F, Cl, Br y I, o una sal de los mismos, y que comprende una unidad de éter de repetición de entre 2-100 unidades; Y es opcional y es un anillo saturado o insaturado homo- o heterocarbocíclico de 5 ó 6 miembros individual o condensado localizado dentro de 1-20 átomos de Z; y Z es un grupo reactivo para ligar covalentemente el uno o más agentes que eligen diana con una cadena lateral de un aminoácido reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo. El agente que elige diana puede ligarse a X o Y o a X e Y cuando más de un agente que elige diana o agente biológico se incluya en el compuesto de agente-ligador que elige diana.

En el presente documento todavía se desvelan adicionalmente compuestos de agente que elige diana-ligador-antígeno para ligarse no covalentemente con el sitio de combinación de un anticuerpo. Estos compuestos incluyen dos o más agentes que eligen diana, dos o más agentes biológicos o al menos dos agentes, uno de los cuales es un agente que elige diana y otro un agente biológico. Los agentes se ligan covalentemente mediante un ligador a un antígeno reconocido por el anticuerpo. Se desvelan diversas características químicas del ligador y antígeno.

En el presente documento todavía se desvelan adicionalmente procedimientos de modificación de un anticuerpo que presenta afinidad de unión baja o no detectable por una molécula diana particular de manera que el anticuerpo tenga elevada especificidad de unión por la molécula diana particular. En una realización de la divulgación, uno o más agentes que eligen diana o agentes biológicos específicos para la molécula diana particular se ligan covalentemente al sitio de combinación del anticuerpo para generar un compuesto que elige anticuerpos como diana. Los agentes se ligan de tal forma que retienen su capacidad para unirse a la molécula diana particular. En algunas de tales realizaciones, el anticuerpo antes del enlace covalente posee una afinidad por la molécula diana inferior a aproximadamente 1×10^{-5} moles/litro. Después del enlace covalente, el compuesto que elige diana puede presentar una afinidad por la molécula diana superior a aproximadamente 1×10^{-6} moles/litro.

Adicionalmente se desvelan procedimientos de alteración de al menos una característica física o biológica de un agente que elige diana o agente biológico. En una realización de la divulgación, el agente está ligado covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo para generar un compuesto que elige anticuerpos como diana. También se desvelan procedimientos para modificar una o más propiedades físicas o biológicas de los compuestos que eligen anticuerpos como diana modificando una o más características químicas del ligador. En algunas realizaciones de la divulgación, las propiedades físicas o biológicas modificadas incluyen farmacocinética, farmacodinámica, inmunogenicidad, afinidad de unión, susceptibilidad a la degradación, solubilidad, lipofilia, hidrofilia, hidrofobia, estabilidad y rigidez.

En el presente documento también se desvelan procedimientos de administración de una actividad biológica a células, una biomolécula de la matriz extracelular o una biomolécula de fluido de un individuo. En un enfoque, un

5 compuesto que elige antígenos como diana de la divulgación que es biológicamente activo y es específico para las células, biomolécula de la matriz extracelular o biomolécula de fluido se administra al individuo. En otro enfoque, un compuesto de agente-ligador-antígeno de la divulgación, específico para células, biomolécula de la matriz extracelular de tejido o biomolécula de fluido, y un anticuerpo específico para el antígeno, se administran por separado al individuo y el agente que elige anticuerpos como diana se forma *in vivo* cuando el compuesto de agente-ligador-antígeno se asocia no covalentemente con el sitio de combinación de anticuerpos.

10 En el presente documento se desvelan adicionalmente procedimientos de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un individuo en el que la enfermedad o afección implica células, tejido o fluido que expresa una molécula diana. En un enfoque, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que elige anticuerpos como diana de la divulgación se administra al individuo. En otro enfoque, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de agente-ligador-antígeno de la divulgación, y un anticuerpo específico para el antígeno, se administran por separado al individuo y el agente que elige anticuerpos como diana se forma *in vivo* cuando el compuesto de agente-ligador-antígeno se asocia no covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos. En ambos enfoques, el compuesto que elige anticuerpos como diana o compuesto de agente-ligador-antígeno es específico para la molécula diana, y el compuesto o anticuerpo comprende una actividad biológica eficaz contra la enfermedad o afección.

20 En el presente documento todavía se desvelan adicionalmente procedimientos de obtención de imágenes de células o matriz extracelular en un individuo en los que las células o matriz extracelular expresan una molécula diana. En un enfoque, un compuesto que elige anticuerpos como diana de la divulgación está ligado a una marca detectable y se administra al individuo. En otro enfoque, un compuesto de agente-ligador-antígeno y un anticuerpo específico para el antígeno se administran por separado al individuo y el agente que elige anticuerpos como diana se forma *in vivo* cuando el compuesto de agente-ligador-antígeno se asocia no covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos. En ambos enfoques, la marca puede ligarse al anticuerpo, el agente que elige diana y/o el agente biológico.

30 En el presente documento se desvelan adicionalmente procedimientos de reducción de la infectividad de células microbianas o partículas virales presentes sobre una superficie. Según estos procedimientos, la superficie se pone en contacto con una cantidad eficaz de un compuesto que elige anticuerpos como diana de la divulgación, en los que el compuesto que elige anticuerpos como diana comprende un agente que elige diana o agente biológico específico para un receptor sobre dichas células microbianas o partículas de virus.

35 En el presente documento también se desvelan procedimientos de selección de una biblioteca química para agonistas o antagonistas de un receptor. El procedimiento incluye ligar miembros individuales de la biblioteca química al sitio de combinación de un anticuerpo y luego probar la biblioteca ligada a anticuerpos para unirse al receptor o para inhibición de la unión entre el receptor y un ligando para el receptor.

40 En el presente documento se desvelan adicionalmente diversos inmunoensayos que usan compuestos que eligen anticuerpos como diana de la divulgación. En una realización de la divulgación para detectar o medir analito en una muestra, la divulgación comprende el uso de un compuesto que elige anticuerpos como diana de la divulgación en el que la especificidad del anticuerpo por el analito resulta del agente que elige diana, que está ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos. En otra realización de la divulgación que implica un ensayo de unión directo o indirecto para determinar la presencia de un analito usando un anticuerpo específico para el analito, la divulgación comprende determinar la presencia del analito usando un anticuerpo específico para el analito en el que la especificidad del anticuerpo resulta de un agente que elige no anticuerpos como diana específico para el analito que está ligado a un aminoácido reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo.

50 En el presente documento todavía se desvelan adicionalmente procedimientos de inhibición o reducción de la capacidad de un agente que elige diana o agente biológico para cruzar una membrana celular. En estos procedimientos, un compuesto que elige anticuerpos como diana se forma ligando covalentemente el sitio de combinación de un anticuerpo que por sí mismo no cruza la membrana celular con el agente que elige diana o agente biológico, en el que el enlace de dicho anticuerpo con dicho agente que elige diana o agente biológico reduce o inhibe la capacidad del agente para cruzar la membrana celular.

55 En el presente documento se desvelan adicionalmente procedimientos de mediación de la administración intracelular de un fármaco intracelularmente activo. En estos procedimientos se prepara un compuesto que elige anticuerpos como diana, en los que dicho compuesto incluye uno o más agentes que eligen diana o uno o más agentes biológicos, o ambos, covalentemente ligados mediante un ligador al sitio de combinación del anticuerpo. Los agentes que eligen diana o agentes biológicos se caracterizan porque se unen con un receptor de célula y median en la internalización del agente. El compuesto que elige anticuerpos como diana también incluye un fármaco que es activo intracelularmente. La administración de fármaco intracelular se produce cuando una célula que expresa el receptor se pone en contacto con el compuesto que elige anticuerpos como diana.

65 La puesta en contacto produce la internalización del agente que elige anticuerpos como diana y la administración de dicho fármaco intracelularmente. En algunas realizaciones de la divulgación, el fármaco intracelularmente activo es

un profármaco que se vuelve activo cuando dicho fármaco se pone en contacto con un compartimento intracelular. El compuesto que elige anticuerpos como diana puede incluir una señal de tráfico intracelular para dirigir el compuesto que elige anticuerpos como diana internalizado a un compartimento intracelular particular.

- 5 La divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas o medicamentos que incluyen un compuesto que elige anticuerpos como diana de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La FIG. 1 muestra agentes que eligen integrina como diana a modo de ejemplo de los cuales los Paneles A-E son peptidomimético RGD mientras que el Panel F es un péptido RGD. Las estructuras centrales son las siguientes: patente de EE.UU. nº 6.335.330 (Panel A), patente de EE.UU. nº 5.693.636 (Panel B), patente de EE.UU. nº 6.040.311 (Panel C) y patente de EE.UU. nº 6.001.117 (Panel E).

15 La FIG. 2 muestra un esquema general de un compuesto de agente que elige diana-ligador con un ligador no ramificado (Panel A) con realizaciones específicas en el Panel B (SCS-873), Panel C (inhibidor de PST-ligador de diceto; compuesto 26), Panel D (TAK-799-ligador de diceto; compuesto 27) y Panel E (ligando de folato-ligador de dikona; compuesto 28).

20 La FIG. 3 muestra un esquema general de una realización de un compuesto de agente que elige diana-ligador con un ligador ramificado y dos agentes que eligen diana idénticos (Panel A) con realizaciones específicas en el Panel B (agente que elige integrina como diana-ligador de diceto; compuesto 29) y el Panel C (agente que elige integrina como diana-ligador de diceto; compuesto 30). El punto de ramificación está en la porción de cadena de conexión del ligador.

25 La FIG. 4 muestra un esquema general de una realización de un compuesto de agente que elige diana-ligador con un ligador ramificado y dos agentes que eligen diana diferentes (Panel A) con una realización específica en el Panel B (agente que elige integrina como diana y que elige folato diana-ligador de diceto; compuesto 31). El punto de ramificación está en la porción de cadena de conexión del ligador.

30 La FIG. 5 muestra un esquema general de una realización de un compuesto de agente que elige diana-ligador con un ligador ramificado y dos agentes que eligen diana diferentes (Panel A) con una realización específica en el Panel B (agente que elige integrina como diana-ligador de diceto; compuesto 32). El punto de ramificación está en la porción de grupo de reconocimiento del ligador.

35 La FIG. 6 muestra la estructura de grupos reactivos del ligador. Las estructuras A-C forman enlaces covalentes reversibles con grupo nucleófilo reactivo (por ejemplo, cadena lateral de lisina o cisteína) en el sitio de combinación de un anticuerpo (la estructura A podría formar un enlace covalente irreversible, X es N y si R₁ y R₃ forman parte de una estructura cíclica). R₁ y R₂ y R₃ en las estructuras A-C representan sustituyentes que pueden ser C, H, N, O, P, S, Si, halógeno (F, Cl, Br, I) o una sal de los mismos. X es N, C, Si, o cualquier otro heteroátomo. Estos sustituyentes también pueden incluir un grupo tal como un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, oxoalquinilo, aminoalquilo, aminoalquenilo, aminoalquinilo, sulfoalquilo, sulfoalquenilo o sulfoalquinilo, grupo fosfoalquilo, fosfoalquenilo, fosfoalquinilo. R₂ y R₃ podrían ser cíclicos como se ejemplifica en las estructuras B y C mientras que X podría ser un heteroátomo. Las estructuras D-G forman enlaces covalentes no reversibles con el grupo nucleófilo reactivo (por ejemplo, cadena lateral de lisina o cisteína) en el sitio de combinación de un anticuerpo. En estas estructuras, R₁ y R₂ representan C, O N, haluro y grupos salientes tales como mesilo o tosiló.

50 La FIG. 7 muestra diversos electrófilos adecuados para la modificación reactiva con una cadena lateral de aminoácido reactivo de un anticuerpo. Clave: (A) acil-beta-lactama; (B) dicetona simple; (C) éster activo de succinimida; (D) maleimida; (E) haloacetamida con ligador; (F) halocetona; (G) ciclohexildicetona; y (H) aldehído. R se refiere a otra estructura que puede incluir un agente que elige diana, ligador o anticuerpo, mientras que X se refiere a halógeno.

55 La FIG. 8 muestra la estructura del grupo de reconocimiento de ligador (Y), situada entre la porción de grupo reactivo y la porción de cadena de conexión del ligador. El Panel A muestra la relación del grupo de reconocimiento Y dentro del ligador (véase la FIG. 2). Los Paneles B-D muestran la distancia de Y de Z, sustituyentes sobre el anillo y átomos miembros del anillo.

60 La FIG. 9 muestra la estructura de la cadena de conexión del ligador (X), que se une directamente en un extremo al agente que elige diana como se muestra en el Panel A (véase la FIG. 2). Los sustituyentes R₂ a R₄ son C, H, N, O, P, S, Si, halógeno (F, Cl, Br, I) o una sal de los mismos, y pueden incluir un grupo tal como un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, oxoalquinilo, aminoalquilo, aminoalquenilo, aminoalquinilo, sulfoalquilo, sulfoalquenilo, sulfoalquinilo, fosfoalquilo, fosfoalquenilo, fosfoalquinilo, además de una estructura de anillo saturado o insaturado carbocíclico o heterocíclico mono o condensado. Panel B: R₁ es O y R₂ es C, H, N, O, P, S, Si, halógeno (F, Cl, Br, I) o una sal de los mismos. En la cadena de conexión en las

estructuras B y C, n, r o m es 1-100. En las estructuras D y E, n es 1, 2, 4, o más preferentemente es 3.

La FIG. 10 muestra el Esquema 1, un esquema sintético para el precursor de amina de SCS-873, agente que elige diana **3** o SCS-amina. Clave: (a) BBr₃, CH₂Cl₂, -20 °C, 2 h; (b) DMF, ta a 80 °C, 3 h; (c) BnCOCl, NaHCO₃ ac. sat., éter; (d) TBDPSiCl, imidazol, DMF, 16 h; (e) Pd(OAc)₂, (o-tol)₃P, *i*-Pr₂EtN, CH₃CH₂CN, reflujo, 3 h; (f) 20 % (peso/peso) de Pd-C (10 %), H₂, EtOH-AcOH (1:1), 36 h; (g) TBAF, THF, ta, 1 h; (h) DEAD, PPh₃, THF-benceno (3:1), 16 h; (i) 20 % (peso/peso) de Pd-C (10 %), ciclohexeno-*i*-PrOH (1:1), 90 °C, 12 h; (j) i. NaOH 2 N ac., MeOH-THF (1:1), 16 h, ii. TFAA, anisol, CH₂Cl₂, 0 °C, 2 h.

La FIG. 11 muestra el Esquema 2, un esquema sintético para preparar el compuesto **4** (R = derivado de butoxicarboxiaminohexanoílo). Clave: (a) DMF, ta; (b) EDC, HOBT, DMF; (c) 0,01 M en DMSO, 130 °C; (d) TFAA, anisol, diclorometano; (e) DMF; (f) EDC, HOBT, DMF; (g) (i) etapa d, (ii) NaOH 2 M, MeOH-THF (1:1).

La FIG. 12 muestra el Esquema 3, un esquema sintético para preparar los compuestos SCS-873 y SCS-1655.

La FIG. 13 muestra el Esquema 4, un esquema sintético para preparar los compuestos SCS-864 y SCS-789. Clave: (a) Et₃N, DMF, ta, 16 h.

La FIG. 14 muestra un esquema para formar un compuesto de agente que elige diana-ligador usando un ligador con un grupo reactivo de maleimida-dicetona.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona diversos compuestos que eligen anticuerpos como diana en los que los agentes que eligen diana y/o agentes biológicos están ligados covalentemente o no covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo. Si uno o más agentes que eligen diana están ligados, al menos uno de los agentes que eligen diana se ligará de manera que pueda unirse a su diana. Esto puede lograrse ligando el agente que elige diana de un modo que no afecte su especificidad de unión por la diana y distanciando suficientemente el agente que elige diana del sitio de combinación de anticuerpos de manera que pueda unirse a su diana sin impedimento estérico por el anticuerpo. Esto puede lograrse usando un ligador adecuado y la estrategia de enlace tratada en detalle más adelante.

Por tanto, si un agente biológico no es un agente que elige diana se prefiere que el anticuerpo retenga al menos algo de especificidad de unión del antígeno tras el enlace con uno o más agentes biológicos. El compuesto de anticuerpo en el que uno o más agentes biológicos están ligados al sitio de combinación de anticuerpos puede presentar actividad biológica debido a un agente biológico ligado si tal agente es biológicamente activo mientras está ligado al anticuerpo. Esto puede lograrse por diversas estrategias tales como ligando el sitio de combinación de anticuerpos con una localización sobre el agente biológico que no afecta la actividad biológica. Otra estrategia es posicionar el agente biológico lejos del anticuerpo de manera que el agente biológico pueda unirse a otra molécula necesaria para la actividad sin impedimento estérico por el anticuerpo. Otras estrategias para obtener una actividad biológica de uno o más agentes biológicos enlazados al sitio de combinación de anticuerpos son muy conocidas para el experto. En algunas realizaciones, la actividad biológica de un agente biológico puede no realizarse hasta que el agente se libere del sitio de combinación de anticuerpos. Esto puede lograrse en algunas realizaciones mediante la ayuda de enlace lábil como se trata más adelante.

En algunas realizaciones, la especificidad de unión del antígeno nativo del anticuerpo que existe antes del enlace covalente no se modificará sustancialmente tras el enlace covalente. En otras palabras, el compuesto de anticuerpo resultante del enlace covalente de uno o más agentes que eligen diana o uno o más agentes biológicos puede unir los mismos antígenos con una afinidad similar a como lo hizo antes del enlace covalente. En otras realizaciones, la especificidad de unión del anticuerpo antes del enlace covalente se modificará sustancialmente tras el enlace covalente. La especificidad del anticuerpo de unión sustancialmente modificada que resulta del enlace covalente puede ser debida a una capacidad sustancialmente reducida del anticuerpo covalentemente ligado para unirse a un antígeno o una capacidad sustancialmente elevada del anticuerpo covalentemente ligado para unirse a un antígeno. En algunas realizaciones, la unión del sitio de unión del antígeno al antígeno se reduce suficientemente de forma que la especificidad de unión del antígeno original del anticuerpo se elimine eficazmente. En algunas realizaciones, el sitio de unión del antígeno al antígeno se reduce suficientemente de forma que la especificidad de unión del antígeno original del anticuerpo se elimine eficazmente y se sustituya con la de un agente(s) que elige(n) diana ligado(s) covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos. En realizaciones en las que la especificidad de unión del anticuerpo se sustituye eficazmente con la del (de los) agente(s) que elige(n) diana, el anticuerpo, después del enlace covalente al (a los) agente(s) que elige(n) diana presenta una afinidad por la molécula diana superior a aproximadamente 1×10^6 moles/litro.

Aunque no se desea quedar ligado a teoría alguna, la unión del anticuerpo sustancialmente reducida al antígeno puede resultar del (de los) agente(s) que elige(n) diana o agente(s) biológico(s) que impiden estéricamente que el antígeno se ponga en contacto con el sitio de combinación de anticuerpos. Alternativamente, o además, la unión del antígeno sustancialmente reducida puede producirse si la cadena lateral del aminoácido del sitio de combinación de

anticuerpos modificada por enlace covalente fuese importante para la unión al antígeno. La unión del anticuerpo sustancialmente elevada a un antígeno puede resultar cuando el (de los) agente(s) que elige(n) diana o agente(s) biológico(s) no impiden estéricamente que el antígeno se ponga en contacto con el sitio de combinación de anticuerpos y la cadena lateral del aminoácido del sitio de combinación de anticuerpos modificada por enlace covalente era importante para la unión al antígeno.

Los compuestos que eligen diana de la invención pueden comprender un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que tiene un único sitio de combinación tal como fragmentos de anticuerpos Fab o Fab'. En tales casos, el agente que elige diana se ligará en el sitio de combinación único de esa molécula de anticuerpo. Si un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una molécula que elige diana comprende dos o más sitios de combinación, al menos uno de los sitios de combinación incluirá un agente que elige diana covalentemente ligado. En algunos casos, todos o la mayoría de los sitios de combinación de un anticuerpo pueden ligarse covalentemente a un agente que elige diana. Si múltiples sitios de combinación de un anticuerpo van a ligarse a agentes que eligen diana, los sitios de combinación pueden todos tener el mismo agente que elige diana ligado al mismo o pueden tener diferentes agentes que eligen diana ligados al mismo anticuerpo. Se entendería fácilmente que podrían ligarse covalentemente múltiples agentes que eligen diana a un sitio de combinación de anticuerpos único. Tales agentes que eligen diana multiméricos pueden ser heteromultiméricos u homomultiméricos con respecto a la especificidad de los agentes que eligen diana en el multímero.

“Agente que elige diana” o “componente que elige diana”, como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que reconoce, se une o adhiere a un resto diana de una molécula diana localizada, por ejemplo, en una célula, tejido (por ejemplo, matriz extracelular), fluido, organismo o subconjunto del mismo. Un agente que elige diana y su molécula diana representan un par de unión de moléculas, que interactúan entre sí mediante cualquiera de una variedad de fuerzas moleculares que incluyen, por ejemplo, enlace iónico, covalente, hidrófobo, de van der Waals y de hidrógeno, de manera que el par tiene la propiedad de unirse específicamente entre sí. Unión específica significa que el par de unión presenta unión entre sí en condiciones en las que no se unen a otra molécula. Ejemplos de pares de unión son biotina-avidina, hormona-receptor, receptor-ligando, enzima-sustrato, IgG-proteína A, antígeno-anticuerpo. El agente que elige diana y su molécula diana relacionada presentan una asociación significativa entre sí. Esta asociación puede evaluarse determinando una constante de asociación en equilibrio (o constante de unión) según procedimientos muy conocidos en la técnica. La afinidad se calcula como $K_d = k_{dis} / k_{as}$ (k_{dis} es la constante de disociación, k_{as} es la constante de asociación y K_d es la constante de equilibrio).

La afinidad puede determinarse en equilibrio midiendo la fracción unida (r) de ligando marcado a diversas concentraciones (c). Los datos se representan usando la ecuación de Scatchard: $r/c = K(n-r)$ en la que

r = moles de ligando unido/mol de receptor en equilibrio;
 c = concentración de ligando libre en equilibrio;
 K = constante de asociación en equilibrio; y
 n = número de sitios de unión del ligando por molécula receptora

Por análisis gráfico, r/c se representa en el eje Y frente a r en el eje X produciendo así una representación de Scatchard. La afinidad es la pendiente negativa de la línea. K_{dis} puede determinarse por competición del ligando marcado unido con ligando en exceso sin marcar (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.316.409). La afinidad de un agente que elige diana por su molécula diana es preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-6} moles/litro, es más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-7} moles/litro, es incluso más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-8} moles/litro, es todavía incluso más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-9} moles/litro, y es lo más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-10} moles/litro.

Los agentes que eligen diana incluyen, pero no se limitan a, compuestos orgánicos de molécula pequeña de 5.000 dalton o menos tales como fármacos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, glicoproteínas, proteoglicanos, lípidos, glicolípidos, fosfolípidos, lipopolisacárido, ácidos nucleicos, proteoglicanos, hidratos de carbono. Los agentes que eligen diana pueden incluir compuestos terapéuticos muy conocidos que incluyen agentes antineoplásicos. Los agentes antineoplásicos que eligen diana pueden incluir paclitaxel, daunorubicina, doxorubicina, carminomicina, 4'-epiadriamicina, 4-demetoxi-daunomicina, 11-desoxidadaunorubicina, 13-desoxidadaunorubicina, adriamicina-14-benzoato, adriamicina-14-octanoato, adriamicina-14-naftalenoacetato, vinblastina, vincristina, mitomicina C, N-metilmitomicina C, bleomicina A₂, ácido dideazatetrahidrofólico, aminopterina, metotrexato, colchicina y cisplatino. Agentes antimicrobianos incluyen aminoglucósidos que incluyen gentamicina, compuestos antivirales tales como rifampicina, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) y aciclovir, agentes antifúngicos tales como azoles que incluyen fluconazol, macrólidos tales como anfotericina B y candicidina, compuestos antiparasitarios tales como antimoniales. Agentes de hormona que eligen diana incluyen toxinas tales como toxina diftérica, citocinas tales como CSF, GSF, GMCSF, TNF, eritropoyetina, inmunomoduladores o citocinas tales como los interferones o interleucinas, un neuropéptido, hormona reproductora tal como HGH, FSH o LH, hormona tiroidea, neurotransmisores tales como acetilcolina y receptores de hormona tales como el receptor de estrógenos.

En algunas realizaciones preferidas, el agente que elige diana no es un anticuerpo. En otras realizaciones

preferidas, el agente que elige diana no es un quelato de metal. Preferentemente, el agente que elige diana es una molécula pequeña en comparación con una inmunoglobulina nativa. El agente que elige diana, que incluye cualquier resto de enlace necesario para ligar covalentemente el agente que elige diana con un residuo de aminoácido del sitio de combinación de anticuerpos, tiene preferentemente al menos aproximadamente 300 dalton de tamaño, y preferentemente puede tener al menos aproximadamente 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500 o incluso 5.000 dalton de tamaño, con incluso el mayor tamaño posible.

Agentes que eligen diana adecuados en los compuestos que eligen diana de la invención pueden ser una proteína o péptido. "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Como se usa en el presente documento, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido que se produce naturalmente correspondiente. Estos términos también se aplican a polímeros de aminoácido que se producen naturalmente. Los aminoácidos pueden estar en la forma L o D en tanto que se mantenga la función de unión del péptido. Los péptidos pueden ser de longitud variable, pero tienen generalmente entre aproximadamente 4 y 200 aminoácidos de longitud. Los péptidos pueden ser cíclicos, que tienen un enlace intramolecular entre dos aminoácidos no adyacentes dentro del péptido, por ejemplo, ciclación esqueleto a esqueleto, cadena lateral a esqueleto y cadena lateral a cadena lateral. Los péptidos cíclicos pueden prepararse mediante procedimientos muy conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.013.625.

Los agentes que eligen proteína o péptido como diana que presentan actividad de unión por una molécula diana son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un agente que elige diana puede ser un inhibidor de la fusión de células de péptidos virales. Esto puede incluir el inhibidor de la fusión T-20 VIH-1 gp41 que elige como diana los receptores de fusión sobre células infectadas por el VIH (para T-20 véanse las patentes de EE.UU. nº 6.281.331 y 6.015.881 a Kang y col.; Nagashima y col., J. Infectious Diseases 183:1121, 2001; para otros inhibidores del VIH véase la patente de EE.UU. nº 6020459 a Barney y el documento WO 0151673A2 a Jeffs y col.), inhibidores de fusión de células del RSV (véase el documento WO 0164013A2 a Antczak y McKimm-Breschkin, Curr. Opin. Invest. Drugs 1:425-427, 2000 (VP-14637)), inhibidores de fusión de células del género pneumovirus (véase el documento WO 9938508A1 por Nitz y col.). Los agentes que eligen diana también incluyen hormonas peptídicas o análogos de hormonas peptídicas tales como LHRH, péptido liberador de bombesina/gastrina, somatostatina (por ejemplo, octapéptido RC-121), que puede usarse para elegir como diana cualquiera de una variedad de cánceres de ovario, mama, próstata, de células pequeñas del pulmón, colorrectal, gástrico y pancreático. Véase, por ejemplo, Schally y col., Eur. J. Endocrinology, 141:1-14, 1999.

Agentes que eligen péptidos como diana adecuados para su uso en compuestos que eligen diana de la invención también pueden identificarse usando la elección de diana *in vivo* de bibliotecas de fagos que expresan una biblioteca al azar de secuencias de péptidos (véase, por ejemplo, Arap y col., Nature Medicine, 2002 8(2):121-7; Arap y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002 99(3):1527-1531; Trepel y col., Curr. Opin. Chem. Biol. 2002 6(3):399-404).

En algunas realizaciones, el agente que elige diana es específico para una integrina. Las integrinas son complejos de glicoproteínas transmembrana heterodiméricas que funcionan en eventos de adhesión celular y procesos de transducción de señales. La integrina $\alpha_v\beta_3$ se expresa en numerosas células y se ha mostrado que media en varios procesos biológicamente relevantes, que incluyen la adhesión de osteoclastos a la matriz ósea, migración de células de músculo liso vasculares y angiogénesis. Los antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$ probablemente tienen uso en el tratamiento de varias enfermedades humanas, que incluyen enfermedades que implican neovascularización, tales como artritis reumatoide, cáncer y enfermedades oculares.

Agentes que eligen diana adecuados para integrinas incluyen péptidos o peptidomiméticos RGD o péptidos o peptidomiméticos no RGD. Como se usa en el presente documento, referencia a "péptido Arg-Gly-Asp" o "péptido RGD" pretende referirse a un péptido que tiene una o más secuencias que contienen Arg-Gly-Asp que pueden servir de sitio de unión para un receptor de la "familia de receptores de Arg-Gly-Asp", por ejemplo, una integrina. Las integrinas, que comprenden una subunidad alfa y una beta incluyen numerosos tipos que incluyen $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_D\beta_2$, $\alpha_D\beta_2$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_x\beta_2$; $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_{IELb}\beta_7$. La secuencia RGD está presente en varias proteínas de la matriz y es la diana para la unión de células a la matriz por integrinas. Las plaquetas contienen una gran cantidad de receptores de la superficie celular de RGD de la proteína GP IIb/IIIa, que es principalmente responsable, mediante interacción con otras plaquetas y con la superficie endotelial de vasos sanguíneos lesionados, del desarrollo de trombosis de la arteria coronaria. El término péptido RGD también incluye aminoácidos que son equivalentes funcionales (por ejemplo, RLD o KGD) del mismo siempre que interaccionen con el mismo receptor de RGD. Los péptidos que contienen secuencias de RGD pueden sintetizarse a partir de aminoácidos por medios muy conocidos en la técnica usando, por ejemplo, un sintetizador de péptidos automatizado, tal como aquellos fabricados por Applied Biosystems, Inc., Foster City, Calif.

Como se usa en el presente documento, péptido "no RGD" se refiere a un péptido que es un antagonista o agonista de la unión de integrina a su ligando (por ejemplo, fibronectina, vitronectina, laminina, colágeno etc.), pero no implica un sitio de unión de RGD. Los péptidos de integrina no RGD son conocidos por $\alpha_v\beta_3$ (véanse, por ejemplo, las

patentes de EE.UU. nº 5.767.071 y 5.780.426), además de por otras integrinas tales como $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4), $\alpha_4\beta_7$ (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.365.619; Chang y col., *Bioorganic & Medicinal Chem Lett*, 12:159-163 (2002); Lin y col., *Bioorganic & Medicinal Chem Lett*, 12:133-136 (2002)).

5 Un agente que elige integrina como diana puede ser un agonista o antagonista de peptidomimético, que preferentemente es un agonista o antagonista de peptidomimético de un péptido RGD o péptido no RGD. Como se usa en el presente documento, el término "peptidomimético" es un compuesto que contiene elementos estructurales no peptídicos que puede imitar o antagonizar la(s) acción (acciones) biológica(s) de un péptido parental natural. Un peptidomimético de un péptido RGD es una molécula orgánica que retiene grupos farmacóforos de la cadena de péptido similares de la secuencia de aminoácidos de RGD, pero carece de aminoácidos o enlaces peptídicos en la secuencia del sitio de unión. Asimismo, un peptidomimético de un péptido no RGD es una molécula orgánica que retiene grupos farmacóforos de la cadena de péptido similares de la secuencia del sitio de unión no RGD pero carece de aminoácidos o enlaces peptídicos en la secuencia del sitio de unión. Un "farmacóforo" es una disposición tridimensional particular de grupos funcionales que se requiere para que un compuesto produzca una respuesta particular o tenga una actividad deseada. El término "peptidomimético de RGD" pretende referirse a un compuesto que comprende una molécula que contiene los farmacóforos de RGD soportados por una estructura orgánica/de no péptido. Se entiende que un peptidomimético de RGD (o peptidomimético no RGD) puede ser parte de una molécula mayor que incluye por sí misma aminoácidos convencionales o modificados ligados por enlaces peptídicos.

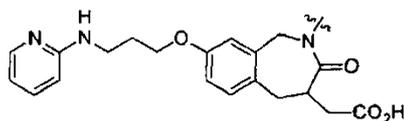
20 Los peptidomiméticos de RGD son muy conocidos en la técnica y se han descrito con respecto a integrinas tales como GPIIb/IIIa, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (véase, por ejemplo, Miller y col., *J. Med. Chem.* 2000, 43:22-26; y las publicaciones de patente internacional WO 0110867, WO 9915178, WO 9915170, WO 9815278, WO 9814192, WO 0035887, WO 9906049, WO 9724119 y WO 9600730; véase también Kumar y col., *Cancer Res.* 61:2232-2238 (2000)). Muchos de tales compuestos son específicos para más de una integrina. Los peptidomiméticos RGD se basan generalmente en un núcleo o plantilla (también denominado "plantilla de antagonistas de receptores de fibrinógeno") a la que están ligado a modo de espaciadores a un grupo ácido en un extremo y un grupo básico en el otro extremo del núcleo. El grupo ácido es generalmente una funcionalidad ácido carboxílico mientras que el grupo básico es generalmente un resto que contiene N tal como una amidina o guanidina. Normalmente, la estructura central añade una forma de separación rígida entre el resto ácido y el resto de nitrógeno básico, y contiene una o más estructuras de anillo (por ejemplo, piridina, indazol, etc.) o enlaces amida para este fin. Para un antagonista de receptores de fibrinógeno generalmente están presentes aproximadamente doce a quince, más preferentemente trece o catorce, enlaces covalentes intermedios (mediante la trayectoria intramolecular más corta) entre el grupo ácido del peptidomimético RGD y un nitrógeno del grupo básico. El número de enlaces covalentes intermedios entre el resto ácido y básico es generalmente más corto, dos a cinco, preferentemente tres o cuatro, para un antagonista de receptores de vitronectina. El núcleo particular puede elegirse para obtener la separación apropiada entre el resto ácido de la plantilla de antagonistas de fibrinógeno y el átomo de nitrógeno de la piridina. Generalmente, un antagonista de fibrinógeno tendrá una distancia intramolecular de aproximadamente 16 angstroms (1,6 nm) entre el resto ácido (por ejemplo, el átomo que cede el protón o acepta el par de electrones) y el resto básico (por ejemplo, que acepta un protón y dona un par de electrones), mientras que un antagonista de vitronectina tendrá aproximadamente 14 angstroms (1,4 nm) entre los centros ácido y básico respectivos. Más descripción para convertir de un mimético de receptor de fibrinógeno en un mimético de receptor de vitronectina puede encontrarse en la patente de EE.UU. nº 6.159.964.

45 El núcleo del peptidomimético RGD puede comprender un sistema de anillos mono- o policíclico aromático o no aromático de 5-11 miembros que contiene 0 a 6 dobles enlaces, y que contiene 0 a 6 heteroátomos elegidos de N, O y S. El sistema de anillos puede estar sin sustituir o puede estar sustituido sobre un átomo de carbono o de nitrógeno. Estructuras de núcleo preferidas con sustituyentes adecuados útiles para la unión de vitronectina incluyen grupos monocíclicos y bicíclicos, tales como la benzazapina descrita en el documento WO 98/14192, la benzodiazapina descrita en el documento U.S. 6.239.168 y tricíclicos condensados descritos en el documento U.S. 6.008.213.

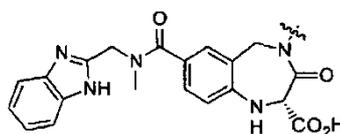
50 La patente de EE.UU. nº 6.159.964 contiene una amplia lista de referencias en la Tabla 1 de ese documento que desvelan estructuras de núcleo de peptidomiméticos RGD (denominadas plantillas de fibrinógeno) que pueden usarse para preparar peptidomiméticos RGD. Los peptidomiméticos RGD de vitronectina y RGD de fibronectina preferidos se desvelan en las patentes de EE.UU. nº 6.335.330; 5.977.101; 6.088.213; 6.069.158; 6.191.304; 6.239.138; 6.159.964; 6.117.910; 6.117.866; 6.008.214; 6.127.359; 5.939.412; 5.693.636; 6.403.578; 6.387.895; 6.268.378; 6.218.387; 6.207.663; 6.011.045; 5.990.145; 6.399.620; 6.322.770; 6.017.925; 5.981.546; 5.952.341; 6.413.955; 6.340.679; 6.313.119; 6.268.378; 6.211.184; 6.066.648; 5.843.906; 6.251.944; 5.952.381; 5.852.210; 5.811.441; 6.114.328; 5.849.736; 5.446.056; 5.756.441; 6.028.087; 6.037.343; 5.795.893; 5.726.192; 5.741.804; 5.470.849; 6.319.937; 6.172.256; 5.773.644; 6.028.223; 6.232.308; 6.322.770; 5.760.028.

65 Agentes que eligen integrina peptidomimética RGD como diana a modo de ejemplo se muestran a continuación como los compuestos 1, 2 y 3 y pueden usarse para preparar un compuesto que elige integrina como diana de la presente invención. En los tres compuestos, el ligador está unido como se indica al nitrógeno del anillo de siete miembros. Otros agentes peptidomiméticos RGD que eligen integrina como diana incluyen el compuesto 33, en el que P y L o carbono o nitrógeno. El ligador puede ser R1 o R2 mientras que el grupo R3 incluye un grupo básico tal

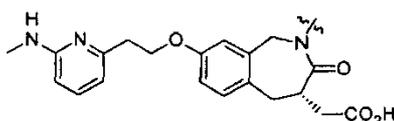
como un grupo -NH. En algunas realizaciones, el grupo R3 es como se muestra en los compuestos 1, 2 ó 33. En algunas realizaciones, el grupo R3 incluye un grupo heterocíclico tal como grupo bencimidazol, imidazol, piridina. En algunas de tales realizaciones, el grupo R3 es un grupo alcoxi, tal como un grupo propoxi, que está sustituido con un grupo heterociclilo que está sustituido con un grupo alquilamina, tal como un grupo metilamino, mientras que en otras realizaciones el grupo R3 es un grupo alcoxi, tal como un grupo propoxi, sustituido con un grupo heterocicililamino, tal como con un grupo piridinilamino tal como un grupo 2-piridinilamino. En otras realizaciones, R3 es un grupo de fórmula -C(=O)Rb en la que Rb está seleccionado de grupos -N(alquil)-alquil-heterociclilo tales como grupos -N(Me)-CH₂-bencimidazol.



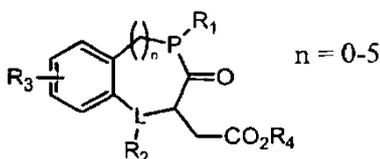
1



2



3



31

Otros agentes que eligen peptidomiméticos de integrina como diana a modo de ejemplo y un agente que elige péptido como diana se muestran en la FIG. 1. El ligador puede ser cualquiera de R₁, R₂, R₃, mientras que R₄ puede ser un ligador o un grupo hidrolizable tal como grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, oxoalquinilo, aminoalquilo, aminoalquenilo, aminoalquinilo, sulfoalquilo, sulfoalquenilo o sulfoalquinilo, grupo fosfoalquilo, fosfoalquenilo, fosfoalquinilo. Un experto en la materia apreciará fácilmente que también pueden usarse otros miméticos de agonistas y antagonistas de integrina en compuestos que eligen diana de la presente invención.

La molécula diana con la que el agente que elige diana del compuesto que elige diana se une es preferentemente una molécula de no inmunoglobulina o es una molécula de inmunoglobulina en la que el resto diana está fuera del sitio de combinación de inmunoglobulina. No se pretende excluir de los compuestos inventivos aquellos agentes que eligen diana que sirven de antígenos y, por tanto, se unen con un sitio de combinación de inmunoglobulinas. Tales agentes que eligen diana están incluidos en el presente documento siempre que los agentes que eligen diana también se unan a una molécula de no inmunoglobulina y/o un resto diana localizado fuera del sitio de combinación de una molécula de inmunoglobulina. En general, la molécula diana puede ser cualquier tipo de molécula que incluye orgánica, inorgánica, proteína, lípido, hidrato de carbono, ácido nucleico.

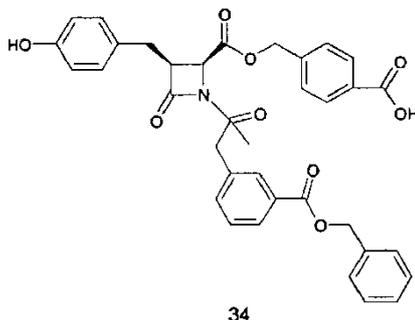
La molécula diana es preferentemente una biomolécula tal como una proteína, hidrato de carbono, lípido o ácido nucleico. La molécula diana puede asociarse a una célula ("expresarse en la superficie celular") u otra partícula ("expresarse en la superficie de la partícula") tal como un virus, o puede ser extracelular. Si se asocia a una célula o partícula, la molécula diana se expresa preferentemente sobre la superficie de la célula o partícula de un modo que permita que el agente que elige diana del compuesto que elige diana haga contacto con el receptor de superficie de la fase fluida del cuerpo.

En algunas realizaciones preferidas, la molécula diana está asociada predominantemente o exclusivamente a una afección patológica o célula enferma, tejido o fluido. Así, el agente que elige diana de un presente compuesto que elige anticuerpos como diana puede usarse para administrar el compuesto que elige diana a un tejido enfermo eligiendo como diana la célula, una biomolécula de la matriz extracelular o una biomolécula de fluido. Moléculas diana a modo de ejemplo desveladas en lo sucesivo en los ejemplos incluyen integrinas (Ejemplo 1), receptores de citocinas (Ejemplos 2, 3 y 7), citocinas (Ejemplo 4), receptores de vitaminas (Ejemplo 5), enzimas de la superficie celular (Ejemplo 6) y células infectadas por el virus VIH-1 y el virus HN-1 (Ejemplos 8 y 11).

En otras realizaciones preferidas, la molécula diana está asociada con un agente infeccioso y se expresa sobre la superficie de una célula microbiana o sobre la superficie de una partícula viral. Como tales, las composiciones que eligen anticuerpos como diana en las que el agente que elige diana puede unirse al agente infeccioso expresado en la superficie celular o expresado en la partícula pueden usarse como antimicrobiano, eligiendo como diana agentes microbianos dentro del cuerpo o sobre la superficie (por ejemplo, piel) de un individuo. En el último caso, el compuesto de la invención puede aplicarse tópicamente.

Los agentes que eligen anticuerpos como diana específicos para una molécula diana microbiana también pueden usarse como agente antimicrobiano *in vitro*. Por consiguiente, se proporciona un procedimiento de reducción de la infectividad de células microbianas o partículas virales presentes sobre una superficie. Algunos procedimientos incluyen poner en contacto la superficie de una célula microbiana o partícula viral con una cantidad eficaz del compuesto que elige diana de la invención. El compuesto que elige diana en tales procedimientos incluye un agente que elige diana específico para un receptor sobre la célula microbiana o partícula de virus. Superficies aplicables son cualquier superficie *in vitro* tal como un encimera, preservativo.

Otra molécula diana preferida para elegir como diana moléculas de la invención es el antígeno específico de la próstata (PSA), una serina proteasa que participa en una variedad de estados de enfermedad que incluyen cáncer de próstata, cáncer de mama y metástasis ósea. Se conocen inhibidores específicos del PSA que se unen al sitio activo de PSA. Véase Adlington y col., J. Med. Chem., 2001, 44:1491-1508 y el documento WO 98/25895 a Anderson. Un inhibidor de PST específico se muestra a continuación como el compuesto 34.



Un agente que elige diana, además de su capacidad para unirse a una molécula diana, puede caracterizarse porque tiene una o más actividades biológicas, cada actividad caracterizada como un efecto biológico detectable sobre el funcionamiento de un órgano de la célula u organismo. Así, además de ser un agente que elige diana, tales compuestos pueden considerarse agentes biológicos. Por ejemplo, los agentes que eligen integrina como diana mostrados como los compuestos 1, 2, 3 y 33 anteriormente no solo eligen como diana una integrina, sino que tienen actividad biológica de antagonista de integrina. En algunas realizaciones, sin embargo, un agente que elige diana puede ser un agente de unión puro sin actividad biológica.

Los compuestos que eligen diana de la invención incluyen un agente que elige diana que está ligado covalentemente a un sitio de combinación de un anticuerpo. Tales compuestos que eligen diana pueden tener una o más actividades biológicas asociadas al compuesto que elige diana. La actividad biológica puede ser una característica inherente del propio agente que elige diana o puede proporcionarse por un agente biológico distinto del agente que elige diana en el compuesto que elige diana. El agente biológico puede asociarse covalentemente o no covalentemente con las otras moléculas o porciones del compuesto que elige diana, aunque se prefiere el enlace covalente. El agente biológico puede ligarse a tanto el agente que elige diana, el anticuerpo, como ambos, por medios muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, véanse Kiaris y col., Eur. J. Cancer 37:620-628 (2001) y Schally y col., Eur. J. Endocrin. 141:1-14 (1989), que describen diversos conjugados entre agentes que eligen hormona peptídica como diana y doxorubicina. Véanse también Canevari y col., Ann Oncol 1994 Oct;5(8):698-701; Rihova, Folia Microbiol (Praha) 1995;40(4):367-84; Vitetta, Princess Takamatsu Symp 1988;19:333-40; y Ghose y col., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1987;3(4):263-359. Así, en algunas realizaciones, los compuestos que eligen como diana agentes que eligen anticuerpos como diana de la invención pueden incluir un componente funcional en forma de un agente que elige diana que tiene actividad biológica inherente. En tales realizaciones, el agente que elige diana está ligado a un sitio de combinación del anticuerpo o fragmento de anticuerpo y el agente que elige diana es el componente funcional que presenta la actividad biológica. En otras realizaciones, el compuesto que elige diana incluye un agente que elige diana ligado a un sitio de combinación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y también incluye un

componente funcional separado que se une o liga preferentemente al compuesto que elige diana mediante un enlace covalente.

5 Un agente que elige diana o agente biológico puede ligarse a un compuesto que elige anticuerpos como diana de la invención usando un enlace que es lábil bajo ciertas condiciones. El enlace lábil puede ser entre el anticuerpo y el agente que elige diana o agente biológico, mientras que si un ligador está presente, el enlace lábil puede ser entre el anticuerpo y el ligador, el agente que elige diana o agente biológico y el ligador, dentro del ligador, o combinaciones de los mismos.

10 Ligadores lábiles incluyen enlaces covalentes reversibles, enlaces sensibles al pH (sensibles a ácido o base), enlaces sensibles a enzimas, ligadores sensibles a la degradación, ligadores fotosensibles y combinaciones de los mismos. Estos distintivos también son características de un profármaco que puede considerarse un tipo de ligador lábil. Previamente se ha diseñado una variedad de ligadores lábiles. Por ejemplo, pueden formarse profármacos usando compuestos que tienen restos ácido carboxílico que se degradan lentamente por hidrólisis como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.498.729.

15 El diseño particular de un ligador lábil puede usarse para dirigir la liberación del agente biológico después de que haya alcanzado la diana prevista. Por ejemplo, puede diseñarse un enlace para dirigir la liberación en un compartimento intracelular o en un compartimento extracelular particular en el que pueden acumularse los compuestos que eligen anticuerpos como diana. Un ligador lábil a ácidos tal como un ligador de ácido cis-aconítico puede aprovecharse del entorno ácido de diferentes compartimentos intracelulares tales como los endosomas encontrados durante la endocitosis mediada por receptor y los lisosomas. Véanse Shen y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1981) 102:1048-1054; Yang y col., *J. Natl. Canc. Inst.* (1988) 80: 1154-1159. Puede usarse un brazo espaciador de péptido localizado dentro de o en los extremos de un ligador para efectuar la liberación de un agente que elige diana o agente biológico por la acción de una peptidasa tal como una peptidasa lisosómica. Véase, por ejemplo, Trouet y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1982) 79: 626-629.

20 Los agentes que eligen diana particulares pueden o pueden no poseer actividad biológica dependiendo del contexto de su uso. Por ejemplo, el fármaco terapéutico doxorubicina, que es un intercalador de ADN, puede ser un agente que elige diana para ADN bicatenario cuando el fármaco está ligado covalentemente a un anticuerpo y se aplica a ADN en una forma libre de células. La doxorubicina, sin embargo, no puede considerarse un agente que elige diana con respecto a una célula mientras que el fármaco está ligado covalentemente a un anticuerpo, a menos que el compuesto puede ser captado por la célula. En el último caso, la doxorubicina puede tener actividad biológica tras la captación si el fármaco puede acceder al ADN en el núcleo de la célula.

25 Componentes funcionales de agentes biológicos incluyen, pero no se limitan a, fármacos de molécula pequeña (un compuesto orgánico farmacéutico de aproximadamente 5.000 dalton o menos), moléculas orgánicas, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, glicoproteínas, proteoglicanos, lípidos, glicolípidos, fosfolípidos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos, proteoglicanos, hidratos de carbono. Los agentes biológicos pueden ser antineoplásicos, antimicrobianos, una hormona, un efector. Tales compuestos incluyen compuestos terapéuticos muy conocidos tales como los agentes antineoplásicos paclitaxel, daunorubicina, doxorubicina, carminomicina, 4'-epiadriamicina, 4-demetoxidaunomicina, 11-desoxidaunorubicina, 13-desoxidaunorubicina, adriamicina-14-benzoato, adriamicina-14-octanoato, adriamicina-14-naftalenoacetato, vinblastina, vincristina, mitomicina C, N-metilmitomicina C, bleomicina A₂, ácido dideazatetrahidrofólico, aminopterina, metotrexato, colchicina y cisplatino. Los agentes antimicrobianos incluyen aminoglucósidos que incluyen gentamicina, compuestos antivirales tales como rifampicina, 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT) y aciclovir, agentes antifúngicos tales como azoles que incluyen fluconazol, macrólidos tales como anfotericina B y candicidina, compuestos antiparasíticos tales como antimoniales. Las hormonas pueden incluir toxinas tales como toxina diftérica, citocinas tales como CSF, GSF, GMCSF, TNF, eritropoyetina, inmunomoduladores o citocinas tales como los interferones o interleucinas, un neuropéptido, hormona reproductora tal como HGH, FSH o LH, hormona tiroidea, neurotransmisores tales como acetilcolina, receptores de hormona tales como el receptor de estrógenos. También están incluidos antiinflamatorios no esteroideos tales como indometacina, acetato de ácido salicílico, ibuprofeno, sulindaco, piroxicam y naproxeno, y anestésicos o analgésicos. También están incluidos radioisótopos tales como aquellos útiles para la obtención de imágenes, además de para terapia.

30 Los componentes funcionales de agentes biológicos para su uso en los compuestos que eligen diana de la invención pueden producirse naturalmente o ser sintéticos. Los agentes biológicos pueden ser biológicamente activos en su estado nativo, o ser biológicamente inactivos o estar en un estado precursor latente y adquirir la actividad biológica o terapéutica cuando una porción del agente biológico se hidroliza, escinde o se modifica de otro modo. El profármaco puede administrarse en la superficie de una célula o intracelularmente usando compuestos que eligen anticuerpos como diana de la invención en los que luego puede activarse. A este respecto, el agente biológico puede ser un "profármaco", que significa que las moléculas de profármaco pueden convertirse en fármacos (compuestos terapéuticos activos) por ciertas modificaciones químicas o enzimáticas de su estructura. En el enfoque de profármaco, la administración de fármaco específica para sitio puede obtenerse de la activación específica para sitio de un profármaco, que es el resultado del metabolismo por una enzima que es tanto única para el tejido como está presente a mayor concentración (en comparación con otros tejidos); así activa el profármaco más eficazmente.

Puede usarse tratamiento fotodinámico para activar un profármaco escindiendo un ligador fotosensible o activando una enzima fotosensible (hidrólisis de enzimas de acilo) como se ha descrito previamente (véanse las patentes de EE.UU. nº 5.114.851 y 5.218.137). El tratamiento fotodinámico también puede usarse para inactivar rápidamente un fármaco en sitios en los que la actividad del fármaco no se desea (por ejemplo, tejidos no diana). En la técnica son muy conocidos diversos medios de modificación covalente de un fármaco para formar un profármaco.

Los agentes que eligen diana pueden ligarse covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos directamente o mediante la ayuda de un ligador. Un ligador apropiado puede elegirse para proporcionar distancia suficiente entre el agente que elige diana y el sitio de combinación de anticuerpos con el fin de que el agente que elige diana sea capaz de unirse a su molécula diana. Esta distancia depende de varios factores que incluyen, por ejemplo, la distancia de la superficie más externa del sitio de combinación de anticuerpos a la cadena lateral reactiva en el sitio de combinación, y la naturaleza del agente que elige diana. Generalmente, el ligador tendrá entre aproximadamente 5 y 10 angstroms (0,5 a 1 nm) de longitud, siendo más preferidos 10 o más angstroms (1,0 nm), aunque ligadores más cortos de aproximadamente 3 angstroms (0,3 nm) de longitud pueden ser suficientes si la cadena lateral del aminoácido está muy próxima a la porción más externa del sitio de combinación y/o el agente que elige diana o agente biológico incluye un segmento que puede servir de una parte de un ligador.

La longitud del ligador también puede visualizarse en términos del número de átomos lineales (restos cíclicos tales como anillos aromáticos van a contarse tomando la vía más corta). La longitud del ligador bajo esta medida es generalmente aproximadamente 10 a 200 átomos y más normalmente aproximadamente 30 o más átomos, aunque ligadores más cortos de dos o más átomos pueden ser suficientes si la cadena lateral del aminoácido reactivo está muy próxima a la porción más externa del sitio de combinación. Generalmente son suficientes ligadores con un estiramiento lineal de al menos aproximadamente 9 átomos. Otras consideraciones de los ligadores incluyen el efecto sobre propiedades físicas o farmacocinéticas del compuesto que elige diana resultante o agente que elige diana-ligador, solubilidad, lipofilia, hidrofilia, hidrofobia, estabilidad (más o menos estable, además de degradación planeada), rigidez, flexibilidad, inmunogenicidad, modulación de la unión del anticuerpo, compatibilidad química con agente que elige diana, capacidad para incorporarse en una micela o liposoma.

En compuestos que eligen diana en los que un ligador está presente entre el sitio de combinación de anticuerpos, el agente que elige diana puede prepararse por varios enfoques. En un enfoque, un compuesto de agente que elige diana-ligador y/o compuesto de agente biológico-ligador se sintetiza con un ligador que incluye uno o más grupos reactivos diseñados para la reacción covalente con una cadena lateral de un aminoácido en el sitio de combinación de un anticuerpo. El compuesto de agente-ligador y anticuerpo se combinan en condiciones en las que el grupo reactivo del ligador forma un enlace covalente con la cadena lateral del aminoácido.

En otro enfoque, el enlace puede lograrse sintetizando un compuesto de anticuerpo-ligador que comprende un anticuerpo y un ligador en el que el ligador incluye uno o más grupos reactivos diseñados para la reacción covalente con un resto químico apropiado del agente que elige diana o agente biológico. El agente que elige diana o agente biológico puede necesitar modificarse para proporcionar el resto apropiado para la reacción con el grupo reactivo del ligador. El anticuerpo-ligador y agente que elige diana y/o agente biológico se combinan en condiciones en las que el grupo reactivo del ligador se liga covalentemente con el agente que elige diana y/o biológico.

Otro enfoque para formar un compuesto que elige anticuerpos como diana de la invención usa un diseño de ligador dual. En una realización se sintetiza un compuesto de agente-ligador que comprende un agente que elige diana y/o un agente biológico y un ligador con un grupo reactivo. Se sintetiza un compuesto de anticuerpo-ligador que comprende un anticuerpo y un ligador con un grupo químico susceptible a reactividad con el grupo reactivo del agente-ligador de la primera etapa. Estos compuestos que contienen dos ligadores se combinan entonces en condiciones por las cuales los ligadores se ligan covalentemente, formando el compuesto que elige anticuerpos como diana.

En otra realización se sintetiza un compuesto de anticuerpo-ligador que comprende un anticuerpo y un ligador con un grupo reactivo. Se prepara un compuesto de agente que elige diana y/o agente biológico-ligador que comprende el agente y un ligador con un grupo químico susceptible a reactividad con el grupo reactivo del anticuerpo-ligador de la primera etapa. Estos compuestos que contienen dos ligadores se combinan entonces en condiciones por las cuales los ligadores se ligan covalentemente, formando el compuesto que elige anticuerpos como diana. "Susceptible" como se usa en el presente documento con referencia a un resto químico indica que el resto químico se ligará covalentemente con un grupo reactivo compatible. Así, un grupo electrófilo es susceptible a enlace covalente con un grupo nucleófilo y viceversa.

Como se ha tratado, el ligador puede conjugarse primero con el agente que elige diana y entonces el agente que elige diana-ligador conjugarse con el sitio de combinación de anticuerpos. Alternativamente, el ligador puede conjugarse primero con el sitio de combinación de anticuerpos y el anticuerpo-ligador conjugarse con el agente que elige diana. Pueden usarse numerosos medios muy conocidos en la técnica para unir un ligador al agente que elige diana o sitio de combinación de anticuerpos. Grupos funcionales a modo de ejemplo que pueden participar en el enlace incluyen, por ejemplo, ésteres, amidas, éteres, fosfatos, amino, ceto, amidina, guanidina, iminas, eneaminas, fosfatos, fosfonatos, epóxidos, aziridinas, tioepóxidos, dicetonas enmascaradas o protegidas (por ejemplo, cetales),

lactamas, halocetonas, aldehídos, tiocarbamato, tioamida, tioéster, sulfuro, disulfuro, fosforamida, sulfonamida, urea, tioruea, carbamato, carbonato, hidroxamida.

El ligador incluye cualquier átomo del grupo C, H, N, O, P, S, Si, halógeno (F, Cl, Br, I) o una sal de los mismos. El ligador también puede incluir un grupo tal como un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, oxoalquinilo, aminoalquilo, aminoalquenilo, aminoalquinilo, sulfoalquilo, sulfoalquenilo o sulfoalquinilo, grupo fosfoalquilo, fosfoalquenilo, fosfoalquinilo. El ligador también puede incluir una o más estructuras de anillo. Como se usa en el presente documento, una "estructura de anillo" incluye una estructura de anillo carbocíclica, homo o hetero, mono o condensada, saturada o insaturada. También pueden estar presentes combinaciones de los grupos y anillos anteriores en los ligadores de los compuestos que eligen diana de la invención.

El diseño general de una realización de un ligador no ramificado para su uso en la preparación de compuestos que eligen diana de la presente invención se muestra en la FIG. 2A. El ligador es de fórmula

X-Y-Z

en la que X es una cadena de conexión, Y es un grupo de reconocimiento y Z es un grupo reactivo. La Figura 2B-E muestra diversos compuestos de agente que elige diana-ligador con las porciones de ligador X, Y y Z identificadas. El ligador puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones, el ligador tiene un estiramiento lineal de entre 5-200 ó 10-200 átomos, aunque en otras realizaciones pueden usarse longitudes de ligador más largas. Uno o más agentes que eligen diana pueden ligarse a X. En algunas realizaciones, si más de un agente que elige diana está ligado y se usa un ligador ramificado, algunos de los agentes que eligen diana pueden ligarse a diferentes ramas del ligador. Sin embargo, debe entenderse que los ligadores usados en los compuestos de la invención pueden tener uno o más grupos de reconocimiento, uno o más grupos reactivos y una o más cadenas de conexión y combinaciones de los mismos. Las cadenas de conexión pueden ramificarse de otra cadena de conexión o de un grupo de reconocimiento.

La cadena de conexión X del ligador incluye cualquier átomo del grupo C, H, N, O, P, S, Si, halógeno (F, Cl, Br, I) o una sal de los mismos. X también puede incluir un grupo tal como un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, oxoalquinilo, aminoalquilo, aminoalquenilo, aminoalquinilo, sulfoalquilo, sulfoalquenilo o sulfoalquinilo, grupo fosfoalquilo, fosfoalquenilo, fosfoalquinilo. En algunas realizaciones, X puede incluir una o más estructuras de anillo. En una realización preferida, X incluye una unidad de éter de repetición de entre 2-100 unidades. Diversas realizaciones de X se muestran en la FIG. 9.

El grupo de reconocimiento Y del ligador es opcional y si está presente se localiza entre el grupo reactivo y la cadena de conexión. En realizaciones preferidas, Y está localizado a 1-20 átomos de Z. Aunque no se desea quedar ligado a teoría alguna, se cree que el grupo de reconocimiento actúa para posicionar apropiadamente el grupo reactivo en el sitio de combinación de anticuerpos de manera que pueda reaccionar con una cadena lateral del aminoácido reactivo. La FIG. 8 muestra una variedad de grupos de reconocimiento a modo de ejemplo con una o más estructuras de anillo homo o hetero de cinco o seis átomos. También pueden usarse estructuras de anillo mayores. Uno o más agentes que eligen diana pueden ligarse a Y. En algunas realizaciones, un ligador puede usarse para ligar el agente que elige diana con Y. En realizaciones en las que se usan dos o más agentes que eligen diana, uno o más pueden unirse a tanto X como Y. Más de un agente que elige diana también puede unirse a Y.

El grupo reactivo del ligador Z puede incluir cualquier grupo nucleófilo o electrófilo. En una realización preferida de la divulgación, Z puede formar un enlace covalente con una cadena lateral reactiva de un anticuerpo. En algunas realizaciones de la divulgación, Z puede incluir uno o más grupos C=O, dispuestos para formar una dicetona, una acil-beta-lactama, un éster activo, halocetona, un grupo ciclohexildicetona, un aldehído o maleimida. Otros grupos pueden incluir lactona, anhídrido y alfa-haloacetamida o un epóxido. Grupos reactivos electrófilos de ligador a modo de ejemplo que pueden ligarse covalentemente con un grupo nucleófilo reactivo (por ejemplo, cadena lateral de lisina o cisteína) en el sitio de combinación de un anticuerpo incluyen acil-beta-lactama, dicetona simple, éster activo de succinimida, maleimida, haloacetamida con ligador, halocetona, ciclohexildicetona, aldehído, amidina, guanidina, imina, eneamina, fosfato, fosfonato, epóxido, aziridina, tioepóxido, una dicetona enmascarada o protegida (por ejemplo, un cetal), lactama, sulfonato, grupos C=O enmascarados tales como imina, cetal, acetal y cualquier otro grupo electrófilo conocido. Un grupo reactivo preferido del ligador incluye uno o más grupos C=O dispuestos para formar una acil-beta-lactama, dicetona simple, éster activo de succinimida, maleimida, haloacetamida con ligador, halocetona, ciclohexildicetona o aldehído.

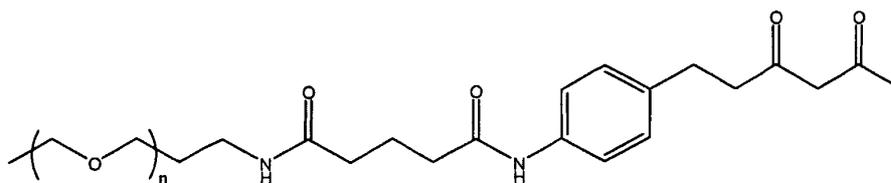
Z puede ser un grupo que forma un enlace covalente reversible o no reversible. En algunas realizaciones, los enlaces covalentes reversibles pueden formarse usando grupos Z de dicetona tales como aquellos mostrados en la FIG. 6. R₁ y R₂ y R₃ en las estructuras A-C de la FIG. 6 representan sustituyentes que puede ser C, H, N, O, P, S, Si, halógeno (F, Cl, Br, I) o una sal de los mismos. Estos sustituyentes también pueden incluir un grupo tal como un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, oxoalquinilo, aminoalquilo, aminoalquenilo, aminoalquinilo, sulfoalquilo, sulfoalquenilo o sulfoalquinilo, grupo fosfoalquilo, fosfoalquenilo, fosfoalquinilo. R₂ y R₃ también podrían formar una estructura de anillo como se ejemplifica en las estructuras B y C. X en la FIG. 6 podría ser un heteroátomo. Otros grupos Z que forman enlaces covalentes reversibles incluyen la amidina de dicetona,

imina y otros grupos reactivos mostrados en las estructuras B y G de la FIG. 7. La FIG. 7 también incluye las estructuras de otros grupos reactivos del ligador preferidos.

Los grupos reactivos Z que forman un enlace covalente no reversible con el sitio de combinación de un anticuerpo incluyen las estructuras D-G en la FIG. 6 y las estructuras A, C y D de la FIG. 7. Tales estructuras son útiles para unir no reversiblemente un agente que elige diana-ligador a un grupo nucleófilo reactivo (por ejemplo, cadena lateral de lisina o cisteína) en el sitio de combinación de un anticuerpo.

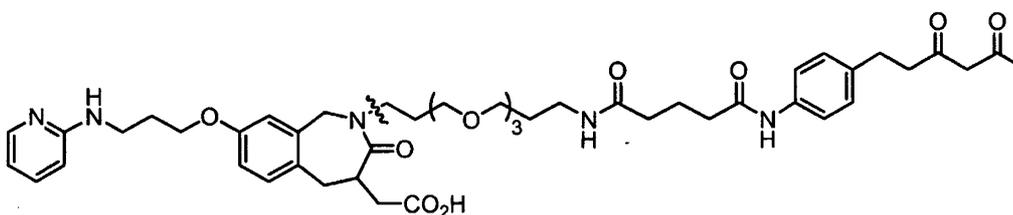
Debe entenderse que la química de enlaces covalentes reversibles y no reversibles anteriormente descrita también puede aplicarse a ligar un agente que elige diana o agente biológico con un anticuerpo en ausencia de un ligador o para ligar un agente que elige diana o agente biológico con un ligador (por ejemplo, con la cadena de conexión del ligador). Por ejemplo, un agente que elige diana puede ligarse a un ligador para formar un agente que elige diana-ligador poniendo un elemento tipo Z de grupo reactivo adecuado tal como un grupo nucleófilo o electrófilo apropiado sobre tanto el ligador como el agente que elige diana y un resto reactivo adecuado tal como un grupo amino o sulfhidral sobre los otros dos.

En el presente documento se desvela un ligador para su uso en compuestos que eligen diana de la invención y para preparar compuestos de agente que elige diana-ligador que incluyen un grupo reactivo 1,3-dicetona como Z. Otro ligador preferido es uno en el que la cadena de conexión X incluye una unidad de éter de repetición de entre 2-100 unidades. Se prefieren ligadores en los que el grupo de reconocimiento Y está presente con Y localizado preferentemente entre 1-20 átomos del grupo reactivo Z. Un ligador tal unido al núcleo de una integrina que elige resto de peptidomimético RGD como diana tal como aquellos descritos anteriormente puede tener la estructura 28 que se muestra a continuación en la que n es de 1-100 o más y preferentemente es 1, 2 ó 4, y más preferentemente es 3. En algunas realizaciones de la divulgación, el ligador es un polímero de repetición tal como polietilenglicol.



35

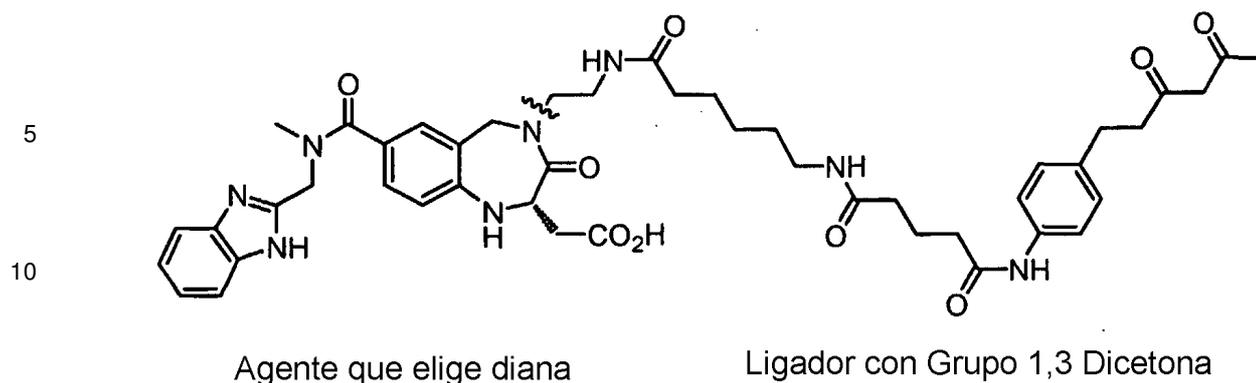
El grupo reactivo del ligador o grupo reactivo similar tal que puede ser inherente en el agente que elige diana se elige para su uso con un anticuerpo particular. Por ejemplo, un resto químico para la modificación por un anticuerpo para aldolasa puede ser una cetona, dicetona, beta-lactama, éster activo, halocetona, lactona, anhídrido, maleimida, alfa-haloacetamida, ciclohexildicetona, epóxido, aldehído, amidina, guanidina, imina, eneamina, fosfato, fosfonato, epóxido, aziridina, tioepóxido, dicetona enmascarada o protegida (por ejemplo, cetal), lactama, halocetona, aldehído. Una configuración de 1,3-dicetona tal como la dicetona mostrada en el compuesto SCS-873 (véase, a continuación) o SCS-864 (véase, a continuación), es especialmente preferida como sustrato para la modificación por un anticuerpo para aldolasa.



Agente que elige diana

Ligador con Grupo 1,3-Dicetona

SCS873



SCS864

Un resto químico del grupo reactivo del ligador (Z) adecuado para modificación covalente por un grupo sulfhidrilo reactivo en un anticuerpo puede ser un disulfuro, haluro de arilo, maleimida, alfa-haloacetamida, isocianato, epóxido, tioéster, éster activo, amidina, guanidina, imina, enamina, fosfato, fosfonato, epóxido, aziridina, tioepóxido, dicetona enmascarada o protegida (por ejemplo, cetil), lactama, halocetona, aldehído. Las estructuras químicas de diversos compuestos de agente que elige diana-ligador que incluyen un ligador con una 1,3-dicetona como grupo reactivo se muestran en las FIG. 2-5.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que las cadenas laterales de aminoácidos reactivos en los anticuerpos pueden poseer un grupo electrófilo que reacciona con un grupo nucleófilo sobre el agente que elige diana o su ligador, mientras que en otras realizaciones un grupo nucleófilo reactivo en una cadena lateral del aminoácido de un sitio de combinación de un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo reacciona con un grupo electrófilo en un agente que elige diana o ligador. Así, las cadenas laterales de sitios de combinación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden estar sustituidas con un electrófilo (por ejemplo, FIG. 6 y 7) y este grupo puede usarse para reaccionar con un nucleófilo sobre el agente que elige diana o su ligador (por ejemplo, NH₂). En esta realización, el anticuerpo y agente que elige diana tienen cada uno un ligador parcial con restos reactivos apropiados en cada extremo de manera que los dos extremos del ligador parcial puedan formar el ligador completo, creando así el compuesto completo que elige diana.

Un experto en la materia también apreciará fácilmente que dos o más agentes que eligen diana pueden ligarse a un único sitio de combinación de anticuerpos. Los dos agentes que eligen diana pueden ser el mismo o pueden ser diferentes con respecto a su especificidad por una diana particular. En una realización, cada agente que elige diana puede ligarse a una cadena lateral reactiva separada de un aminoácido en el sitio de combinación de anticuerpos. En una realización preferida, los dos agentes que eligen diana están unidos a un ligador ramificado o lineal que luego liga ambos agentes que eligen diana a la misma cadena lateral del aminoácido reactivo en el sitio de combinación de anticuerpos. Cada rama de un ligador ramificado puede comprender en algunas realizaciones un estiramiento lineal de entre 5-100 átomos. A modo de ejemplo, las estructuras desveladas en las FIG. 3-5 muestran realizaciones de ligadores ramificados con dos agentes que eligen diana ligados a una rama diferente del ligador, que tiene una 1,3-dicetona como grupo reactivo. Como se muestra en estas realizaciones, el punto de ramificación puede estar en la cadena de conexión o en el grupo de reconocimiento (si está presente).

“Anticuerpo” como se usa en el presente documento incluye inmunoglobulinas que son el producto de linfocitos B y variantes de los mismos, además de receptor de linfocitos T (TcR) que es el producto de linfocitos T y variantes de los mismos. Una inmunoglobulina es una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por los genes de la región constante kappa y lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu de la inmunoglobulina, además de los genes de la región variable de la inmunoglobulina miriada. Las cadenas ligeras se clasifican bien como kappa o bien como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. También se conocen subclases de la cadena pesada. Por ejemplo, las cadenas pesadas de IgG en seres humanos pueden ser cualesquiera de la subclase IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Se conoce una unidad estructural típica de inmunoglobulina que comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kD) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

Los anticuerpos existen como anticuerpos intactos de longitud completa o como varios fragmentos bien

caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas o productos químicos. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab')_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-CH_1 por un enlace disulfuro. $F(ab')_2$ puede reducirse bajo condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra convirtiendo así el dímero $F(ab')_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un fragmento Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Aunque diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que cualquiera de una variedad de fragmentos de anticuerpos puede sintetizarse *de novo* tanto químicamente como utilizando metodología de ADN recombinante. Así, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos tanto producidos por la modificación de anticuerpos completos como sintetizados *de novo* o anticuerpos y fragmentos obtenidos usando metodologías de ADN recombinante.

El receptor de linfocitos T (TcR) es un heterodímero ligado por disulfuro compuesto de cadenas α o β o, en una minoría de linfocitos T, cadenas γ o δ . Las dos cadenas se unen generalmente por disulfuro justo fuera de la membrana plasmática de linfocitos T en un estiramiento extendido corto de aminoácidos que se parecen a la región bisagra del anticuerpo. Cada cadena de TcR está compuesta por un dominio variable similar a anticuerpo ($V\alpha$ o $V\beta$) y un dominio constante ($C\alpha$ o $C\beta$). El TcR completo tiene una masa molecular de aproximadamente 95 kDa variando las cadenas individuales en tamaño de 35 a 47 kDa. También están englobados dentro del significado de TcR porciones del receptor tales como las regiones variables de este receptor que pueden producirse como una proteína soluble usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.080.840 describe un receptor de linfocitos T soluble (TcR) preparado cortando y empalmado los dominios extracelulares de un TcR con las secuencias de anclaje de la membrana de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de Thy-1. La molécula se expresa en ausencia de CD3 sobre la superficie celular y puede escindirse de la membrana mediante tratamiento con fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC). El TcR soluble también puede prepararse acoplado los dominios variables de TcR con un dominio CH_2 o CH_3 de la cadena pesada del anticuerpo, esencialmente como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.216.132 o como cadenas individuales de TcR soluble como se describe por Schusta y col., Nature Biotech. 18,754-759 (2000) o Holler y col., Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 97:5387-5392 (2000). Los "anticuerpos" para TcR como productos solubles pueden usarse en lugar de anticuerpo para preparar los compuestos de la invención. El sitio de combinación de TcR puede identificarse por referencia a regiones CDR y otros residuos de la región estructural usando los mismos procedimientos tratados anteriormente para los anticuerpos.

Los anticuerpos recombinantes pueden ser anticuerpos de longitud completa convencionales, fragmentos de anticuerpos conocidos de la digestión proteolítica, fragmentos de anticuerpos únicos tales como Fv o Fv monocatenario (scFv), anticuerpos con dominios delecionados. Un anticuerpo Fv tiene aproximadamente 50 Kd de tamaño y comprende las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Un polipéptido de Fv monocatenario ("scFv") es un heterodímero $V_H::V_L$ covalentemente ligado que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias codificantes V_H y V_L tanto unidas directamente como unidas por un ligador que codifica péptido. Véase, Huston y col., (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883. Varias estructuras para convertir las cadenas de polipéptidos ligeras y pesadas naturalmente agregadas, pero químicamente separadas, de una región V de anticuerpo en una molécula de scFv que se plegarán en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión del antígeno. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.091.513, 5.132.405 y 4.956.778.

El sitio de combinación se refiere a la parte de una molécula de anticuerpo que participa en la unión del antígeno. El sitio de unión del antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables ("V") del extremo N de las cadenas pesadas ("H") y ligeras ("L"). Las regiones variables del anticuerpo comprenden tres estiramientos altamente divergentes denominados "regiones hipervariables" o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) que están interpuestas entre los estiramientos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones estructurales" (FR). En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) están dispuestas las unas con respecto a las otras en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión del antígeno o bolsillo. Por tanto, el sitio de combinación de anticuerpos representa los aminoácidos que constituyen las CDR de un anticuerpo y cualquier residuo de la región estructural que constituya el bolsillo del sitio de unión.

La identidad de los residuos de aminoácidos en un anticuerpo particular que constituyen el sitio de combinación puede determinarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, las CDR de anticuerpos pueden identificarse como las regiones hipervariables originalmente definidas por Kabat y col. (véanse "Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat y col., U.S. Department of Health and Human Services; Johnson, G y Wu, TT (2001), Kabat Database and its applications: future directions. Nucleic Acids Research, 29: 205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>). Las posiciones de las CDR también pueden identificarse como las estructuras de bucle estructurales originalmente descritas por Chotia y otros (véase, Chotia y Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901 (1987), Chotia y col., Nature 342, 877 (1989) y Tramontano y col., J. Mol. Biol. 215, 175 (1990)). Otros procedimientos incluyen la "definición de AbM" que es un compromiso entre Kabat y Chotia y se deriva usando el software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM (ahora Accelrys) o la "definición de contacto" de CDR por Macallum y col.,

ES 2 486 269 T3

("Antibody antigen interactions: contact analysis and binding site topography" J Mol Biol. 1996 Oct 11;262(5):732-45).
El siguiente cuadro identifica CDR basadas en diversas definiciones conocidas.

5	Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
	L1	L24 --L34	L24 --L34	L24 --L34	L30 --L36
	L2	L50 --L56	L50 --L56	L50 --L56	L46 --L55
10	L3	L89 --L97	L89 --L97	L89 --L97	L89 --L96
	H1	H31 --H35B	H26 --H35B	H26 --H32..34	H30 --H35B
	(Numeración de Kabat)				
	H1	H31 --H35	H26 --H35	H26 --H32	H30 --H35
15	(Numeración de Chothia)				
	H2	H50 --H65	H50 --H58	H52 --H56	H47 --H58
	H3	H95 --H 102	H95 --H 102	H95 --H102	H93 --H101

Las pautas generales por las que pueden identificarse las CDR en un anticuerpo de la secuencia son las siguientes:

- 20 LCDR1:
- Inicio - Aproximadamente residuo 24.
El residuo de antes es siempre una Cys.
25 El residuo de después es siempre un Trp. Normalmente, TRP va seguido de TYR-GLN, pero también puede ir seguido de LEU-GLN, PHE-GLN o TYR-LEU.
La longitud es 10 a 17 residuos.
- 30 LCDR2:
- Inicio - 16 residuos después del extremo de L1.
La secuencia de antes es generalmente ILE-TYR, pero también puede ser VAL-TYR, ILE-LYS o ILE-PHE.
La longitud es generalmente 7 residuos.
- 35 LCDR3:
- Inicio - generalmente 33 residuos después del extremo de L2.
El residuo de antes es una Cys.
La secuencia de después es PHE-GLY-X-GLY.
40 La longitud es 7 a 11 residuos.
- 45 HCDR1:
- Inicio - en aproximadamente el residuo 26 (cuatro residuos después de una CYS) [definición de Chotia / AbM]. La definición de Kabat empieza 5 residuos después.
La secuencia de antes es CYS-X-X-X.
Los residuos de después es TRP, normalmente seguido de VAL, pero también seguido de ILE o ALA.
La longitud es 10 a 12 residuos bajo la definición de AbM, mientras que la definición de Chotia excluye los 4 últimos residuos.
50 HCDR2:
- Inicio - 15 residuos después del extremo de la definición de Kabat /AbM de CDR-H1.
La secuencia de antes es normalmente LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEC ID N° 1), pero son posibles varias variaciones.
55 La secuencia de después es LYS/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA
La longitud es 16 a 19 residuos bajo la definición de Kabat (la definición de AbM termina 7 residuos antes).
- 60 HCDR3:
- Inicio - 33 residuos después del extremo de CDR-H2 (dos residuos después de una CYS).
La secuencia de antes es CYS-X-X (normalmente CYS-ALA-ARG).
La secuencia de después es TRP-GLY-X-GLY.
65 La longitud es 3 a 25 residuos.

La identidad de los residuos de aminoácidos en un anticuerpo particular que están fuera de las CDR, pero sin embargo forman parte del sitio de combinación por tener una cadena lateral que es parte del revestimiento del sitio de combinación (es decir, está disponible para enlace mediante el sitio de combinación), puede determinarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica tales como modelado y cristalografía de rayos X. Véase, por ejemplo, Riechmann y col., (1988) *Nature*, 332:323-327. El anticuerpo para aldolasa mAb 38C2 de ratón, que tiene una lisina reactiva próxima a, pero fuera de HCDR3, es un ejemplo de un anticuerpo tal.

El residuo reactivo del sitio de combinación de anticuerpos puede asociarse naturalmente al anticuerpo tal como cuando el residuo está codificado por ácido nucleico presente en la célula linfoide identificada primero para preparar el anticuerpo. Alternativamente, el residuo de aminoácido puede producirse mutando intencionadamente de manera que codifique el residuo particular (véase, por ejemplo, el documento WO 01/22922 a Mearns y col.). En otro enfoque, el residuo de aminoácido o sus elementos reactivos (por ejemplo, un grupo amino nucleófilo o grupo sulfhidrilo) puede unirse a un residuo de aminoácido en el sitio de combinación de anticuerpos. Así, el enlace covalente con el anticuerpo que se produce "mediante un residuo de aminoácido en el sitio de combinación del anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa que el enlace puede ser directamente con un residuo de aminoácido de un sitio de combinación de anticuerpos o mediante un resto químico que está ligado a una cadena lateral de un residuo de aminoácido de un sitio de combinación de anticuerpos.

Como se ha tratado, los anticuerpos que pueden usarse en la preparación de los compuestos que eligen anticuerpos como diana de la invención requieren una cadena lateral reactiva en el sitio de combinación de anticuerpos. Una cadena lateral reactiva puede estar presente o ponerse por mutación en cualquier anticuerpo. Los anticuerpos catalíticos son una fuente preferida de tales anticuerpos. Tales anticuerpos incluyen anticuerpos para aldolasa, anticuerpos para beta-lactamasa, anticuerpos para esterasa, anticuerpos para amidasa.

Una lisina reactiva en un sitio de combinación de anticuerpos puede ligarse covalentemente a una cetona, dicetona, beta-lactama, éster activo, halocetona, lactona, anhídrido, maleimida, epóxido, aldehído, amidina, guanidina, iminas, enaminas, fosfatos, fosfonatos, epóxidos, aziridinas, tioepóxidos, dicetonas enmascaradas o protegidas (por ejemplo, cetales), lactamas, halocetonas, aldehídos, asociados a un agente que elige diana o ligador-agente que elige diana. Un anticuerpo tal a modo de ejemplo y preferido es un anticuerpo para aldolasa tal como el anticuerpo monoclonal de ratón mAb 38C2 y otros anticuerpos catalíticos similares, además de versiones adecuadamente humanizadas y quiméricas de tales anticuerpos. El mAb de ratón 38C2 es el prototipo de una nueva clase de anticuerpos catalíticos que se generaron por inmunización reactiva e imitan mecánicamente enzimas aldolasas naturales (Barbas y col., 1997, *Science* 278, 2085-2092). Mediante una lisina reactiva, estos anticuerpos catalizan reacciones de aldol y retro-aldol usando el mecanismo de enamina de aldolasas naturales (Wagner y col., 1995, *Science* 270, 1797-1800; Barbas y col., 1997, *Science* 278, 2085-2092; Zhong y col., 1999, *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 3738-3741; Karlstrom y col., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 973878-3883). Además de su versatilidad y eficacia en la química orgánica sintética (por ejemplo, Hoffmann y col., 1998, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 2768-2779; Sinha y col., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14603-14608), los anticuerpos para aldolasa se han usado para activar profármacos de camptotecina, doxorubicina y etopósido *in vitro* e *in vivo* como una estrategia contra el cáncer (Shabat y col., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6925-6930 y, 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7528-7533).

En otro ejemplo, el aminoácido reactivo de un sitio de combinación de anticuerpos puede ser un residuo de cisteína, serina o tirosina reactiva. Para cisteínas, el anticuerpo resultante puede formar un enlace covalente con componentes que contienen maleimida u otros grupos reactivos de tiol tales como yodoacetamidas, haluros de arilo, disulfhidrilos. Las cisteínas reactivas pueden encontrarse en anticuerpos catalíticos para tioesterasa como se describe por Janda y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91:2532-2536, (1994). Para otros anticuerpos para esterasa véase Wirsching y col., *Science* 270:1775-82 (1995). Los anticuerpos que contienen aminoácidos reactivos pueden prepararse por medios muy conocidos en la técnica que incluyen mutar un residuo del sitio de combinación de anticuerpos para codificar el aminoácido reactivo o derivatizar químicamente una cadena lateral del aminoácido en un sitio de combinación de anticuerpos con un ligador que contiene el grupo reactivo.

Los anticuerpos adecuados para su uso en el presente documento pueden obtenerse por inmunización convencional, inmunización reactiva *in vivo* o por selección reactiva *in vitro*, tal como con expresión en fago. Los anticuerpos pueden producirse en seres humanos o en otras especies de animales. Los anticuerpos de una especie de animal pueden modificarse para reflejar otra especie de animal. Por ejemplo, anticuerpos quiméricos humanos son aquellos en los que al menos una región del anticuerpo es de una inmunoglobulina humana. Se entiende normalmente que un anticuerpo quimérico humano tiene regiones variables de un animal no humano, por ejemplo, un roedor, con las regiones constantes de un ser humano. A diferencia, un anticuerpo humanizado usa CDR del anticuerpo no humano con la mayoría o todas las regiones estructurales variables y todas las regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos quiméricos y humanizados pueden prepararse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica que incluyen enfoques de injerto de CDR (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.843.708; 6.180.370; 5.693.762; 5.585.089; 5.530.101), estrategias de barajado de cadenas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.565.332; Rader y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:8910-8915), estrategias de modelado molecular (patente de EE.UU. nº 5.639.641).

A diferencia de la derivatización química típica de anticuerpos, aquellos derivados de la inmunización reactiva pueden marcarse específicamente en su sitio de unión en una posición definida, facilitando la preparación rápida y controlada de un producto homogéneo. Además, a diferencia de la derivatización química de anticuerpos, aquellos derivados de inmunización reactiva con 1,3-dicetonas son reversibles. Debido a esta reversibilidad, un derivado de dicetona de un compuesto que elige diana unido al mAb 38C2 puede liberarse del anticuerpo mediante competición con el hapteno de unión covalente JW (Wagner y col., 1995, Science 270, 1797-800), o compuestos relacionados. Esto permite neutralizar inmediatamente el conjugado *in vivo* en caso de una reacción adversa. Alternativamente es posible enlace covalente no reversible tal como con anticuerpos para aldolasa y derivados de beta-lactama del compuesto que elige diana. A diferencia de los anticuerpos anti-hapteno típicos, los anticuerpos de unión a dicetona covalente tienen la ventaja de que el enlace covalente que se forma entre la dicetona y el anticuerpo es estable a grandes cambios en pH, tanto extremos de pH 3 bajo o pH 11 alto. Tales desplazamientos del pH no liberan el compuesto que elige diana del anticuerpo. Esto es una ventaja para la elección de tumores como diana ya que los tumores normalmente presentan pH reducido con respecto a tejidos normales. La estabilidad añadida de los anticuerpos de unión covalente ligados covalentemente a su agente que elige diana debe proporcionar ventajas adicionales en términos de formulación, administración y almacenamiento a largo plazo.

Un compuesto que elige diana de la presente invención puede prepararse usando técnicas muy conocidas en la técnica. Normalmente, la síntesis de un agente que elige diana que también es un componente funcional (agente biológico) es la primera etapa. El agente que elige diana (también componente funcional en este caso) se derivatiza luego para el enlace con un componente de conexión (el ligador) que luego se combina con el anticuerpo. Un experto en la materia apreciará fácilmente que las etapas sintéticas específicas usadas dependen de la naturaleza exacta de los tres componentes.

A modo de ejemplo, como primera etapa, los compuestos de agente que elige diana-ligador mostrados como los compuestos 15 y 4 se prepararon como se muestra en los Esquemas 1 (FIG. 10) y 2 (FIG. 11), respectivamente, como versiones derivatizadas de los agentes que eligen integrina como diana mostrados como los compuestos 1 y 2, anteriormente. Los compuestos 15 y 4 se derivatizaron (con respecto a los compuestos 1 y 2) mediante la adición de una porción del ligador (componente de conexión). El Esquema 3 (FIG. 12) muestra etapas sintéticas adicionales por las que un ligador completo con un resto reactivo de dicetona se añadió al agente que elige diana derivatizado el compuesto 15 para obtener los compuestos que eligen diana SCS-873 y SCS-1655.

Los componentes que eligen integrina como diana mostrados como los compuestos 15 y 4 se sintetizaron como se muestra en la FIG. 10 (Esquema 1) y la FIG. 11 (Esquema 2), respectivamente. Un ligador con un resto reactivo de dicetona se añadió a estas moléculas que eligen diana como se muestra en el Esquema 3 (FIG. 12) para formar las moléculas de compuesto que elige diana-ligador SCS-873 y SCS-1655. La síntesis de SCS-873 se logró a partir del compuesto 14 en tres etapas. El compuesto 14 se convirtió en 15 como se muestra en el Esquema 1 y el producto en bruto se hizo reaccionar con un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) del compuesto de diceto 23 en CH₃CN-DMF en presencia de Et₃N. La purificación sobre gel de sílice (CH₂C12-MeOH, 9:1) dio SCS-873 puro.

El compuesto SCS-1655 se sintetizó a partir de 14 en cinco etapas (Esquemas 2 y 3). La desprotección del grupo BOC en el compuesto 14 seguido de reacción con el éster de NHS del ligador bivalente 24 proporcionó el compuesto 25, que luego se desprotegió y se hizo reaccionar con 23 como antes para proporcionar SCS-1655.

La síntesis de las moléculas de componente que elige integrina como diana-ligador SCS-864 y SCS-789 se muestra en el Esquema 4 (FIG. 13). SCS-864 y SCS-789 se sintetizaron cada uno en una etapa a partir del compuesto 4 (FIG. 13, Esquema 4). El enlace del compuesto 4 se logró con el éster de NHS activado apropiado.

Los compuestos de agente que elige diana-ligador, tales como SCS-864, SCS-873 y SCS-1655, en los que el ligador incluye un resto reactivo de dicetona, pueden incubarse con 0,5 equiv. de un anticuerpo para aldolasa tal como mAb 38C2 para producir compuestos que eligen anticuerpos como diana. Ejemplos adicionales se exponen más adelante.

También se proporcionan compuestos de agente que elige diana-ligador para ligar covalentemente con un sitio de combinación de un anticuerpo. El ligador es de longitud suficiente para permitir que el agente que elige diana se una a la molécula diana cuando el agente que elige diana se liga mediante el ligador a un anticuerpo. En algunas realizaciones, el compuesto de agente que elige diana-ligador incluye uno o más agentes que eligen diana específicos para una molécula diana con un ligador de fórmula X - Y - Z. La constitución de los componentes de ligador X, Y y Z es como se ha descrito anteriormente. Si dos o más agentes que eligen diana están incluidos en el compuesto de agente-ligador que elige diana, los diversos agentes que eligen diana pueden unirse directamente al ligador o el ligador puede ramificarse con agentes que eligen diana unidos a las diferentes ramas del ligador.

También se proporciona un compuesto de agente que elige diana-ligador que puede asociarse no covalentemente al sitio de combinación de un anticuerpo. Este compuesto puede usarse conjuntamente con un anticuerpo adecuado para formar un compuesto que elige diana de la invención. Tales compuestos de agente que elige diana-ligador comprenden dos o más agentes que eligen diana covalentemente unidos mediante un ligador a un antígeno reconocido por el anticuerpo. El ligador puede ser lineal o ramificado y debe ser de longitud de suficiente para permitir que el (los) agente(s) que elige(n) diana se una(n) a la molécula diana cuando el (los) agente(s) que elige(n)

diana se liga(n) mediante el ligador al anticuerpo.

En algunas realizaciones, el ligador incluye cualquiera de C, H, N, O, P, S, Si, F, Cl, Br y I, o una sal de los mismos. El ligador también puede incluir un grupo tal como un grupo alquilo, alqueno, alquino, oxoalquilo, oxoalqueno, oxoalquino, aminoalquilo, aminoalqueno, aminoalquino, sulfoalquilo, sulfoalqueno o sulfoalquino, grupo fosfoalquilo, fosfoalqueno, fosfoalquino. El ligador también puede incluir una o más estructuras de anillo. Combinaciones de los grupos y anillos anteriores también pueden estar presentes en los ligadores de los compuestos que eligen diana de la invención. En algunas realizaciones, el ligador tiene un estiramiento lineal de entre 2-200 átomos, aunque en otras realizaciones pueden usarse longitudes de ligador más largas. Uno o más agentes que eligen diana pueden ligarse al ligador y si se usa un ligador ramificado, algunos de los agentes que eligen diana pueden ligarse a diferentes ramas del ligador.

En algunas realizaciones, el agente que elige diana del compuesto de agente que elige diana-ligador es biológicamente activo mientras que en otras realizaciones el compuesto de agente que elige diana-ligador incluye adicionalmente un agente biológico separado que está preferentemente ligado covalentemente al agente que elige diana. En algunas realizaciones, el agente biológico puede ligarse al agente que elige diana o al ligador usando esencialmente los mismos enfoques usados para ligar el agente que elige diana al ligador o usando otros enfoques muy conocidos en la técnica.

El antígeno del ligador puede ser cualquier antígeno que pueda unirse por un anticuerpo disponible. Los antígenos son muy conocidos en la técnica e incluyen un compuesto orgánico, un fármaco, una biomolécula tal como una proteína, péptido, peptidomimético, glicoproteína, proteoglicano, lípido, glicolípido, ácido nucleico, hidratos de carbono, además de combinaciones de estas moléculas.

La presente divulgación también incluye procedimientos de modificación del sitio de combinación de un anticuerpo para generar especificidad de unión por una molécula diana particular. Tales procedimientos incluyen ligar covalentemente una cadena lateral del aminoácido reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo a un resto químico sobre un ligador de un compuesto de agente que elige diana-ligador en el que el agente que elige diana es específico para la molécula diana. El resto químico del ligador está suficientemente separado del agente que elige diana de manera que el agente que elige diana pueda unirse a la molécula diana cuando el compuesto de agente que elige diana-ligador esté ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos. Normalmente, el anticuerpo no se considerará específico para la molécula diana. En una realización preferida de la divulgación, el anticuerpo antes del enlace covalente tendría una afinidad por la molécula diana inferior a aproximadamente 1×10^{-5} moles/litro. Sin embargo, después de ligarse el anticuerpo covalentemente al compuesto de agente-ligador que elige diana, el anticuerpo modificado tiene preferentemente una afinidad por la molécula diana de al menos aproximadamente 1×10^{-6} moles/litro, más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-7} moles/litro, incluso más preferentemente al menos 1×10^{-8} moles/litro, todavía incluso más preferentemente al menos 1×10^{-9} moles/litro, lo más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-10} moles/litro.

La presente divulgación también incluye procedimientos de alteración de al menos una característica física o biológica de un agente que elige diana, agente biológico o ligador. Los procedimientos incluyen ligar covalentemente el agente que elige diana o agente biológico al sitio de combinación de un anticuerpo como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones de la divulgación, el agente que elige diana o agente biológico está ligado al sitio de combinación de anticuerpos mediante un ligador, cuyas características se describen anteriormente. El procedimiento es particularmente útil para ligar agentes que eligen diana o biológicos pequeños de 5 Kd o menos. Sin embargo, el procedimiento también funciona para aquellas moléculas mayores. Las características del agente que elige diana o agente biológico pueden incluir afinidad de unión, susceptibilidad a la degradación, tal como por proteasas, farmacocinética, farmacodinámica, inmunogenicidad, solubilidad, lipofilia, hidrofilia, hidrofobia, estabilidad (más o menos estable, además de degradación planeada), rigidez, flexibilidad, modulación de la unión del anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, la farmacocinética se refiere a la concentración de un compuesto administrado en el suero con el tiempo. La farmacodinámica se refiere a la concentración de un compuesto administrado en tejidos diana y no diana con el tiempo y los efectos sobre el tejido diana (eficacia) y el tejido no diana (toxicidad). Pueden diseñarse mejoras en, por ejemplo, la farmacocinética o farmacodinámica para un agente que elige diana o agente biológico particular tal como usando enlaces lábiles o modificando la naturaleza química de cualquier ligador (cambiando la solubilidad, carga, etc.).

La característica biológica de un compuesto que elige anticuerpos como diana de la invención puede modificarse para obtener características farmacéuticas mejoradas u otras características. Esto puede lograrse alterando una o más características químicas del agente que elige diana o agente biológico, el ligador o el anticuerpo. Un enfoque preferido es modificar químicamente una o más características químicas del ligador. Alterando las características químicas del compuesto que incluye el ligador pueden obtenerse distintivos mejorados tales como mejora en la farmacocinética, farmacodinámica, solubilidad, inmunogenicidad.

Los compuestos que eligen diana de la presente invención tienen muchos usos. Por ejemplo, la porción de

anticuerpo de un compuesto que elige diana puede prolongar generalmente la semivida de un agente que elige diana de tamaño más pequeño *in vivo*. Por tanto, la potencia biológica de un agente que elige diana particular puede aumentarse mediante la adición de función (funciones) efectora(s) proporcionada(s) por la porción de anticuerpo del compuesto que elige diana (por ejemplo, funciones efectoras mediadas por el complemento). Además, el agente que elige diana, mediante su elevado tamaño conferido por el enlace al anticuerpo, puede permitir que el agente que elige diana funcione de inhibidor competitivo en situaciones en las que de otro modo dejaría de funcionar. Así, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de aumento de la semivida circulante eficaz de un agente que elige diana. El procedimiento incluye ligar el agente que elige diana con un anticuerpo usando un grupo de enlace como se ha expuesto anteriormente. En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de redirigir un anticuerpo a una diana específica. El procedimiento incluye ligar un anticuerpo a un agente que elige diana mediante un ligador como se ha expuesto anteriormente.

La divulgación también proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección en un individuo en el que dicha enfermedad o afección implica células, tejido o fluido que expresa una molécula diana. El procedimiento incluye administrar a un sujeto tal como un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que elige diana de la invención. El sujeto puede ser un animal tal como un mamífero. En algunas realizaciones de la divulgación, el sujeto es un ser humano. El compuesto puede incluir un agente biológico que es el mismo o distinto del agente que elige diana y que puede tomar cualquiera de las formas o actividades descritas en el presente documento. En algunas realizaciones preferidas de la divulgación, la molécula diana es una integrina y la enfermedad es un carcinoma. La asociación de expresión de integrinas en carcinomas es muy conocida en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos nº 5.753.230 y 5.766.591). Para uso terapéutico en seres humanos, un anticuerpo humano, humanizado o quimérico humano es uno preferido como componente de anticuerpo del compuesto que elige diana. Un anticuerpo con una región constante de IgG4 humana también se prefiere si se desea actividad agonista.

Además de las aplicaciones terapéuticas, los compuestos que eligen anticuerpos como diana de la invención también pueden usarse para la obtención de imágenes de células tales como células tumorales o tejidos (por ejemplo, una biomolécula de la matriz extracelular) como es muy conocido en la técnica. Por consiguiente, se proporciona un procedimiento de obtención de imágenes de células o tejido (por ejemplo, una biomolécula de la matriz extracelular) en un individuo. En tales procedimientos, las células o tejido expresan una molécula diana. El procedimiento incluye administrar a un sujeto un compuesto que elige anticuerpos como diana de la invención ligado a una marca detectable. Una marca detectable para su uso en tales procedimientos puede ser un radioisótopo o puede ser un no radioisótopo tal como puede usarse en resonancia magnética nuclear (RMN). En el último caso, el agente que elige anticuerpos como diana puede ligarse a quelatos, por ejemplo, dietilentriaminapentaacetato (DTPA) del metal paramagnético gadolinio esencialmente como se ha descrito en Simkins y col., *Nat. Med.*, 4(5):623-6 (1998).

Se estudió la unión de una mezcla de SCS-873 y 38C2 a células SLK de sarcoma de Karposi humano. SCS-873 medió eficazmente en la unión de la superficie celular de 38C2. La no unión de 38C2 fue detectable en ausencia de SCS-873. Los experimentos de control confirmaron que se requiere el resto de 1,3-dicetona para la unión de SCS-873 a 38C2. Después de las inyecciones i.p. y i.v. independientes, respectivamente, SCS-873 y 38C2 forman un conjugado que elige integrina $\alpha_v\beta_3$ como diana *in vivo*. En estos experimentos, la semivida circulatoria de SCS-873 se prolongó más de dos órdenes de magnitud mediante la unión a 38C2. La combinación de SCS-873 y 38C2 inhibió eficazmente el crecimiento tumoral en un modelo de ratón de sarcoma de Karposi humano, mientras que tanto SCS-873 como 38C2 solos fueron menos eficaces o en absoluto fueron eficaces.

La presente divulgación también proporciona procedimientos de elegir como diana una actividad biológica para células, tejido (por ejemplo, una biomolécula de la matriz extracelular) o una biomolécula en el fluido de un sujeto. El procedimiento incluye administrar al sujeto un compuesto que elige diana que incluye un agente que elige diana específico para las células, biomolécula de la matriz extracelular de tejido o biomolécula de fluido. El agente que elige diana está ligado covalentemente a un residuo de aminoácido en el sitio de combinación de un anticuerpo. En algunas realizaciones de la divulgación se usa un ligador para ligar el agente que elige diana con el anticuerpo. El agente que elige diana no es un anticuerpo. En algunas realizaciones de la divulgación, el compuesto tiene una actividad biológica mientras que en otras realizaciones de la divulgación una molécula biológicamente activa que no es el agente que elige diana se incluye como componente del compuesto. Alternativamente, las partes del componente del compuesto que elige diana pueden administrarse por separado y luego formar el compuesto covalente *in vivo*. En un procedimiento tal, el agente que elige diana puede incluir un ligador/resto reactivo o el sitio de combinación de anticuerpos puede modificarse adecuadamente para ligarse covalentemente con el agente que elige diana.

Un compuesto que elige diana de la presente invención puede administrarse como un producto farmacéutico o medicamento que incluye un compuesto que elige diana de la invención formulado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, los compuestos pueden usarse en la fabricación de un medicamento o composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse como disoluciones o polvos liofilizados para administración parenteral. Los polvos pueden reconstituirse mediante la adición de un diluyente adecuado u otro vehículo farmacéuticamente aceptable antes de uso. Las formulaciones

líquidas pueden ser disoluciones acuosas isotónicas tamponadas. También pueden pulverizarse polvos en forma seca. Ejemplos de diluyentes adecuados son solución salina isotónica normal, 5 % de dextrosa en agua estándar o disolución de acetato de sodio o amonio tamponada. Tales formulaciones son especialmente adecuadas para administración parenteral, pero también pueden usarse para administración por vía oral o contenerse en un inhalador de dosis medida o nebulizador para insuflación. Puede desearse añadir excipientes tales como polivinilpirrolidona, gelatina, hidroxixelulosa, goma arábiga, polietilenglicol, manitol, cloruro sódico, citrato de sodio.

Alternativamente, los compuestos pueden encapsularse, comprimirse o prepararse en una emulsión o jarabe para administración por vía oral. Pueden añadirse vehículos sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para potenciar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio dihidratado, alabastro, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, goma arábiga, agar o gelatina. Vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, solución salina y agua. El vehículo también puede incluir un material de liberación sostenida tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera. La cantidad de vehículo sólido varía pero, preferentemente, estará entre aproximadamente 20 mg y aproximadamente 1 g por unidad de dosificación. Las preparaciones farmacéuticas se preparan siguiendo las técnicas convencionales de la farmacia que implican moler, mezclar, granular y comprimir, cuando sea necesario, para formas de comprimido; o moler, mezclar y envasar para formas de cápsula de gelatina dura. Si se usa un vehículo líquido, la preparación puede estar en forma de un jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Para administración rectal, los compuestos de la invención pueden combinarse con excipientes tales como manteca de cacao, glicerina, gelatina o polietilenglicoles y moldearse en un supositorio.

Los compuestos de la invención pueden formularse para incluir otros fármacos o agentes biológicos médicamente útiles. Los compuestos también pueden administrarse conjuntamente con la administración de otros fármacos o agentes biológicos útiles para la enfermedad o afección a la que están dirigidos los compuestos de la invención.

Como se emplea en el presente documento, el término "una cantidad eficaz" se refiere a una dosis suficiente para proporcionar concentraciones suficientemente altas para conferir un efecto beneficioso al receptor de la misma. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que está tratándose, la gravedad del trastorno, la actividad del compuesto específico, la vía de administración, la tasa de eliminación del compuesto, la duración del tratamiento, los fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto, la edad, peso corporal, sexo, dieta y salud general del sujeto, y factores similares muy conocidos en las artes y ciencias médicas. Diversas consideraciones generales tenidas en cuenta en la determinación de la "cantidad terapéuticamente eficaz" son conocidas para aquellos expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Gilman y col., eds., Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª ed., Pergamon Press, 1990; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990. Los niveles de dosificación normalmente se encuentran en el intervalo de aproximadamente 0,001 hasta 100 mg/kg/día; siendo generalmente aplicables niveles en el intervalo de aproximadamente 0,05 hasta 10 mg/kg/día. Un compuesto puede administrarse parenteralmente, tal como intravascularmente, intravenosamente, intraarterialmente, intramuscularmente, subcutáneamente. La administración también puede ser por vía oral, nasalmente, rectalmente, transdérmicamente o por inhalación mediante un aerosol. La composición puede administrarse como un bolo, o infundirse lentamente.

La administración de un conjugado de anticuerpo-agente que elige diana a un individuo inmunocompetente puede producir la producción de anticuerpos contra el conjugado. Tales anticuerpos pueden dirigirse al propio anticuerpo, tal como la región variable que incluye el idiotipo del anticuerpo, además de al agente que elige diana o cualquier ligador usado para conjugar el agente que elige diana con el anticuerpo. La reducción de la inmunogenicidad del conjugado de anticuerpo-agente que elige diana puede tratarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica tales como uniendo espaciadores basados en polietilenglicol (PEG) de cadena larga al anticuerpo-agente que elige diana. El PEG de cadena larga y otros polímeros son conocidos por su capacidad para enmascarar epítopes extraños, produciendo la reducida inmunogenicidad de proteínas terapéuticas que muestran epítopes extraños (Katre y col., 1990, J. Immunol. 144, 209-213; Francis y col., 1998, Int. J. Hematol. 68, 1-18). Como se ha citado, el PEG también puede ser un ligador, proporcionando así tanto función de ligador como inmunogenicidad reducida en un compuesto que elige diana de la invención. Alternativamente, o además, al individuo que se le administra el conjugado de anticuerpo-agente que elige diana puede administrársele un inmunosupresor tal como ciclosporina A, anticuerpo anti-CD3.

Adicionalmente se proporciona un procedimiento de selección de una biblioteca química para agonistas o antagonistas de un receptor. El procedimiento incluye ligar miembros individuales de la biblioteca química al sitio de combinación de un anticuerpo y luego probar la biblioteca ligada al anticuerpo para unirse al receptor o para la inhibición de la unión entre el receptor y un ligando para el receptor. Por este enfoque, los presentes compuestos que eligen anticuerpos como diana proporcionan un nuevo formato para la selección de alto rendimiento para identificar productos químicos de molécula pequeña candidatos tales como fármacos, péptidos, peptidomiméticos, compuestos orgánicos, que sirven, por ejemplo, como antagonistas o agonistas. El pequeño tamaño relativo de una molécula química candidata útil normalmente requiere selección indirecta tal como en formatos de desplazamiento o competición. Como se proporciona en el presente documento, la biblioteca química puede formarse en un formato

de anticuerpos ligando fármacos individuales en la biblioteca a un sitio de combinación de un anticuerpo.

5 Pueden prepararse bibliotecas marcadas con sitios de combinación de anticuerpos sintetizando candidatos químicos con un ligador adecuado que comprende un resto de ligador particular diseñado para la interacción covalente con un anticuerpo particular. Tales ligadores pueden incluir un resto de dicetona que va a usarse conjuntamente con un anticuerpo para aldolasa que incluye una lisina reactiva en el sitio de combinación. Un experto en la materia entendería fácilmente que otros ligadores y restos de ligador (por ejemplo, biotina) que se han descrito en el presente documento son claramente útiles para este fin.

10 Las bibliotecas químicas marcadas con sitios de combinación de anticuerpos así preparadas pueden usarse, por ejemplo, en ensayos de receptor o bioensayos de células en los que la unión de cada compuesto en la biblioteca puede monitorizarse detectando el anticuerpo ligado. La detección de la porción de anticuerpo de cada compuesto puede llevarse a cabo mediante procedimientos de detección de anticuerpos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a un resto detectable tal como una enzima, fluoróforo, radioisótopo. También pueden usarse sistemas indirectos tales como biotina-estreptavidina. Las bibliotecas pueden cribarse sobre células o antígenos impuros tales como lisados virales, además de sobre antígenos purificados. Por ejemplo, las bibliotecas pueden probarse para la unión o inhibición de la unión usando como diana lisados ejecutados sobre geles de proteína, basándose el análisis en una banda de gel particular. En el caso en el que el receptor se exprese sobre una célula, la unión o inhibición de la unión puede determinarse detectando los eventos de señalización celular que se producen (o que no se producen como en el caso de la inhibición) en la dirección 3' de dicha unión o inhibición de la unión. La señalización celular en la dirección 3' puede detectarse con la ayuda de un gen indicador como es muy conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.618.720 y 5.670.113).

25 La selección de bibliotecas químicas marcadas con anticuerpo puede adaptarse fácilmente para su uso con instrumentos de alto rendimiento. La selección puede hacerse *in vitro* o *in vivo*. Además, una biblioteca de muestras biológicas tal como una biblioteca de fagos de péptido puede usarse para preparar una biblioteca marcada con sitios de combinación de anticuerpos. En tales casos, el sitio de unión del resto de ligador (por ejemplo, dicetona) puede ser el punto de fusión de la biblioteca al vehículo biológico.

30 También se proporciona un procedimiento de inmunoensayo para determinar la cantidad de analito en una muestra. Tales procedimientos incluyen:

- (a) formar, en un medio que contiene una muestra, un complejo entre el analito y al menos un anticuerpo específico para el analito;
- 35 (b) analizar el medio para detectar la cantidad del complejo; y
- (c) relacionar la cantidad de complejo con la cantidad de analito en la muestra. Tales procedimientos también pueden incluir formar el complejo con al menos un anticuerpo que es específico para el analito. La especificidad del anticuerpo se proporciona por un agente que elige no anticuerpo como diana específico para el analito que está ligado covalentemente a un aminoácido reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo. Así, los compuestos que eligen anticuerpos como diana de la invención pueden usarse en inmunoensayos para detectar y medir la cantidad de un analito en una muestra como se ha hecho previamente con anticuerpos policlonales o monoclonales convencionalmente preparados. Tales ensayos son muy conocidos en la técnica e incluyen RIA, EIA, Western, ELISA. Los formatos de ensayo pueden ser competitivos o no competitivos y puede ser directos o indirectos. El compuesto que elige anticuerpos como diana puede usarse en la fase líquida y/o puede unirse con un vehículo de fase sólida. Los vehículos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, celulosa natural y modificada, poliacrilamida, agarosa, magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser tanto soluble como insoluble. El compuesto que elige anticuerpos como diana puede marcarse detectablemente en cualquiera de las diversas formas muy conocidas en la técnica. Las patentes de EE.UU. nº 4.659.678; 4.780.423; y 4.298.685
- 50 son a modo de ejemplo de tales ensayos.

Visto en términos generales, la cantidad de un analito en una muestra puede determinarse formando, en un medio que contiene la muestra, un complejo entre el analito y al menos un anticuerpo específico para el analito. El medio se analiza entonces para determinar la cantidad del complejo que se forma. Finalmente, la cantidad de complejo formado está entonces relacionada con la cantidad de analito en la muestra. Como ya se ha descrito, este enfoque general puede tomar muchas formas tales como directo y indirecto, homogéneo o heterogéneo, y competitivo y no competitivo. En todos los casos, los compuestos que eligen anticuerpos como diana de la invención pueden usarse para sustituir funciones proporcionadas por anticuerpos convencionalmente preparados.

60 También se proporciona un ensayo de unión directa o indirecta en el que la presencia de un analito se determina usando un anticuerpo específico para el analito. En tales procedimientos, la presencia del analito se determina usando un anticuerpo específico para el analito. La especificidad del anticuerpo resulta de un agente que elige no anticuerpo como diana que es específico para el analito, y el agente que elige diana está ligado covalentemente a un aminoácido reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo. Así, los compuestos que eligen anticuerpos como diana de la invención pueden usarse en ensayos cualitativos en lugar de anticuerpos convencionalmente preparados.

Sería fácilmente evidente que los compuestos de la invención se usen no solo en terapia médica humana y diagnóstico, sino también en veterinaria, agricultura, medioambiente y otras disciplinas.

5 También se proporcionan procedimientos de inhibición o reducción de la capacidad de un agente que elige diana o agente biológico para cruzar una membrana celular. En estos procedimientos, un compuesto que elige anticuerpos como diana se forma ligando covalentemente el sitio de combinación de un anticuerpo que por sí mismo no cruza la membrana celular al agente que elige diana o agente biológico, en los que enlace de dicho anticuerpo con dicho agente que elige diana o agente biológico reduce o inhibe la capacidad del agente para cruzar la membrana celular.
10 Los anticuerpos que no se dirigen a receptores que internalizan la superficie celular son una fuente preferida de anticuerpos que no cruzan membranas celulares.

Adicionalmente se proporcionan procedimientos de mediación en la administración intracelular de un fármaco intracelularmente activo. En estos procedimientos se prepara un compuesto que elige anticuerpos como diana en el que dicho compuesto incluye uno o más agentes que eligen diana o uno o más agentes biológicos o ambos covalentemente ligados mediante un ligador al sitio de combinación del anticuerpo. Los agentes que eligen diana o agentes biológicos se caracterizan porque se unen con un receptor de célula y median en la internalización del agente. El compuesto que elige anticuerpos como diana también incluye un fármaco que es intracelularmente activo. La administración de fármaco intracelular se produce cuando una célula que expresa el receptor se pone en contacto con el compuesto que elige anticuerpos como diana. La puesta en contacto produce la internalización del agente que elige anticuerpos como diana y la administración de dicho fármaco intracelularmente.
15
20

Este enfoque se aprovecha de la endocitosis mediada por receptor (es decir, internalización mediada por receptor) para administrar el compuesto que elige anticuerpos como diana intracelularmente. Los receptores de la superficie celular que median en la internalización de los ligandos de unión son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, integrinas, HER2, receptor de EGF, receptor de ácido fólico. Los ensayos de internalización están fácilmente disponibles y pueden evaluarse usando procedimientos de detección fluorescente.
25

En algunas realizaciones, el fármaco intracelularmente activo es un profármaco que se vuelve activo cuando dicho fármaco se pone en contacto con un compartimento intracelular. El compuesto que elige anticuerpos como diana puede incluir una señal de tráfico intracelular para dirigir el compuesto que elige anticuerpos como diana internalizado a un compartimento intracelular particular. Muchas proteínas contienen una o más secuencias que eligen diana que sirven de señal de tráfico o dirección para dirigir la proteína al sitio intracelular correcto. Los receptores en el destino también pueden participar en el procedimiento de tráfico.
30
35

Las secuencias que dirigen las proteínas y otros compuestos a diferentes sitios intracelulares tales como retículo endoplásmico, endosoma, golgi o núcleo son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, las señales de tráfico del retículo endoplásmico incluyen una secuencia de KDEL o KKXX, las señales de tráfico de golgi incluyen un dominio GRIP (véase, Munro y col., Curr Biol 9: 377-379, 1999), las señales de tráfico lisosómicas (de golgi) incluyen oligosacáridos modificados con manosa-6-fosfato y las señales de tráfico de localización nuclear que incluyen una o dos secuencias cortas positivamente cargadas, por ejemplo, ricas en lisina o arginina (véase, Penco y col., Biotech Appl Biochem 34:151-1592001).
40

La versatilidad de la invención se ilustra por los siguientes ejemplos que ilustran realizaciones preferidas de la invención y no son limitantes de las reivindicaciones o memoria descriptiva de ningún modo.
45

EJEMPLO 1: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende un agente de peptidomimético RGD que elige diana ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa 38C2.

50 Se formó un compuesto que elige integrina como diana basándose en la formación de un enlace covalente reversible entre un ligador de dicetona derivado de un peptidomimético RGD y la lisina reactiva del mAb de ratón 38C2. El mAb de ratón 38C2 es el prototipo de una nueva clase de anticuerpos catalíticos generados por inmunización reactiva e imitan mecánicamente a las enzimas aldolasas naturales (Barbas y col., Science 278, 2085-2092, 1997). Mediante una lisina reactiva, estos anticuerpos catalizan reacciones de aldol y retro-aldol usando el mecanismo de enamina de aldolasas naturales (Wagner y col., Science 270, 1797-1800, 1995; Barbas y col., Science 278, 2085-2092, 1997; Zhong y col., Angew. Chem. Int. Ed. 38, 3738-3741, 1999). Además de su versatilidad y eficacia en la química orgánica sintética, los anticuerpos para aldolasa se han usado en la activación de profármacos de camptotecina, doxorubicina y etopósido *in vitro* e *in vivo* como una estrategia contra el cáncer (Shabat y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 6925-6930, 1999; Shabat, D. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 7528-7533, 2001). Otra característica más de estos anticuerpos, concretamente su capacidad para unirse a dicetonas covalentemente, sigue estando sin explorar.
55
60

El peptidomimético RGD usado (véase el compuesto 1) es específico para integrina humana con una alta afinidad de unión para $\alpha_v\beta_3$ a 0,9 nM y $\alpha_v\beta_5$ a 0,6 nM (especificidad presentada por unión de $\alpha_{IIb}\beta_3$ mínima) (Miller y col., arriba). Se preparó una versión modificada de ligador de dicetona del compuesto 1, designada SCS-873, como se ha descrito anteriormente.
65

Se desea un antagonista del peptidomimético RGD con actividad conocida por tanto la unión de $\alpha_v\beta_3$ como $\alpha_v\beta_5$ debido a que algunos de estos compuestos se unen tanto a integrinas murinas como humanas. Tal reactividad cruzada de las especies proporciona estudios preclínicos *in vivo* en modelos de angiogénesis animal antes de ensayos humanos. Además, el compuesto que elige diana puede usarse para la terapia de sarcoma de Kaposi que está asociado con la integrina $\alpha_v\beta_3$.

SCS-873 se ligó al anticuerpo 38C2 por el siguiente procedimiento: un mililitro de anticuerpo 38C2 en solución salina tamponada con fosfato (10 mg/ml) se añadió a 12 microlitros de una disolución madre de 10 mg/ml de SCS-873 y la mezcla resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas antes de uso.

Se evaluó la unión de una mezcla de SCS-873 y 38C2 a células SLK. SCS-873 medió eficazmente en la unión de la superficie celular de 38C2. No fue detectable la unión de 38C2 en ausencia de SCS-873. Los experimentos de control confirmaron que el resto de dicetona del ligador se requiere para la unión de SCS-873 a 38C2. Se determinó que SCS-873 retiene la especificidad de integrina del componente de integrina que elige diana, es decir, no se detectó unión a $\alpha_{IIb}\beta_3$ en ELISA mientras que la unión a $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_3$ se encontró que era fuerte. Inyecciones i.p. e i.v. independientes del compuesto que elige diana preparadas con SCS-873 y 38C2 frente a cada componente solo en ratones demostraron la elección de integrina como diana *in vivo*. En estos experimentos, la semivida en suero de SCS-873 se prolongó más de dos órdenes de magnitud mediante la unión a 38C2. SCS-873 libre no unido al anticuerpo tuvo una semivida en suero de solo minutos mientras que la combinación de anticuerpo y molécula pequeña pudo detectarse en el suero muestreado de sangrados del ojo de varios días.

EJEMPLO 2: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende IL-4 como agente que elige diana ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa

Células tumorales de sarcoma de Kaposi, entre otras células tumorales epiteliales humanas, expresan receptores de interleucina-4 (IL-4) que pueden ser elegidos como diana con una proteína quimérica recombinante que consiste en IL-4 y una forma truncada de toxina bacteriana llamada exotoxina de *Pseudomonas* (Husain y col., 1999, Nat. Med. 5, 817-822). Basándose en estos estudios se prepara un compuesto que elige IL-4 como diana para elegir como diana el mAAb 38C2 para células tumorales de sarcoma de Kaposi. Un ligador con un grupo reactivo de dicetona se conjuga con una cadena lateral de lisina de IL-2 usando un resto reactivo de lisina tal como N-hidroxisuccinimida (NHS). Alternativamente, una IL-4 recombinante con una cisteína libre añadida se usa para conjugación con restos reactivos de cisteína tales como maleimida. Para reducir la inmunogenicidad asociada a la porción de ligador del compuesto que elige diana, el separador (es decir, la cadena de conexión del ligador) entre el grupo reactivo de dicetona en un extremo y el grupo NHS o maleimida en el otro es una cadena de polietilenglicol (PEG). El PEG de cadena larga y otros polímeros son conocidos por su capacidad para enmascarar epítopes extraños, produciendo la reducida inmunogenicidad de proteínas terapéuticas que muestran epítopes extraños (Katre y col., 1990, J. Immunol. 144, 209-213; Francis y col., 1998, Int. J. Hematol. 68, 1-18). No deben conjugarse más de una a dos dicetonas con la IL-4 con el fin de evitar la eliminación de anticuerpos reticulados (Rehlaender y Cho, 1998, Pharm. Res. 15, 1652-1656). Otras interleucinas tales como IL-2 pueden usarse en lugar de IL-4 como agente que elige diana. Aunque la IL-4 puede usarse principalmente como módulo que elige diana, una potenciación de su efecto farmacológico (Lussow y col., 1996, Transplantation 62, 1703-1708) puede resultar del desencadenamiento del receptor de IL-2 debido a la prolongada semivida en suero de la interleucina obtenida mediante su enlace con un anticuerpo.

EJEMPLO 3: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende péptido de unión a VEGF-R2 como agente que elige diana ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa 38C2.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un modulador clave de la angiogénesis tumoral. Inducida por hipoxia, la expresión de VEGF se regula por incremento mediante la inducción de la transcripción de ARNm de VEGF en el tumor. Tras la producción y liberación por el tumor, el VEGF difunde a las células endoteliales de vasos sanguíneos preexistentes cercanos, que muestran receptores de VEGF (VEGFR). VEGF se une a dos receptores de tirosina cinasa, VEGFR-1 y VEGFR-2, que se expresan predominantemente en células endoteliales. La activación de células endoteliales está asociada con la unión de VEGF a VEGFR-2, mientras que VEGFR-1 probablemente sirve de receptor de señuelo que regula la concentración local de VEGF (Neufeld y col., 1999, FASEB J. 13, 9-22). Tras la activación, las células endoteliales proliferan, migran direccionalmente hacia el tumor y eventualmente se enrollan y conectan entre sí para formar nuevos vasos sanguíneos. Los fármacos antiangiogénicos que interfieren con la interacción de VEGF y VEGFR-2 son candidatos prometedores para la terapia contra el cáncer (Klohs y Hamby, 1999, Curr. Opin. Biotechnol. 10, 544-549). Binétruy-Tournaire y col. (2000, EMBO J. 19, 1525-1533) identificaron el péptido lineal de unión a VEGFR-2 ATWLPPR (SEC ID N°: 2) mediante la expresión en fago de bibliotecas de péptidos. ATWLPPR (SEC ID N°: 2) interfirió eficazmente con la unión de VEGF a VEGFR-2 e inhibió la angiogénesis mediada por VEGF.

Se prepara un compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende péptido de unión a VEGF-R2 sintetizando el péptido con un residuo Cys adicional en el extremo amino o carboxi, produciendo un péptido con la secuencia ATWLPPRC (SEC ID N°: 3) y CATWLPPR (SEC ID N°: 4), respectivamente. Estos péptidos modificados

con tiol se hacen reaccionar con un ligador de maleimida/dicetona (FIG. 14) para producir péptido-ligador-diceto y diceto-ligador-péptido. La incubación de estos derivados de dicetona con el mAb 38C2 produce un enlace covalente entre el péptido de VEGFR-2 y el sitio de combinación de anticuerpos. El anticuerpo - compuesto que elige VEGFR-2 como diana resultante se usa para elegir como diana células endoteliales que expresan VEGFR-2 tal como en angiogénesis tumoral. El compuesto prolonga la semivida del péptido y lo dota de función efectora de anticuerpo.

EJEMPLO 4: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende neutralizar aptámero de ARN como agente que elige diana ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa 38C2.

Usando el procedimiento de SELEX (Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) se han generado aptámeros de ARN y ADN con una variedad de dianas moleculares (Jayasena, 1999, Clin. Chem. 45, 1628-1650). Por ejemplo, se describieron aptámeros de ARN de 2'-fluoropirimidina que incluyen aproximadamente 25 nucleótidos y que se unen a VEGF con una afinidad en el intervalo de 100 pM (Ruckman y col., 1999, J. Biol. Chem. 32, 20556-20567). Como el péptido descrito en el ejemplo previo, se encontró que los aptámeros interferían con la interacción de VEGF y VEGFR-2.

Se prepara un compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende aptámero de ARN de VEGF usando nucleótidos derivatizados con tiol comercialmente disponibles tales como 5'-fosforotioato. Un grupo fosforotioato es un grupo fosfato modificado con uno de los átomos de oxígeno sustituidos con un átomo de azufre. El nucleótido modificado con tiol dentro del aptámero de ARN se hace reaccionar con una dicetona de maleimida (por ejemplo, FIG. 14) para producir un compuesto de ligador de dicetona que elige aptámero de ARN como diana. Alternativamente, un grupo amino primario se introduce en el aptámero de ARN usando modificadores de amino comercialmente disponibles. Un nucleótido marcado con un grupo amino primario dentro del aptámero de ARN se hace reaccionar con un ligador que tiene dicetona de N-hidroxisuccinimida como grupo reactivo. La incubación de los derivados de dicetona con el mAb 38C2 produce un enlace covalente entre el aptámero de ARN y el sitio de combinación de anticuerpos. El anticuerpo - compuesto que elige VEGFR-2 de aptámero de ARN como diana resultante se usa para elegir como diana células endoteliales que expresan VEGFR-2 tal como en la angiogénesis tumoral. El compuesto prolonga la semivida del aptámero de ARN y lo dota de función efectora de anticuerpo.

EJEMPLO 5: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende folato como agente que elige diana ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa 38C2.

El receptor de folato media en la captación de ácido fólico en células por endocitosis. Se expresa en exceso en una variedad de células tumorales epiteliales (Leamon y Low, 2001, Drug Discov. Today 6, 44-51). Por ejemplo, más del 90 % de los carcinomas de ovario expresan el receptor de folato (Sudimack y Lee, 2000, Adv. Drug Deliv. Rev. 41, 147-162). Los mAb dirigidos al receptor de folato, por ejemplo Mov18 y Mov19, se han evaluado como fármacos para terapia del cáncer de ovario (Coney y col., 1994, Cancer Res. 54, 2448-2455; Molthoff y col., 1997, Cancer 80, 2712-2720). La elección de diana mediada por folato de células cancerosas que expresan en exceso el receptor de folato es una estrategia alternativa (Leamon y Low, 2001, Drug Discov. Today 6, 44-51). Por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos tales como maitansinoides (Ladino y col., 1997, Int. J. Cancer 73, 859-864) se conjugan con folato para quimioterapia selectiva.

Un compuesto de agente que elige diana-ligador que comprende folato derivatizado con una dicetona mostrada en la FIG. 2E se liga al mAb 38C2 y se usa para elegir como diana células de cáncer de ovario. Debido a que la mayoría de las células de tumor de ovario también expresan las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y/o $\alpha_v\beta_5$, además del receptor de folato, un compuesto que elige diana dual puede usarse para el tratamiento. Un compuesto de agente que elige diana-ligador que comprende folato y un antagonista de peptidomimético RGD se derivatizan juntos con un único ligador de dicetona para formar el compuesto que elige diana dual mostrado en la FIG. 4B. El agente que elige diana-ligador está ligado a mAb 38C2 y se usa para elegir como diana células de cáncer de ovario.

EJEMPLO 6: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende un inhibidor de fosfatasa ácida prostática o antígeno específico de la próstata como agente que elige diana ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa 38C2.

La fosfatasa ácida prostática (PAP) y el antígeno específico de la próstata (PSA), una serina proteasa, se expresan sobre la superficie celular de células de tumor de próstata y se usan como marcadores para cáncer de próstata. Los mAb dirigidos a PAP y PSA se han considerado desde hace tiempo fármacos prometedores para la terapia del cáncer de próstata (Chang y col., 1999, Curr. Opin. Urol. 9, 391-395). Más recientemente, se ha informado de moléculas sintéticas pequeñas que son inhibidores específicos de PAP (Beers y col., 1996, Bioorg. Med. Chem. 4, 1693-1701) y PSA (Adlington y col., 2001, J. Med. Chem. 44, 1491-1508). Otras enzimas de la superficie celular específicas para células de tumor de próstata, tales como la serina proteasa recientemente identificada hepsina (Magee y col., 2001, Cancer Res. 61, 5692-5696), también pueden usarse como diana después de identificarse agentes que eligen moléculas sintéticas pequeñas específicas o agentes de péptidos como diana.

Un compuesto de agente que elige diana-ligador que comprende un inhibidor de PAP y/o PSA se derivatiza con un

ligador de dicetona para formar el compuesto mostrado en la FIG. 2C. El agente que elige diana-ligador está ligado al mAb 38C2 y se usa para elegir cáncer de próstata como diana.

5 EJEMPLO 7: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende péptidos miméticos de trombopoyetina o agonistas de molécula pequeña del receptor de trombopoyetina ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa 38C2.

10 El receptor de trombopoyetina de la superficie celular (cMpl, TPOR) es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de crecimiento hepatopoyético. La trombopoyetina (TPO), la citocina que se une al receptor de trombopoyetina, desempeña una función central en la megacariopoyesis y producción de plaquetas. Terapéuticamente, la TPO recombinante está siendo probada en la clínica para el tratamiento de trombocitopenia resultante de quimioterapia y trasplante de médula ósea. Como compuesto terapéutico, la TPO sufre una semivida relativamente corta *in vivo* e inconvenientes de fabricación y formulación.

15 Se prepara un compuesto de agente que elige TPO como diana-anticuerpo para tratar el tratamiento de trombocitopenia resultante de quimioterapia y trasplante de médula ósea. El péptido mimético de TPO AF12505 con la secuencia IEGPTLRQWLAARA (SEC ID N°: 5), que se ha informado que imita la actividad de TPO recombinante (Cwirla y col., 1997, Science, 276:1696-9), se sintetiza con un residuo de Cys adicional añadido al extremo amino para producir CIEGPTLRQWLAARA (SEC ID N°: 6). Este péptido marcado con tiol se hace reaccionar luego con un
20 ligador de maleimida/dicetona (FIG. 14) para producir el compuesto de péptido TPO-ligador (dicetona). La incubación de este derivado de dicetona con el mAb 38C2 genera un compuesto que elige anticuerpos -receptor de TPO como diana.

25 Se usan ensayos *in vitro* para demostrar que el anticuerpo elegido como diana se une a células vivas que expresan TPOR y estimuló la formación de colonias de megacariocitos a un mayor grado que el péptido AF12505. En la técnica se conocen otros péptidos miméticos de TPO y también pueden usarse como agente que elige receptor de TPO como diana. Además, recientemente se han descrito miméticos de molécula pequeña con unión a receptor de TPO por Kimura y col. (FEBS Lett, 1998, :428(3):250-4), también puede usarse en la preparación de compuestos que eligen TPOR como diana.
30

El enfoque anterior puede aplicarse similarmente a elegir como diana el receptor de eritropoyetina (EPO) usando miméticos que eligen EPO como diana que tienen elevada eficacia terapéutica (Middleton y col., J Biol Chem., 1999, 274(20):14163-9; Johnson y col., Nephrol Dial Transplant., 2000, 15(9):1274-7).

35 EJEMPLO 8: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende péptido T-20 o moléculas pequeñas que unen proteínas de la envuelta del VIH-1 ligadas covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa 38C2.

40 T-20, N-acetil-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEC ID N°: 7), un péptido sintético correspondiente a una región de la subunidad de la proteína de la envuelta del VIH-1, bloquea la fusión celular y entrada viral a concentraciones inferiores a 2 ng/ml *in vitro*. Cuando se administra intravenosamente, T-20 (monoterapia), el péptido disminuye los niveles de ARN del VIH en plasma demostrando que la entrada viral puede bloquearse satisfactoriamente *in vivo*. La administración de T-20 proporciona la potente inhibición de la replicación del VIH comparable a las pautas antirretrovirales aprobadas actualmente (Kilby y col., Nat Med., 1998, 4(11):1302-7). Este fármaco de péptido sufre una corta semivida *in vivo* de aproximadamente 2 h.
45

Se produjo un compuesto que elige anticuerpos como diana usando el péptido T-20 como agente que elige diana para aumentar la valencia, potencia y semivida de T-20. El péptido T-20 se sintetizó con un residuo Cys adicional en el extremo carboxi, teniendo el péptido T-20 modificado resultante la secuencia N-acetil-YTSLIHSLIEESQNQQEKNE
50 QELLELDKWASLWNWFC (SEC ID N°: 8). Entonces, este péptido marcado con tiol se hizo reaccionar con un ligador de maleimida/dicetona (FIG. 14) para producir un compuesto de T-20-Cys-ligador. La incubación de este agente que elige diana-ligador de dicetona con el Ab 38C2 produjo un enlace covalente entre el péptido y el anticuerpo. Ensayos *in vitro* demostraron que el anticuerpo elegido como diana demostró elevada potencia en inhibir la entrada e infección del VIH-1.
55

Además de los péptidos que eligen como diana las proteínas de la envuelta del VIH-1, se han descrito varias moléculas pequeñas que se unen a las proteínas de la envuelta. Por ejemplo, el derivado de ácido betulínico IC9564 es un potente compuesto anti-virus de la inmunodeficiencia humana (anti-VIH) que puede inhibir tanto células aisladas primarias del VIH como cepas adaptadas de laboratorio. La prueba sugiere que gp120 del VIH-1 desempeña una función clave en la actividad anti-VIH-1 de IC9564 (Holz-Smith y col., Antimicrob Agents Chemother., 2001, 45(1):60-6). Se espera que la preparación de un compuesto que elige anticuerpos como diana en el que IC9564 es el agente que elige diana tenga elevada actividad con respecto al propio IC9564 aumentando la valencia, semivida, y dirigiendo la destrucción inmunitaria de células infectadas por el VIH-1 basándose en la región constante del anticuerpo elegido. Similarmente, la reciente determinación cristalográfica por rayos X de la estructura de núcleo de la glicoproteína de la envuelta del VIH-1 gp41 abrió una nueva vía al descubrimiento de agentes antivirales para quimioterapia de infección por el VIH-1 y SIDA. Los compuestos con el mejor ajuste para acoplarse
60
65

en la cavidad hidrófoba dentro del núcleo gp41 y con interacciones posibles máximas con el sitio diana también pueden mejorarse mediante la adición de un brazo de dicetona y enlace covalente a un anticuerpo. Se han identificado varios compuestos de esta clase (Debnath y col., J Med Chem., 1999, 42(17):3203-9).

5 EJEMPLO 9: Formación de compuestos que eligen anticuerpos como diana *in vivo* mediante la expresión transgénica del anticuerpo y administración del derivado de agente que elige diana-ligador.

Dentro del alcance de los procedimientos de la presente invención está la formación *in vivo* de los compuestos que eligen diana de la invención. En un enfoque, el mAb 38C2 se produce *in vivo* a partir de un transgén inducible y se administra un derivado de agente que elige diana-ligador (por ejemplo, ligador de dicetona). Usando vectores de administración de genes tales como adenovirus, los ADNc que codifican cadena ligera y pesada o un fragmento monocatenario del mAb 38C2 pueden introducirse en un organismo huésped para establecer el transgén del anticuerpo. Este enfoque permite elevada flexibilidad en el tratamiento. Por ejemplo, un paciente con un riesgo de cáncer general elige recibir el transgén antes de la detección real de la enfermedad. Una vez se ha diagnosticado el cáncer, la expresión del anticuerpo reactivo (por ejemplo, mAb 38C2) se induce en el paciente y se administra un derivado de agente que elige diana-ligador (por ejemplo, ligador de dicetona), en el que el agente que elige diana se diseña específicamente para elegir como diana y afectar el cáncer diagnosticado. Idealmente, tanto la inducción del transgén como la administración del fármaco se llevan a cabo por vía oral, evitando así la hospitalización.

20 EJEMPLO 10: Biblioteca de compuestos que eligen anticuerpos como diana con detectabilidad mejorada.

La selección de antagonista de molécula pequeña o de péptido, agonistas, o simples moléculas de unión, está frecuentemente dificultada por el ensayo disponible para la detección del evento de unión. Frecuentemente se requieren ensayos de desplazamiento o de competición en los que la molécula pequeña desplaza o compite con la unión de otra molécula al sitio diana. El ensayo debe frecuentemente diseñarse específicamente para la molécula diana específica. Frecuentemente no es posible la detección directa de una molécula pequeña que se une a tanto una superficie celular como una proteína.

Este problema se trata preparando la biblioteca en forma de compuestos que eligen anticuerpos como diana. Para este fin, bibliotecas de molécula pequeña se sintetizan con un grupo reactivo adjunto tal como una dicetona o una marca de alta afinidad tal como biotina. La incubación de la molécula marcada con la diana permite la simple y sensible detección del evento de unión, realizado usando un anticuerpo ligado a enzima o marcado con fluoróforo (por ejemplo, 38C2 para la dicetona) o estreptavidina (para biotina). Estos tipos de ensayos se adaptan fácilmente para selección de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos y de péptidos. La ventaja de esta selección directa de moléculas marcadas es que el procedimiento de detección es sensible y normalizado con respecto a la diversidad de posibles moléculas de la superficie celular y proteína u otras dianas solubles de proteína. Una vez identificado, el sitio de unión del brazo del ligador no necesita diseñarse ya que pre-existe en la molécula marcada. Por tanto, la adición directa del anticuerpo de unión covalente proporciona el novedoso agente terapéutico. En casos en los que una marca de biotina se usa para la detección, el brazo de biotina se intercambia fácilmente con un brazo de dicetona para la adición directa del anticuerpo de unión covalente proporcionando el novedoso agente terapéutico. Si la biblioteca es una biblioteca de muestra biológica tal como una biblioteca de fagos de péptido, el sitio de unión del brazo de dicetona está en el punto en el que los residuos de la biblioteca de péptidos se unen a la proteína de envuelta del fago.

45 EJEMPLO 11: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende moléculas pequeñas de TAK-779 que unen las proteínas de la envuelta del VIH-1 ligado covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa 38C2.

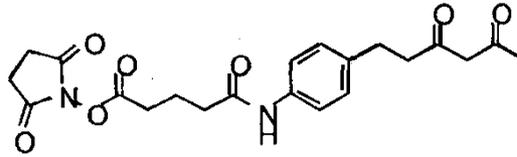
El receptor de β -quimiocina CCR5 es una diana atractiva para la inhibición de la replicación del VIH-1 trópica para macrófagos (usando CCR5 o R5) debido a que individuos que tienen un receptor no funcional (una delección de 32 pb homocigótica en la región codificante de CCR5) son evidentemente normales, pero son resistentes a infección con VIH-1 de R5. TAK-779 es un antagonista de CCR5 de no péptido de bajo peso molecular (Mr 531,13) (Baba y col., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5698-5703). Se preparó un compuesto de agente que elige diana-ligador derivatizando TAK-779 con un ligador de diceto para dar el compuesto mostrado en la FIG. 2D. El compuesto de diceto-TAK-779 se incubó con Mab 38C2 para generar un compuesto de anticuerpo para CCR5 que elige diana (basado en TAK-799). Este compuesto mostró inhibición altamente potente y selectiva de la replicación del VIH-1 de R5 y se unió específicamente a células que expresan CCR5. El compuesto que elige el anticuerpo CCR5 como diana también mostró elevada valencia, elevada potencia biológica y elevada semivida en suero con respecto al del propio TAK-799.

También pueden modificarse otros antagonistas de CCR5 (Shiraishi, y col., 2000, J. Med. Chem., 43, 2049-2063) para la reacción con anticuerpos de unión covalente para producir compuestos que eligen diana de la invención. También puede modificarse una amplia variedad de antagonistas de receptores de quimiocinas usando este enfoque.

65 EJEMPLO 12: Compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende péptido LHRH ligado covalentemente

al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa 38C2.

El antagonista de [D-Lys6] LH-RH Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu_Arg-Pro-Gly-NH₂ (SEC ID N°: 9) (100 micromoles) se disolvió en 1 ml de DMF anhidra. Se añadió un equivalente de NHS-ligador de dicetona (compuesto 35) con agitación durante la noche. El disolvente se evaporó a vacío y el producto se purificó por HPLC. El compuesto de [D-Lys6] LH-RH-ligador de dicetona resultante se usó directamente para acoplarse al anticuerpo 38C2. El anticuerpo modificado covalentemente resultante se unió específicamente a la línea de cáncer de ovario epitelial humano OV-1063 conocida por expresar el receptor LH-RH.



36

Las definiciones que están contenidas en el texto incorporado por referencia se excluyen hasta el punto que contradigan las definiciones en la presente divulgación. Se contemplan que todas las estructuras mostradas en el presente documento proporcionan todos los enantiómeros.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que elige anticuerpos como diana que comprende uno o más agentes que eligen diana ligados covalentemente al sitio de combinación de anticuerpos monoclonales para aldolasa de ratón 38C2 o una versión humanizada o quimérica humana de los mismos mediante un ligador de fórmula X-Y-Z en la que:
- 10 (i) X es una cadena de conexión lineal o ramificada de átomos que comprende cualquiera de C, H, N, O, P, S, Si, F, Cl, Br y I, o una sal de los mismos, y que comprende una unidad de éter de repetición de entre 2-100 unidades,
- (ii) Y es opcional y es un anillo saturado o insaturado homo- o heterocarbocíclico de 5 ó 6 miembros individual o condensado localizado dentro de 1-20 átomos de Z, y
- (iii) Z es un grupo acil-beta-lactama para ligar covalentemente el uno o más agentes que eligen diana con una cadena lateral de un aminoácido reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo para aldolasa.
- 15 2. El compuesto que elige anticuerpos como diana según la reivindicación 1, en el que el residuo de aminoácido reactivo en el sitio de combinación del anticuerpo para aldolasa es un residuo de lisina.
3. El compuesto que elige anticuerpos como diana según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo es de longitud completa.
- 20 4. El compuesto que elige anticuerpos como diana según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que tiene un único sitio de combinación tal como fragmento de anticuerpos Fab o Fab'.
- 25 5. El compuesto que elige anticuerpos como diana según cualquier reivindicación precedente, en el que X también incluye un grupo seleccionado de alquilo, alquenilo, alquinilo, oxoalquilo, oxoalquenilo, oxoalquinilo, aminoalquilo, aminoalquenilo, aminoalquinilo, sulfoalquilo, sulfoalquenilo, sulfoalquinilo, fosfoalquilo, fosfoalquenilo y fosfoalquinilo.
- 30 6. El compuesto que elige anticuerpos como diana según cualquier reivindicación precedente, en el que el compuesto que elige anticuerpos como diana comprende dos agentes que eligen diana con diferente especificidad ligados al sitio de combinación del anticuerpo para aldolasa.
7. El compuesto que elige anticuerpos como diana según la reivindicación 6, en el que el ligador es ramificado o lineal y liga los dos agentes que eligen diana a la cadena lateral del aminoácido reactivo en el sitio de combinación de anticuerpos.
- 35 8. El compuesto que elige anticuerpos como diana según cualquier reivindicación precedente, que comprende además un fármaco terapéutico covalentemente unido al grupo X.
- 40 9. El compuesto que elige anticuerpos como diana según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho agente que elige diana es proteína o un péptido.
- 45 10. Un procedimiento de producción de un compuesto que elige anticuerpos como diana según cualquier reivindicación precedente, comprendiendo dicho procedimiento ligar covalentemente dicho agente que elige diana al sitio de combinación del anticuerpo para aldolasa mediante dicho ligador.

50

55

60

65

Figura 1

Agente que elige diana (T) — Cadena de Conexión (X)

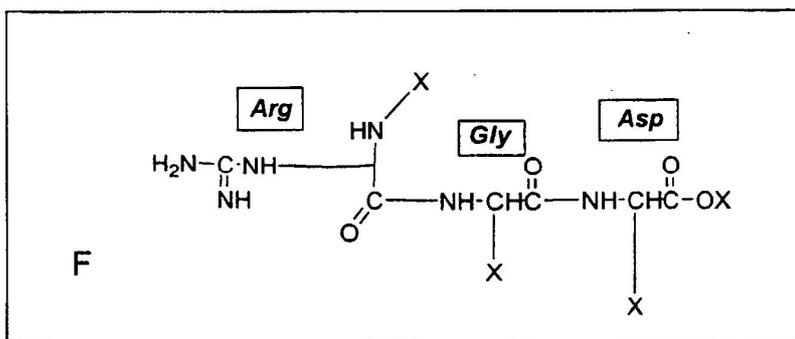
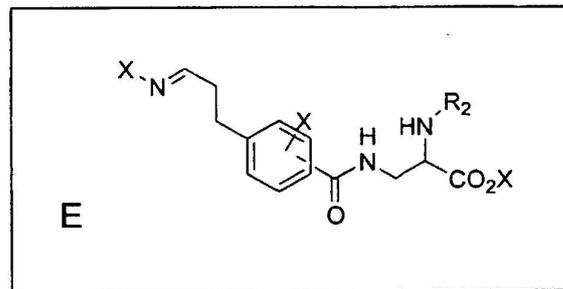
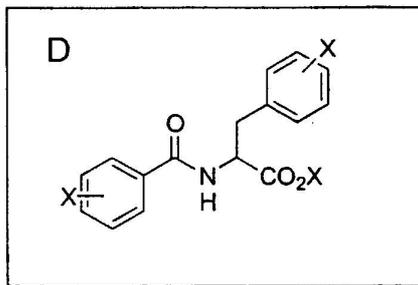
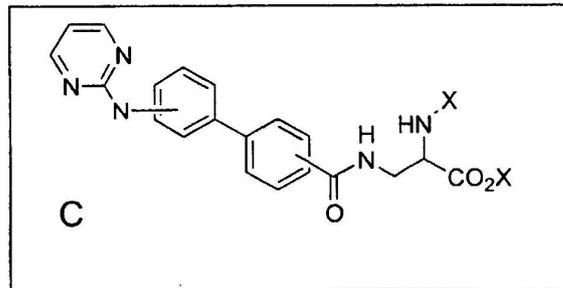
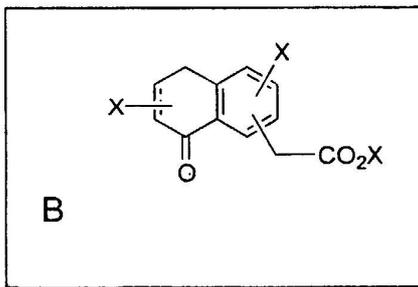
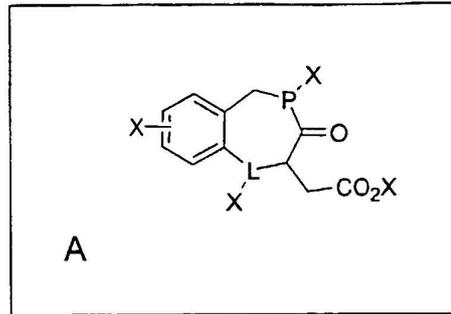


Figura 2

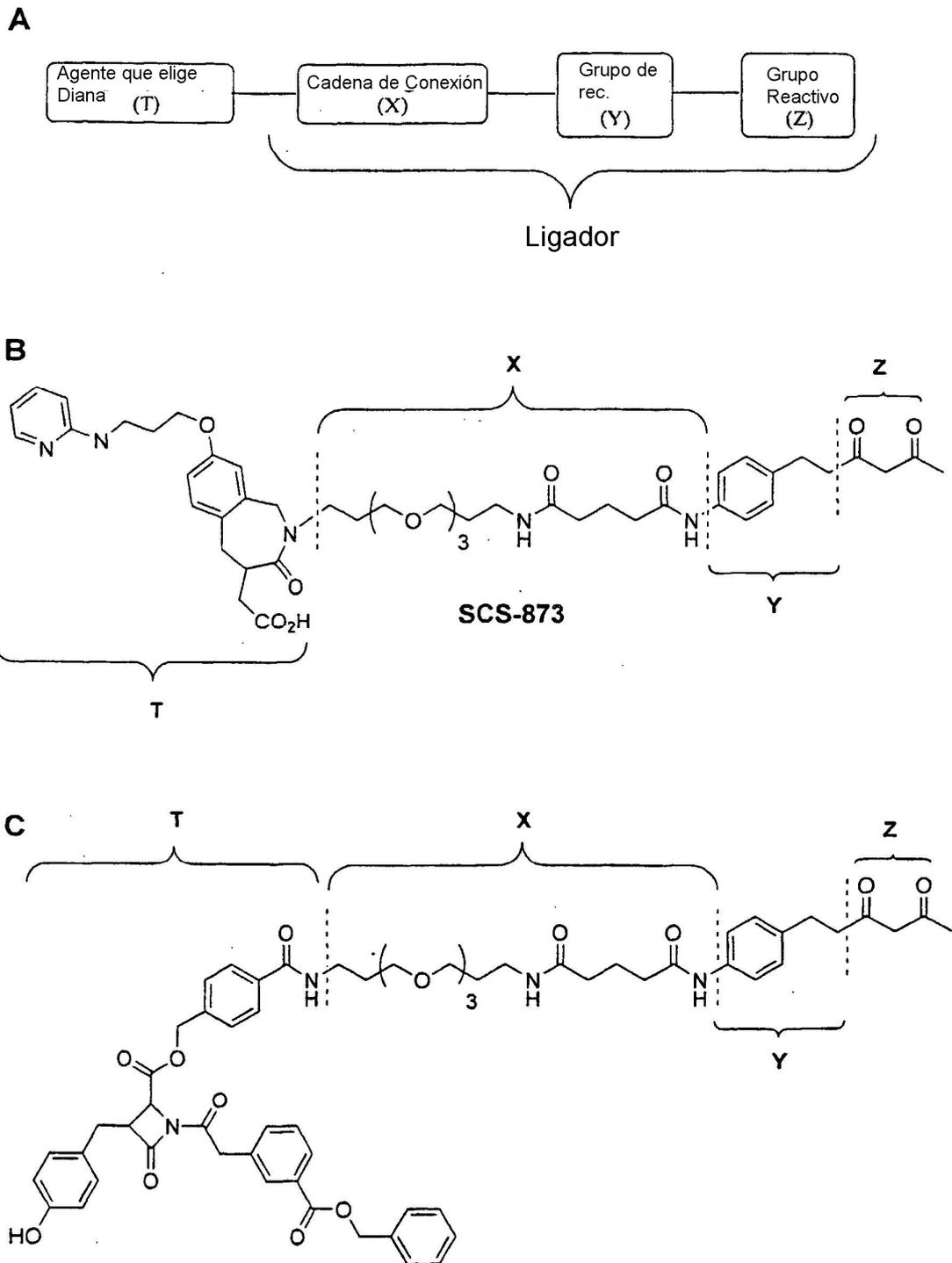


Figura 2 (Cont'd.)

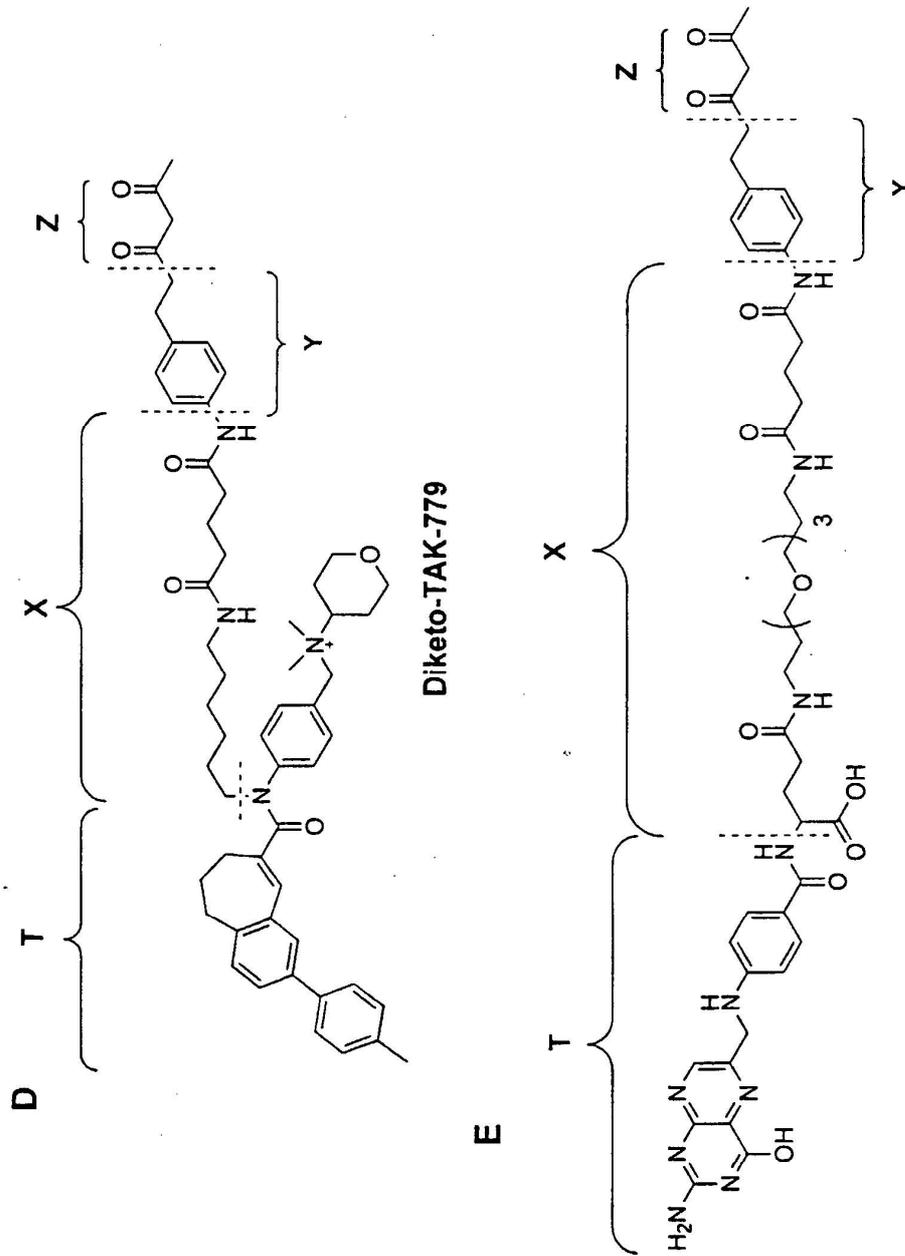
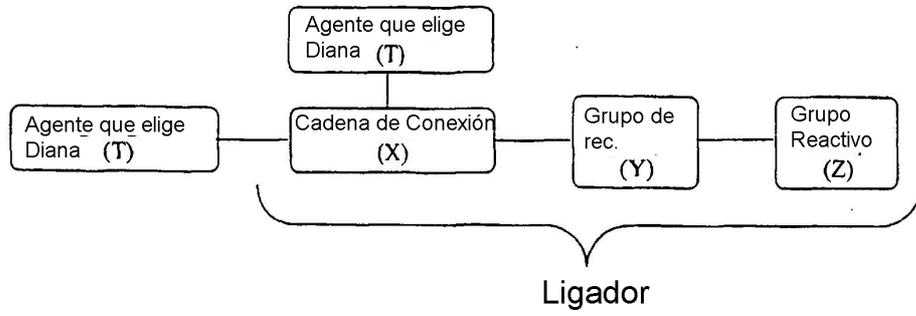
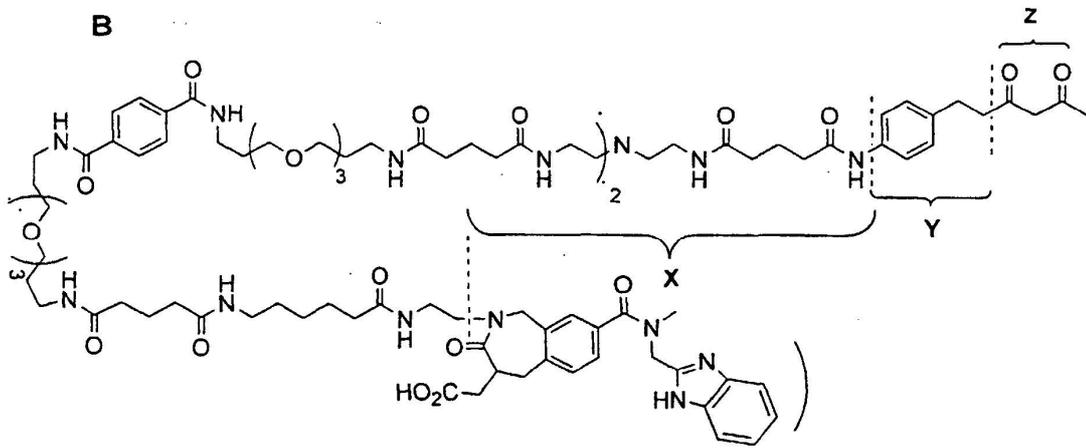


Figura 3

A



B



C

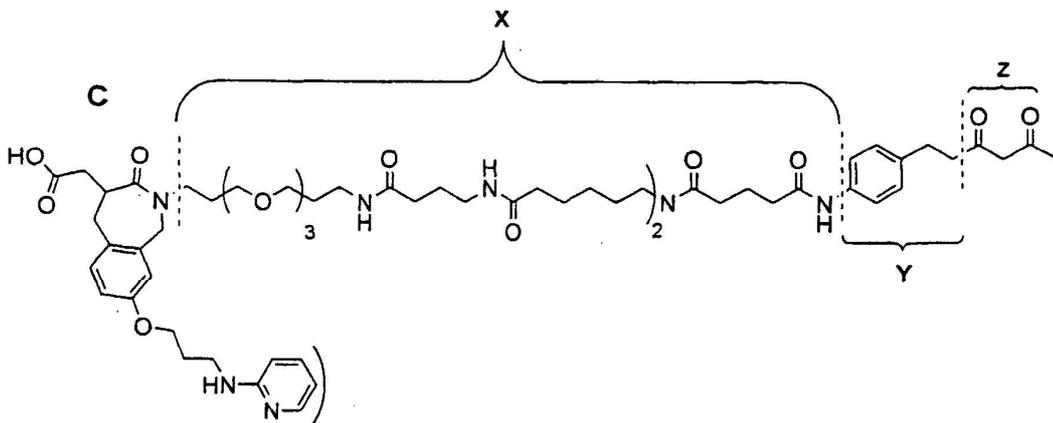


Figura 4

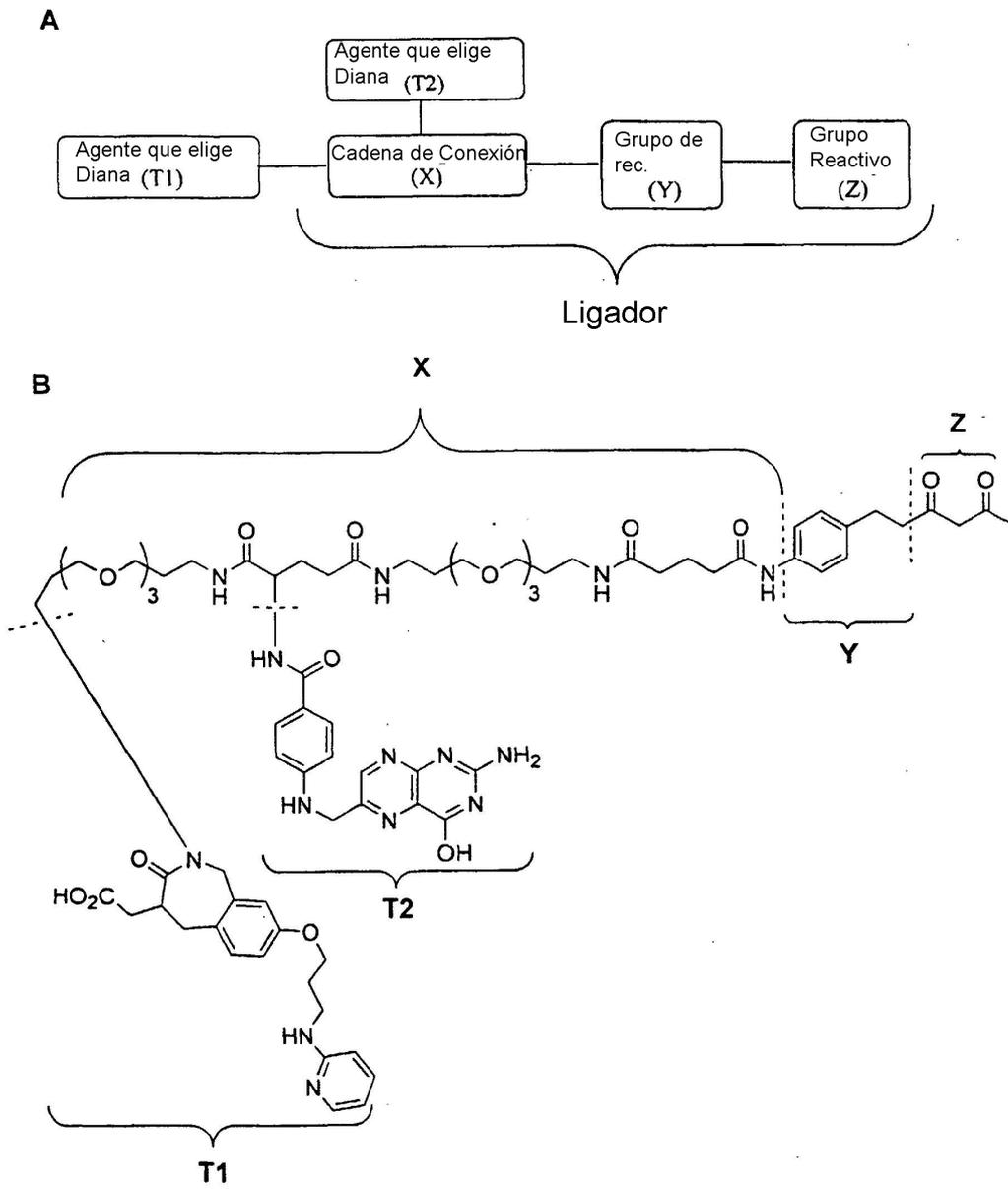


Figura 6

Grupos reactivos del ligador(Z)

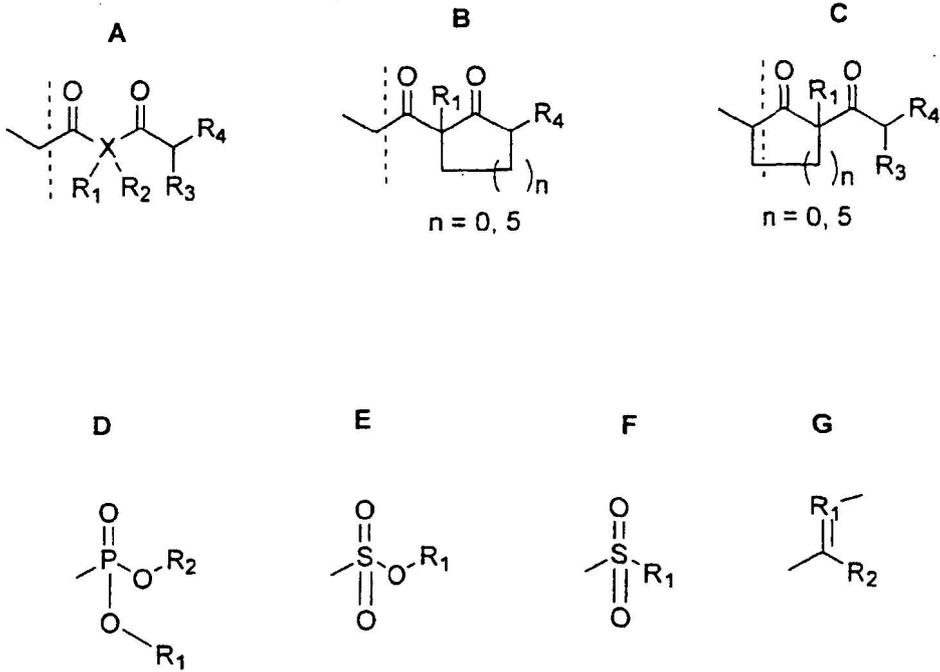


Figura 7

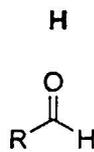
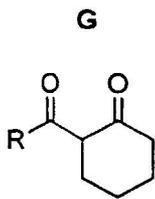
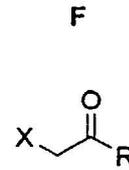
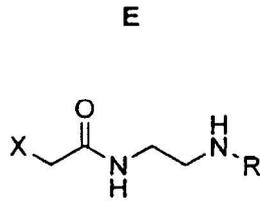
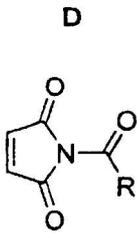
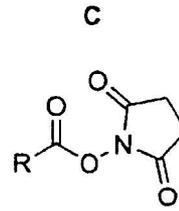
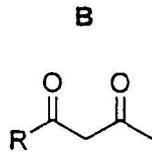
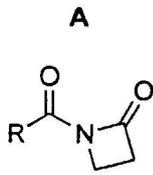


Figura 8

Grupos de Reconocimiento del ligador (Y)

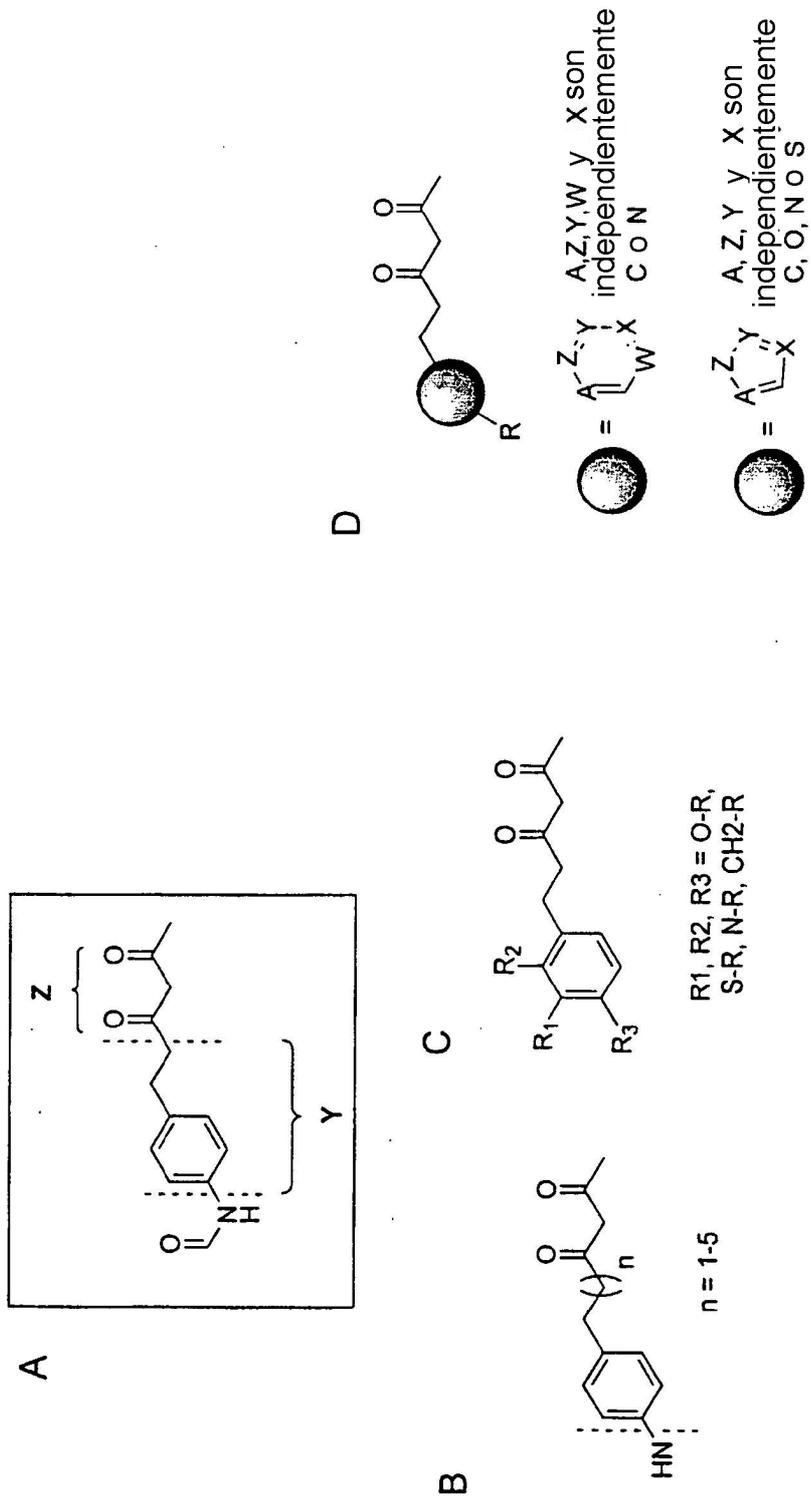
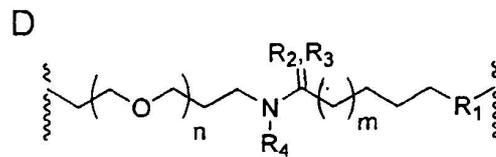
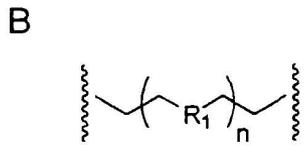
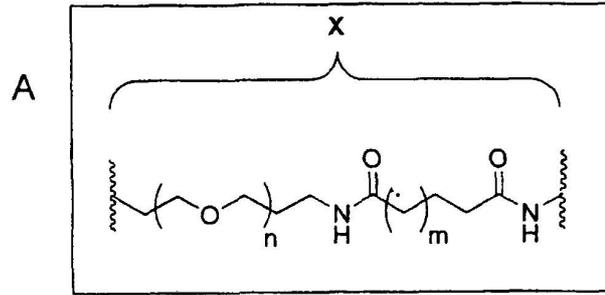


Figura 9

Cadena de conexión del Ligador (X)



R1 = O, CH2, NR₁R₂,
Si, S, S(O), S(O)₂

C
Cadena Ramificada:

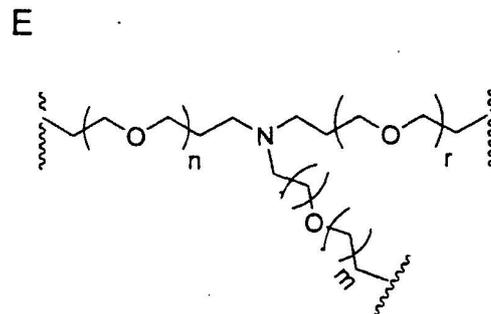
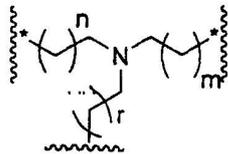


Fig. 10 (esquema 1)

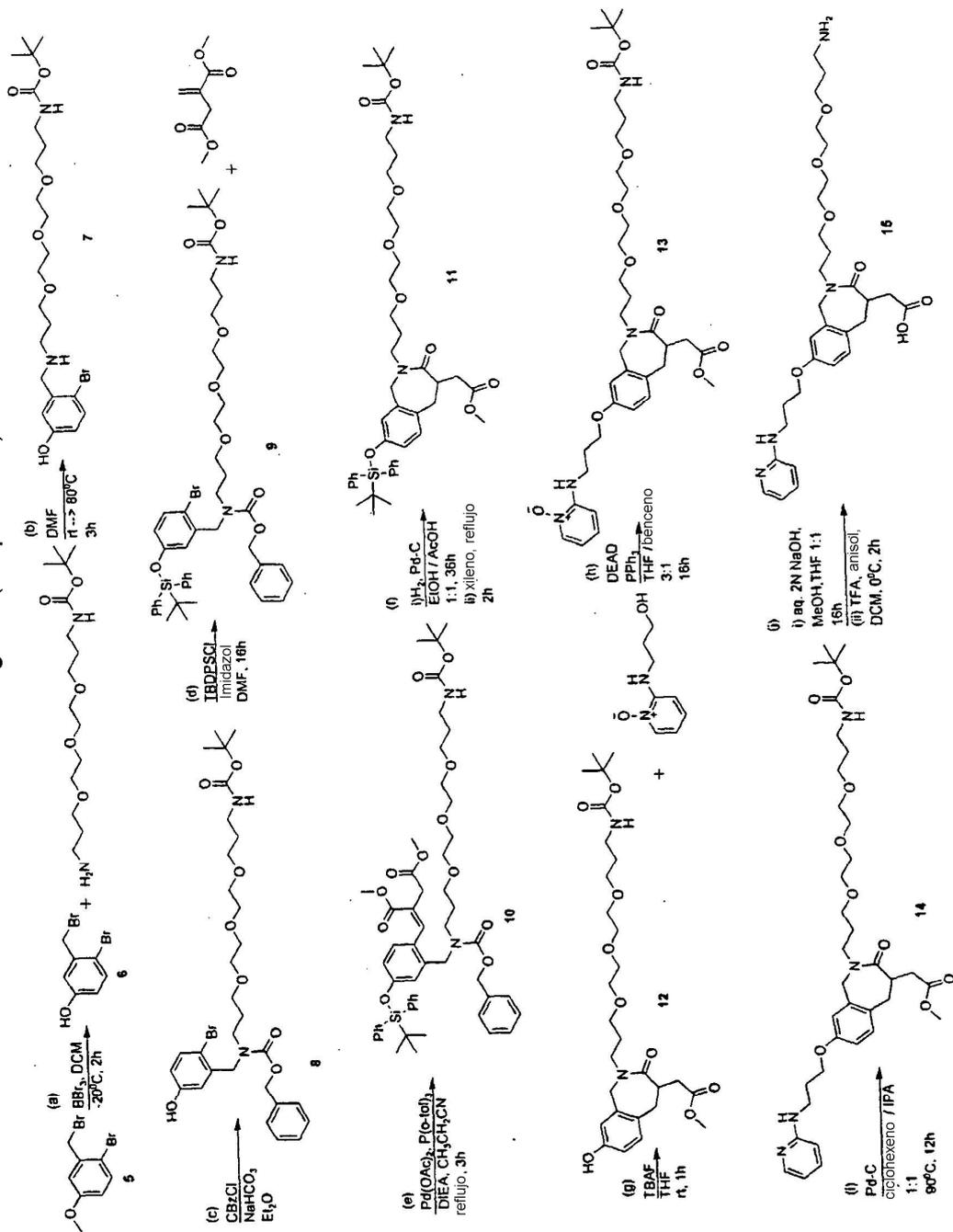


FIG. 11 (Esquema 2)

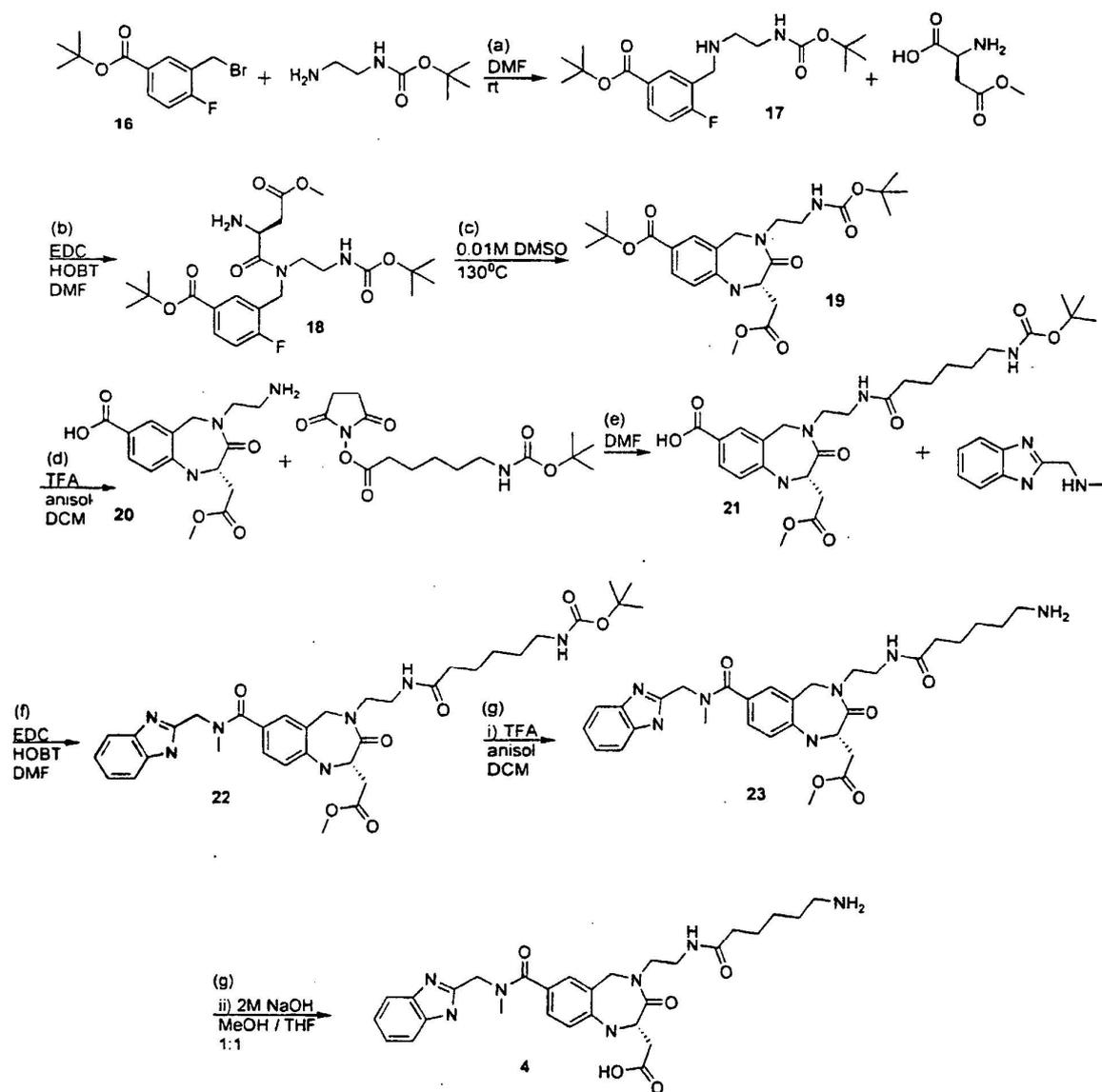


FIG. 12 (esquema 3)

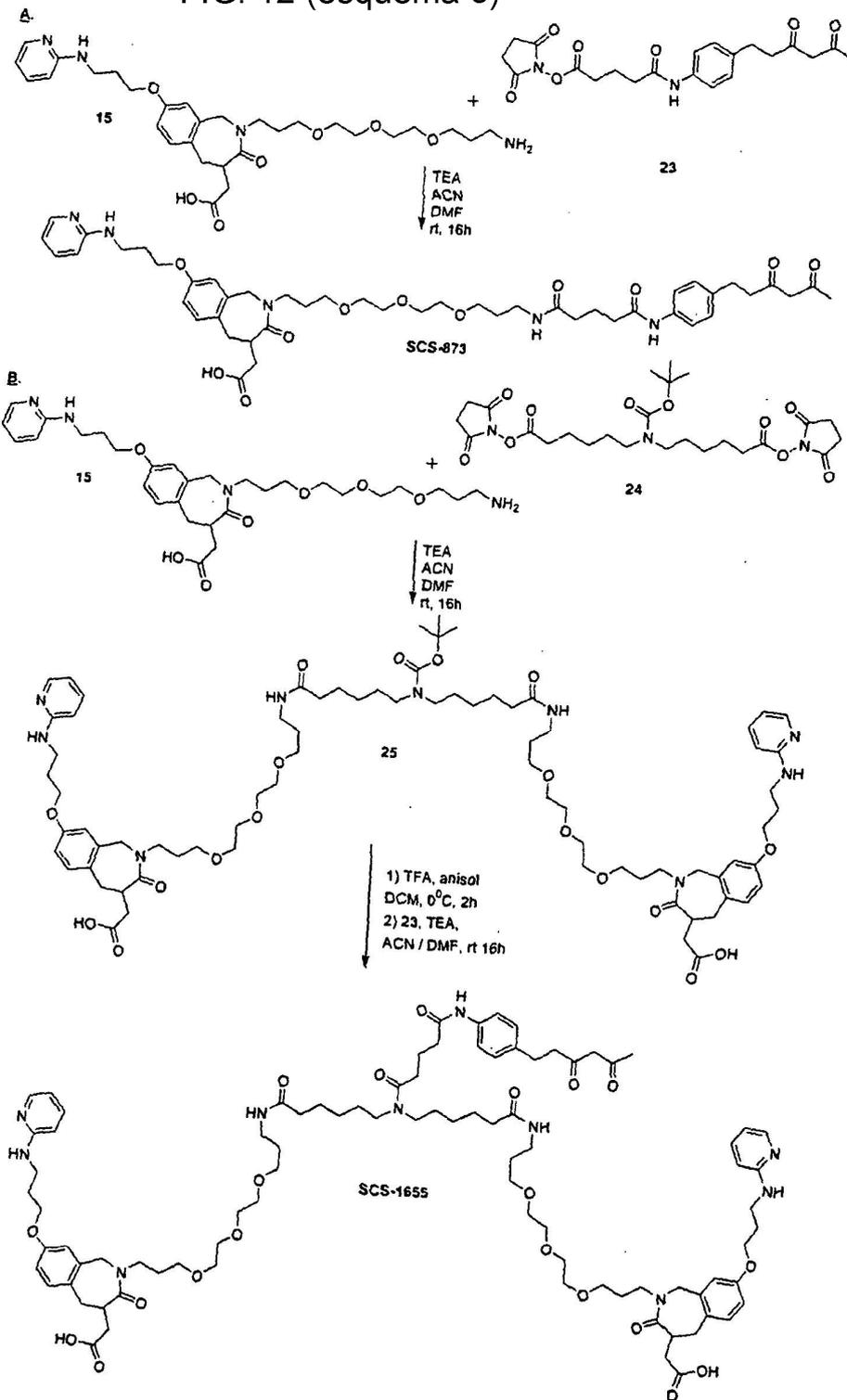
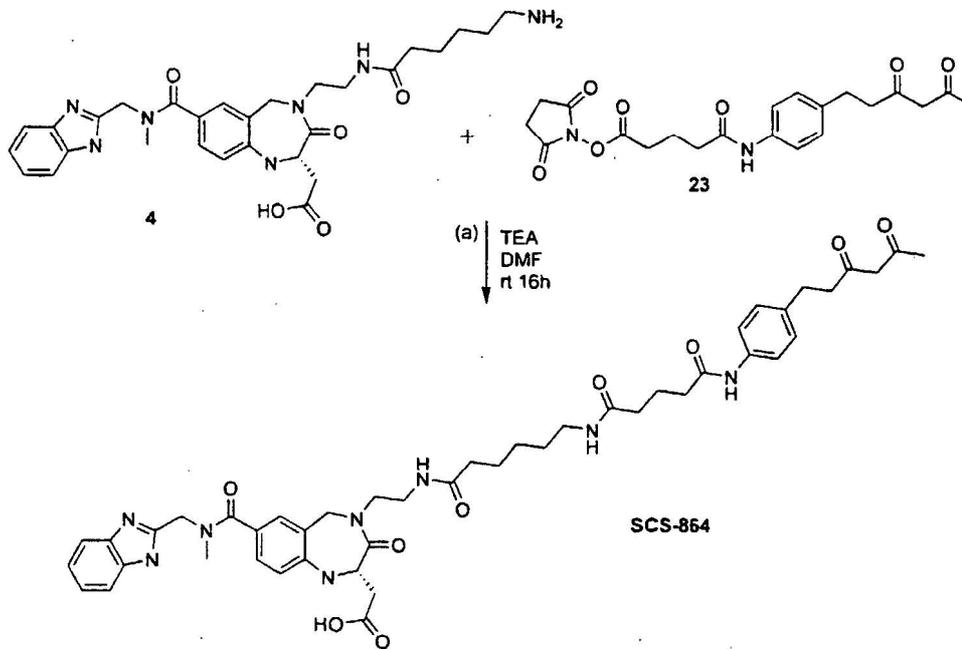


FIG. 13 (esquema 4)

Reacción A



Reacción B

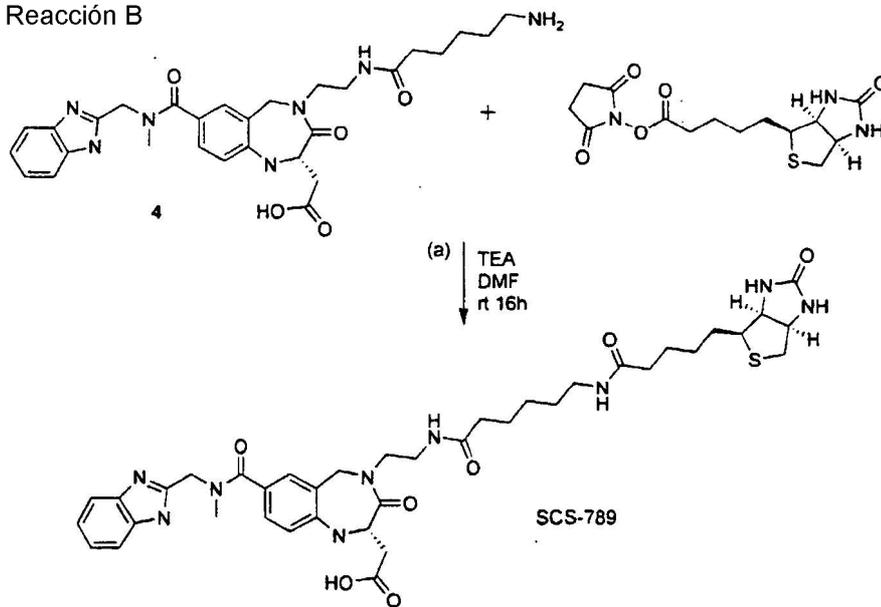


FIG. 14

