

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 552**

51 Int. Cl.:

C07D 498/14 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 31/5383 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009 E 09707128 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 2240495**

54 Título: **Metabolito de nemorrubicina y reactivos análogos, conjugados anticuerpo-fármaco y métodos**

30 Prioridad:

01.02.2008 US 25504

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

07.10.2015

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**COHEN, ROBERT L.;
HA, EDWARD HYUNGSUK y
REYNOLDS, MARK E.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 547 552 T3

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

DESCRIPCIÓN

Metabolito de nemorrubicina y reactivos análogos, conjugados anticuerpo-fármaco y métodos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a conjugados anticuerpo-fármaco con actividad anticancerígena y a sus usos médicos.

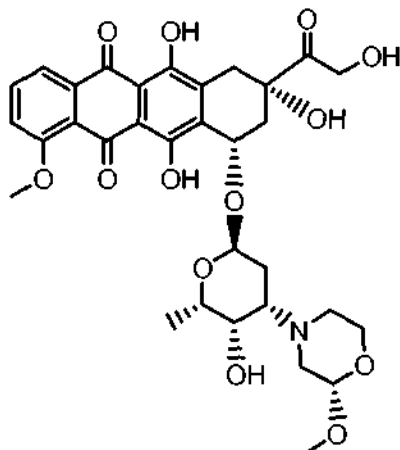
10 **Antecedentes de la invención**

La terapia de anticuerpos se ha establecido para el tratamiento de fijación de diana de pacientes con cáncer, y trastornos inmunológicos y angiogénicos (Carter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357). El uso de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), es decir inmunoconjugados, para el suministro local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos para eliminar o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer, fijan como diana el suministro de restos de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, considerando que la administración sistémica de estos agentes farmacológicos sin conjugar puede dar como resultado niveles inaceptables de toxicidad para las células normales además de para las células tumorales que se busca eliminar (Xie *et al.* (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121; Law *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337; Wu *et al.* (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trail *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614). De ese modo, se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Los esfuerzos para diseñar y refinar ADC se han centrado en la selectividad de anticuerpos monoclonales (mAb) así como en el mecanismo de acción del fármaco, la unión del fármaco, la proporción fármaco/anticuerpo (carga), y las propiedades de liberación del fármaco (McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.*; Doronina *et al.* (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124; Erickson *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66(8):1-8; Sanderson *et al.* (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843-852; Jeffrey *et al.* (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358; Hamblett *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070). Los restos de fármaco puede impartir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN, o unión a topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores proteicos.

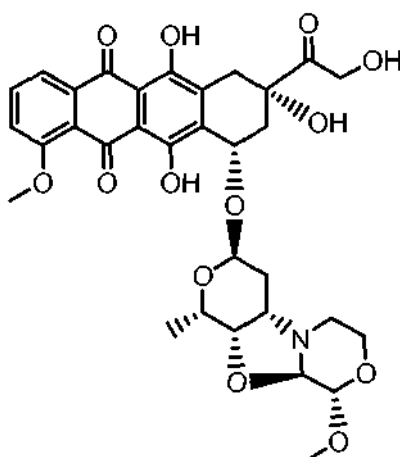
Se piensa que el análogo de antraciclina, doxorubicina (ADRIAMYCIN) interacciona con el ADN por intercalación e inhibición del progreso de la enzima topoisomerasa II, que desenrolla el ADN para la transcripción. La doxorubicina estabiliza el complejo de topoisomerasa II después de que se rompa la cadena de ADN para la replicación, evitando que se libere la doble hélice de ADN y deteniendo de ese modo el proceso de replicación. La doxorubicina y daunorrubicina (DAUNOMYCIN) son prototipos de productos naturales citotóxicos de compuestos quimioterapéuticos de antraciclina (Sessa *et al.* (2007) *Cardiovasc. Toxicol.* 7:75-79). Se han preparado y estudiado inmunoconjugados y profármacos de daunorrubicina y doxorubicina (Kratz *et al.* (2006) *Current Med. Chem.* 13:477-523; Jeffrey *et al.* (2006) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362; Torgov *et al.* (2005) *Bioconj. Chem.* 16:717-721; Nagy *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:829-834; Dubowchik *et al.* (2002) *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532; King *et al.* (2002) *J. Med. Chem.* 45:4336-4343; documento de Patente US 6630579). El conjugado anticuerpo-fármaco BR96-doxorubicina reacciona específicamente con el antígeno asociado a tumor Lewis-Y y se ha evaluado en estudios en fase I y II (Saleh *et al.* (2000) *J. Clin. Oncology* 18:2282-2292; Ajani *et al.* (2000) *Cancer Jour.* 6:78-81; Tolcher *et al.* (1999) *J. Clin. Oncology* 17:478-484). Se desvelan análogos de antraciclina y sus conjugados en el documento de Patente US 2007/0060534.

Los análogos de morfolina de doxorubicina y daunorrubicina, formados por ciclación del grupo glicósido amino, tienen mayor potencia (Acton *et al.* (1984) *J. Med. Chem.* 638-645; documentos de Patente US 4464529; US 4672057; US 5304687). La nemorrubicina es un análogo semisintético de doxorubicina con un grupo 2-metoximorfolino en el glicósido amino de la doxorubicina y ha estado en evaluación clínica (Grandi *et al.* (1990) *Cancer Treat. Rew.* 17:133; Ripamonti *et al.* (1992) *Brit. J. Cancer* 65:703;), incluyendo ensayos en fase II/III para carcinoma hepatocelular (Sun *et al.* (2003) *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology* 22, Abs1448; Quintieri (2003) *Proceedings of the American Association of Cancer Research*, 44:1^a Ed, Abs 4649; Pacciarini *et al.* (2006) *Jour. Clin. Oncology* 24:14116).

La nemorrubicina se nombra (8S,10S)-6,8,11-trihidroxi-10-((2R,4S,5S,6S)-5-hidroxi-4-((S)-2-metoximorfolino)-6-metiltetrahidro-2H-piran-2-iloxi)-8-(2-hidroxiacetil)-1-metoxi-7,8,9,10-tetrahidrotetraceno-5,12-diona, con N^o Reg. CAS 108852-90-0, y tiene la estructura:



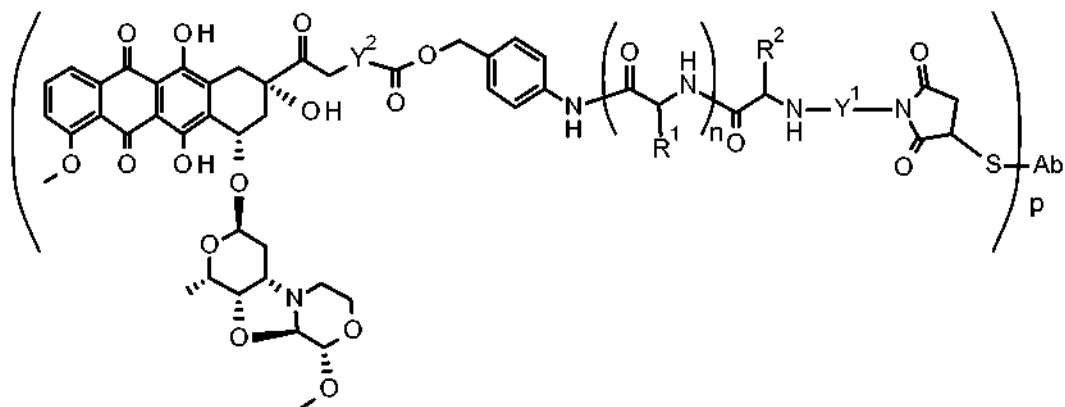
Se han caracterizado varios metabolitos de nemorrubicina (MMDX) a partir de microsomas hepáticos, incluyendo PNU (159682), (Quintieri *et al.* (2005) *Clinical Cancer Research*, 11(4):1608-1617; Beulz-Riche *et al.* (2001) *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 15(6):373-378; documentos de Patente EP 0889898; WO 2004/082689; WO 2004/082579). PNU (159682) fue marcadamente más citotóxico que la nemorrubicina y la doxorubicina *in vitro*, y fue eficaz en modelos de tumor *in vivo*. PNU (159682) se nombra 3'-desamino-3'',4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-oxi-4''-morfolinil]doxorubicina, y tiene la estructura:



Sumario

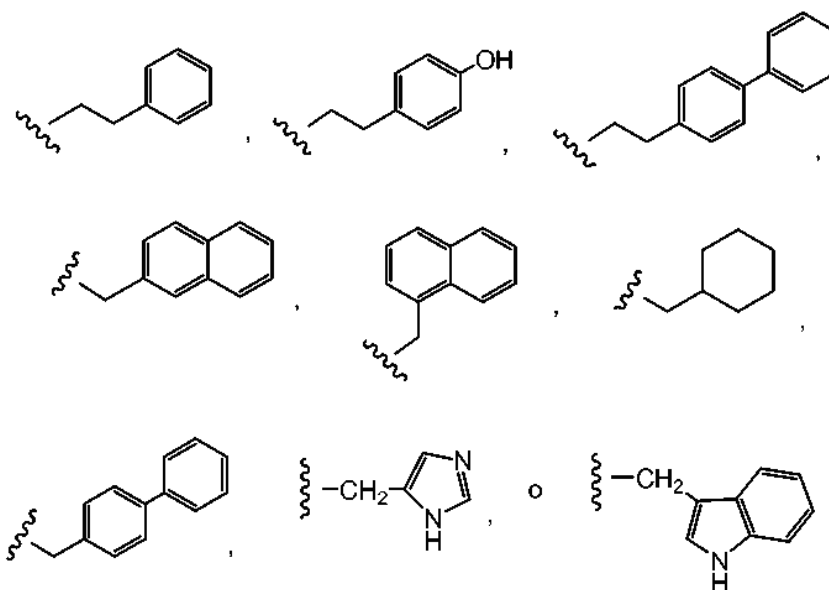
Los aspectos de la invención incluyen métodos de fabricación, métodos de preparación, métodos de síntesis, métodos de conjugación, y métodos de purificación de los reactivos de resto de fármaco, los reactivos de fármaco-conector, y los compuestos de conjugado anticuerpos-fármaco.

Los compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención comprenden un anticuerpo (Ab) unido covalentemente mediante un conector (L) a uno o más metabolitos de nemorrubicina. Por lo tanto, la presente invención proporciona compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco representados por la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

- 5 Ab es un anticuerpo;
 Y^1 es $C(O)(C(R^{10})_2)_q$, $(C(R^{10})_2)_q$, o $(C(R^{10})_2)_qO(C(R^{10})_2)_q$;
 q es 2, 3, 4, 5 o 6,
 Y^2 es O, NR^{10} , S, $OC(O)NR^{10}$ -(alquil C₁-C₆)- NR^{10} ;
 R^1 y R^2 son independientemente una cadena lateral de aminoácido seleccionada entre hidrógeno, metilo,
 10 isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo, y las estructuras:



- 20 cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, carbociclilo C₃-C₁₂, heterociclilo C₂-C₂₀, arilo C₆-C₂₀, y heteroarilo C₁-C₂₀, opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, I, $-CH_2OH$, $-CH_2C_6H_5$, $-CN$, $-CF_3$, $-CO_2H$, $-CONH_2$, $-CONHCH_3$, $-NO_2$, $-N(CH_3)_2$, $-NHCOCH_3$, $-NHS(O)_2CH_3$, $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-S(O)_2NH_2$, y $-S(O)_2CH_3$;
 n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7; y
 p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

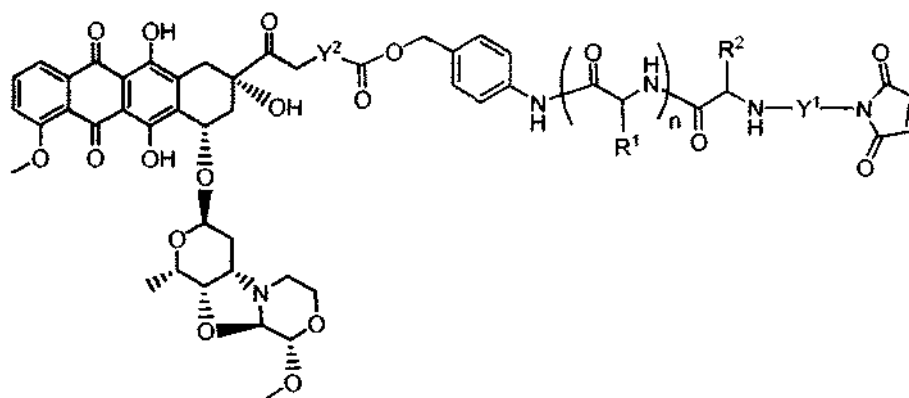
- 25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende una mezcla de compuestos anticuerpo-fármaco representados por la estructura anterior, en la que la carga de fármaco promedio por anticuerpo es de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un compuesto de anticuerpo-fármaco representado por la estructura anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y que comprende además opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico.

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método *ex vivo* de inhibición de proliferación celular que comprende tratar células de mamífero en un medio de cultivo celular con un compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco de la presente invención, mediante lo cual se inhibe la proliferación de las células.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de anticuerpo-fármaco de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de cáncer, comprendiendo el método administrar a un paciente una formulación del compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco, opcionalmente en combinación con un agente quimioterapéutico.

15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un reactivo fármaco-conector seleccionado entre las estructuras:



20 en la que:

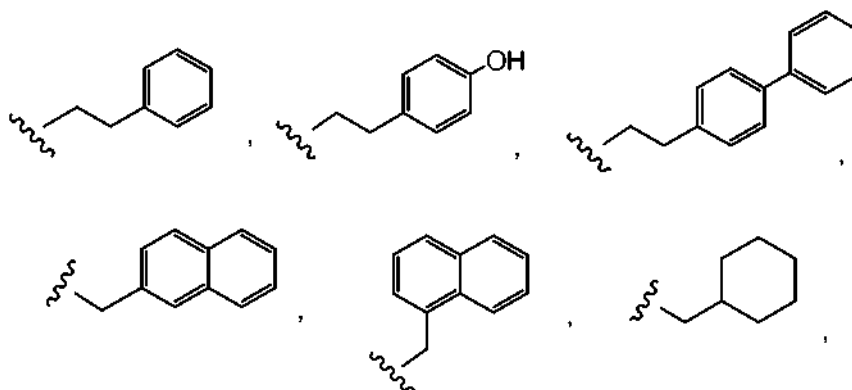
Y^1 es $C(O)(C(R^{10})_2)_q$, $(C(R^{10})_2)_q$ o $(C(R^{10})_2)_qO(C(R^{10})_2)_q$;

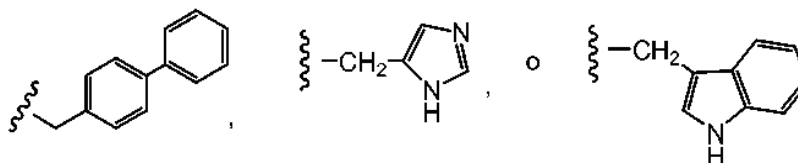
q es 2, 3, 4, 5 o 6,

Y^2 es O, NR^{10} , S, $OC(O)NR^{10}$ -(alquil C_1 - C_6)- NR^{10} ;

25 R^1 y R^2 son independientemente una cadena lateral de aminoácido seleccionada entre hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo, y las

30 estructuras:





cada R¹⁰ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, carbociclilo C₃-C₁₂, heterociclilo C₂-C₂₀, arilo C₆-C₂₀, y heteroarilo C₁-C₂₀, opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, I, -CH₂OH, -CH₂C₆H₅, -CN, -CF₃, -CO₂H, -CONH₂, -CONHCH₃, -NO₂, -N(CH₃)₂, -NHCOCH₃, -NHS(O)₂CH₃, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -S(O)₂NH₂, y -S(O)₂CH₃;

y

n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

A continuación se hace referencia detallada a ciertas realizaciones de la invención, los ejemplos de las cuales se ilustran en las estructuras y fórmulas acompañantes. A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención, y son consistentes con: Singleton *et al.*, (1994) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2^a Ed., J. Wiley & Sons, Nueva York, NY; y Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5^a Ed., Garland Publishing, Nueva York.

DEFINICIONES

A menos que se indique otra cosa, se pretende que los siguientes términos y expresiones que se usan en el presente documento tengan los siguientes significados.

Cuando en el presente documento se usan nombres comerciales, los presentes solicitantes pretenden incluir independientemente la formulación de producto de nombre comercial, el fármaco genérico, y el ingrediente o ingredientes farmacéuticos activos del producto de nombre comercial.

La expresión "cadena lateral de aminoácido" incluye los grupos que se encuentran en: (i) aminoácidos de origen natural tales como alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina; (ii) aminoácidos minoritarios tales como ornitina y citrulina; (iii) aminoácidos no naturales, beta-aminoácidos, análogos y derivados sintéticos de aminoácidos de origen natural; y (iv) todos los enantiómeros, diastereómeros, enriquecidos isoméricamente, marcados isotópicamente, formas protegidas, y mezclas racémicas de los mismos.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos diespecíficos), y fragmentos de anticuerpo, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Miller *et al.* (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivados de otras especies. Un anticuerpo es que una proteína generada por el sistema inmune que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5^a Ed., Garland Publishing, Nueva York). Un antígeno diana tiene generalmente numerosos sitios de unión, también denominados epítomos, reconocidos por los CDR de múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítipo diferente tiene una estructura diferente. De ese modo, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o una parte del mismo, incluyendo tales dianas, pero sin limitarse a, células cancerígenas o células que producen anticuerpos autoinmunes asociados a una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivar de cualquier especie, incluyendo origen humano, murino, o de conejo.

"Fragmentos de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o región variable del mismo. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; dianticuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una librería de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerígenas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos básicamente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose frente a un sitio antigénico individual. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige frente a un determinante individual en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo se obtiene de una población de anticuerpos básicamente homogénea, y no pretende indicar que requiere una producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.* (1975) *Nature* 256:495, o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (véase, el documento de Patente US 4816567). Los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar a partir de librerías de anticuerpos de fagos usando las técnicas que se describen en Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597.

En el presente documento, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otras especies o pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, de modo que exhiben la actividad biológica deseada (documento de Patente US 4816567; y Morrison *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono o simio del viejo mundo) y secuencias de región constante humanas.

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

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

Un "receptor ErbB" es una proteína tirosina quinasa receptora que pertenece a la familia de receptores ErbB que son importantes mediadores del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. La familia de receptores ErbB incluye cuatro miembros distintos que incluyen el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1, HER1), HER2 (ErbB2 o p185^{neu}), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4 o tyro2). El receptor ErbB comprende generalmente un dominio extracelular, que se puede unir a un ligando ErbB; un dominio transmembrana lipofílico; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización carboxilo terminal que aloja varios restos de tirosina que se pueden fosforilar. El receptor ErbB puede ser un receptor ErbB de "secuencia nativa" o una "variante de secuencia de aminoácidos" del mismo. El receptor ErbB puede ser un receptor ErbB humano de secuencia nativa. Por lo tanto, un "miembro de la familia de receptores ErbB" es EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3, ErbB4 o cualquier otro receptor ErbB conocido en la actualidad o que se identifique en el futuro. El análisis sistemático de identificación de secuencia ha dado como resultado la identificación de otros dos miembros de la familia de receptores ErbB; ErbB3 (documentos de Patente US 5183884; US 5480968; Kraus *et al.* (1989) *PNAS* (USA) 86:9193-9197) y ErbB4 (documento de Patente EP 599274; Plowman *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750; y Plowman *et al.* (1993) *Nature* 366:473-475). Estos dos receptores presentan un aumento de expresión en al menos algunas líneas de células de cáncer de mama. Se han caracterizado anticuerpos anti-ErbB2 (documentos de Patente US 5677171; US 5821337; US 6054297; US 6165464; US 6407213; US 6719971; US 6800738; Fendly *et al.* (1990) *Cancer Research* 50:1550-1558; Kotts *et al.* (1990) *In Vitro* 26(3):59A; Sarup *et al.* (1991) *Growth Regulation* 1:72-82; Shepard *et al.* (1991) *J. Clin. Immunol.* 11(3): 117-127; Kumar *et al.* (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986; Lewis *et al.* (1993) *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263; Pietras *et al.* (1994) *Oncogene* 9:1829-1838; Vitetta *et al.* (1994) *Cancer Research* 54:5301-5309; Sliwkowski *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665; Scott *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:14300-5; D'souza *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91:7202-7206; Lewis *et al.* (1996) *Cancer Research* 56:1457-1465; y Schaefer *et al.* (1997) *Oncogene* 15:1385-1394.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los restos de una región hipervariable del receptor están reemplazados con restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de la inmunoglobulina humana están reemplazados con los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende básicamente la totalidad de al menos uno, y por lo general dos, de los dominios variables, en los que todos o básicamente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o básicamente todas, las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprende opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana (Jones *et al.* (1986) *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-329; y Presta, (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596). Los anticuerpos anti-ErbB2 humanizados incluyen huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®, trastuzumab) como se describe en la Tabla 3 del documento de Patente US 5821337; y anticuerpos 520C9 humanizados (documento de Patente WO 93/21319) y 2C4 humanizados.

Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o la extensión de cáncer. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, retraso o ralentización del progreso de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), tanto si son detectables como indetectables. "Tratamiento" también pretende incluir prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada sino se recibiera el tratamiento. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen los que ya padecen la afección o trastorno así como los que son propensos a padecer la afección o trastorno o aquellos en los que se ha de prevenir la afección o trastorno.

Un "trastorno" es cualquier afección que se podría beneficiar del tratamiento de la presente invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen las patologías que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Algunos ejemplos no limitantes de trastornos que se tratan en el presente documento incluyen tumores benignos y malignos; leucemia y neoplasias linfoides, en particular cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas, próstata o vejiga; trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, de los macrófagos, epiteliales, del estroma y blastocóelicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos. Un trastorno a modo de ejemplo que se trata de acuerdo con la presente invención es un tumor maligno sólido.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede: (i) reducir el número de células cancerígenas; (ii) reducir el tamaño del tumor; (iii) inhibir, retardar, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; (iv) inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; (v) inhibir el crecimiento tumoral; y/o (vi) aliviar en cierto grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. En la medida que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerígenas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. En modelos animales, se puede evaluar la eficacia mediante medidas físicas del tumor durante el curso que sigue a la administración del ADC, y mediante la determinación de la remisión parcial y completa del tumor. Para la terapia de cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, mediante la evaluación del tiempo para el progreso de la enfermedad (TTP) y/o la determinación de la tasa de respuesta (RR).

El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad dada de fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medida tanto del tiempo (tasa) como de la cantidad total (grado) de fármaco que alcanza la circulación general a partir de una forma de dosificación administrada.

Los términos "cáncer" y "cancerígeno de" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza por lo general por un crecimiento celular sin regular. Un "tumor" comprende una o mas células cancerígenas. Algunos ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Algunos ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLC"), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal,

cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de la cabeza y el cuello.

Un "cáncer que expresa ErbB" es el que comprende células en las que está presente la proteína ErbB en sus superficies celulares. Un "cáncer que expresa ErbB2" es el que produce niveles suficientes de ErbB2 en la superficie de las células del mismo, de modo que un anticuerpo anti-ErbB2 se puede unir a las mismas y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer.

Un cáncer que "sobrexexpresa" un receptor, por ejemplo un receptor ErbB, es el que tiene niveles considerablemente mayores del receptor, tal como ErbB2, en la superficie de las células del mismo, en comparación con una célula no cancerígena del mismo tipo de tejido. Tal sobreexpresión puede estar causada por amplificación génica o por un aumento de transcripción o traducción. La sobreexpresión de un receptor se puede determinar en un ensayo de diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de los niveles aumentados de la proteína receptora presente en la superficie de una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Además, o alternativamente, se pueden medir los niveles del ácido nucleico que codifica el receptor en las células, por ejemplo, mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH; véase el documento de Patente WO 98/45479), transferencia de southern, o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). La sobreexpresión del ligando del receptor se puede determinar de forma diagnóstica mediante la evaluación de los niveles del ligando (o del ácido nucleico que lo codifica) en el paciente, por ejemplo, en una biopsia del tumor o mediante diversos ensayos diagnósticos tales como los ensayos IHC, FISH, transferencia de southern, PCR o *in vivo* descritos anteriormente. También se puede estudiar la sobreexpresión del receptor mediante la medición del antígeno separado (por ejemplo, dominio extracelular de ErbB) en un fluido biológico tal como suero (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente US 4933294; WO 91/05264; US 5401638; y Sias *et al.* (1990) J. Immunol. Methods 132: 73-80). Además de los ensayos anteriores, están disponibles para el practicante experto otros diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una etiqueta detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y la unión del anticuerpo a las células del paciente se puede evaluar, por ejemplo, mediante un barrido externo de radiactividad o mediante el análisis de una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

La expresión "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{60}Co e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, planta o animal, incluyendo los análogos sintéticos y los derivados de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas con veneno de husillo, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores, e inhibidores de quinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen los compuestos usados en "terapia de fijación de diana" y quimioterapia convencional. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, N° CAS 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (N° CAS 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino(II), N° CAS 15663-27-1), carboplatino (N° CAS 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, N° CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetil-etanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), y doxorrubicina (ADRIAMYCIN®, Akti-1/2, HPPD, y rapamicina).

Más ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, documento de Patente WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semaphore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (exento de Cremophor), formulaciones de nanopartículas modificadas por ingeniería con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocadona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina,

carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enodiinos (por ejemplo, calicheamicina, calicheamicina gamma11, calicheamicina omega11 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enodiinos relacionados con cromoproteínas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; irógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactono; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzadores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico": (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM), que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®, citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide, y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de nucleósido de 1,3-dioxolano citosina); (iv) inhibidores de proteína quinasa tales como inhibidores de MEK (documento de Patente WO 2007/044515); (v) inhibidores de lípido quinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en proliferación celular aberrante, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras, tales como oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas tales como inhibidores de expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, y VAXID®, PROLEUKIN® rIL-2; inhibidores de topoisomerasa 1 tales como LURTOTECAN®, ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico" anticuerpos terapéuticos tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa), y el conjugado anticuerpo fármaco, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG®, Wyeth).

Algunos anticuerpos monoclonales humanizados con potencial terapéutico como agentes quimioterapéuticos junto con los inhibidores de PI3K de la invención incluyen: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, pertuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resvivizumab, rovelizumab, sibrotuzumab, sipilizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, trastuzumab,

tucotuzumab, celmoleuquina, tucosituzumab, umavizumab, urtoxazumab, y visilizumab.

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

"Alquilo" es hidrocarburo C_1-C_8 que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos. Algunos ejemplos de radicales alquilo incluyen, pero no se limitan a: metilo (Me, $-CH_3$), etilo (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, $-CH(CH_3)_2$), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, $-C(CH_3)_3$), 1-pentilo (n-pentilo, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-butilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-metil-1-butilo, ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-metil-1-butilo ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-hexilo ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-hexilo ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-hexilo ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-metil-2-pentilo ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-metil-2-pentilo ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-metil-3-pentilo ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-metil-3-pentilo ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-dimetil-2-butilo ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3-dimetil-2-butilo ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$).

El término "alqueno" se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a ocho átomos de carbono (C_2-C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono sp^2 , en el que el radical alqueno puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes que se describen en el presente documento, e incluye radicales que tienen orientaciones "cis" y "trans", o alternativamente, orientaciones "E" y "Z". Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, etileno o vinilo ($-CH=CH_2$), alilo ($-CH_2CH=CH_2$), y similares.

El término "alquino" se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada de dos a ocho átomos de carbono (C_2-C_8) con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace carbono-carbono sp , en el que el radical alquino puede estar opcionalmente sustituido independientemente con uno o más sustituyentes que se describen en el presente documento. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, etinilo ($-C\equiv CH$), propinilo (propargilo, $-CH_2C\equiv CH$), y similares.

Los términos "carbociclo", "carbociclilo", "anillo carbocíclico" y "cicloalquilo" se refieren a un anillo monovalente no aromático saturado o parcialmente insaturado que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (C_3-C_{12}) como anillo monocíclico o de 7 a 12 átomos de carbono como anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen de 7 a 12 átomos se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema bicíclico biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], y los carbociclos bicíclicos que tienen 9 o 10 átomos en el anillo se pueden disponer como un sistema bicíclico [5,6] o [6,6], o como sistemas con puente de tales como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano y biciclo[3.2.2]nonano. Algunos ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclononilo, ciclododecilo, cicloundecilo, ciclododecilo, y similares.

"Ariilo" significa un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono (C_6-C_{20}) derivado de la retirada de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono individual de un sistema de anillos aromático precursor. Algunos grupos ariilo se representan en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Ariilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático condensado con un anillo saturado o parcialmente insaturado, o un anillo carbocíclico aromático. Los grupos ariilo habituales incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de benceno (fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenilo, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo, y similares. Los grupos ariilo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes que se describen en el presente documento.

Los términos "heterociclo", "heterociclilo" y "anillo heterocíclico" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a un radical carbocíclico saturado o parcialmente insaturado (es decir, que tiene uno o más dobles y/o triples enlaces en el anillo) del 3 a 20 átomos en el anillo en el que al menos un átomo del anillo es un heteroátomo seleccionado entre nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, siendo los restantes átomos en el anillo C, donde uno o más átomos en el anillo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes que se describen posteriormente. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros en el anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 4 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros en el anillo (4 a 9 átomos de carbono y 1 a 6 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema bicíclico [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Se describen heterociclos en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente los capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 al presente), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19, y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "Heterociclilo" también incluye radicales donde los radicales heterociclo están condensados con un anillo saturado, o parcialmente insaturado, o un anillo carbocíclico o heterocíclico aromático. Algunos ejemplos de anillos heterociclilo incluyen, pero no se limitan a, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropirranilo, dihidropirranilo, tetrahidrotiopirranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tioxanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidino, oxetanilo,

- tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, ditianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinilimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo, azabicyclo[2.2.2]hexanilo, 3H-indolil quinolizínico y N-piridil ureas. También se incluyen restos espiránicos dentro del alcance de esta definición. Algunos ejemplos de un grupo heterocíclico en el que 2 átomos de carbono en el anillo están sustituidos con restos oxo (=O) son pirimidinonilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo. Los grupos heterociclo en el presente documento están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes que se describen en el presente documento.
- El término "heteroarilo" se refiere a un radical aromático monovalente de 5, 6, o 7 miembros en el anillo, e incluye sistemas de anillos condensados (al menos uno de los cuales es aromático) de 5-20 átomos, que contiene uno o más heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno, y azufre. Algunos ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (incluyendo, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (incluyendo, por ejemplo, 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, indolilo, benzoimidazolilo, benzofuranilo, cinolinilo, indazolilo, indolizínico, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, y furopiridinilo. Los grupos heteroarilo están opcionalmente sustituidos independientemente con uno o más sustituyentes que se describen en el presente documento.
- Los grupos heterociclo o heteroarilo pueden estar unidos por un carbono (unidos por carbono), o un nitrógeno (unidos por nitrógeno) cuando tal situación sea posible. A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos o heteroarilos unidos por carbono están unidos en la posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina, la posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina, la posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina, la posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina, la posición 2, 3, 4 o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol, la posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol, la posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol, la posición 2 o 3 de una aziridina, la posición 2, 3 o 4 de una azetidina, la posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de una quinolina o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 de una isoquinolina.
- A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos o heteroarilos unidos por nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, 1H-indazol, la posición 2 de un isoindol, o isoindolina, la posición 4 de una morfolina, y la posición 9 de un carbazol, o β -carbolina.
- "Conector" o "conexión" significa un resto químico que comprende un enlace covalente o una cadena de átomos que une covalentemente un anticuerpo a un resto de fármaco. En diversas realizaciones de Fórmula I, un conector se especifica como L. Las realizaciones de conector incluyen un radical divalente definido en el presente documento como Y^{1-x} .
- El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no ser superponibles con su pareja imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles con sus parejas imágenes especulares.
- El término "estereoisómeros" se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero difieren con respecto a disposición de los átomos o grupos en el espacio.
- "Diastereómero" se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen propiedades físicas diferentes, por ejemplo puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales, y reactividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden preparar con procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.
- "Enantiómeros" se refiere a los estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.
- Las definiciones y convenciones estereoquímicas que se usan en el presente documento sigue generalmente S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Numerosos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de hacer rotar el plano de la luz polarizada plana. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su centro o centros quirales. Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de la rotación de la luz polarizada plana por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto por que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también se puede denominar enantiómero, y una mezcla de tales isómeros se denomina a menudo mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o racemato, y se pueden producir cuando no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. La

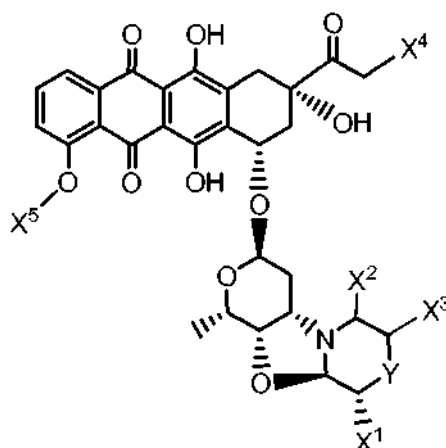
expresión "mezcla racémica" y el término "racemato" se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, desprovista de actividad óptica.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un ADC. Algunas sales a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan, las sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraion. El contraion puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabiliza la carga del compuesto precursor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

"Solvato farmacéuticamente aceptable" se refiere a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un ADC. Algunos ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético, y etanolamina.

METABOLITO DE NEMORRUBICINA Y RESTOS DE FÁRMACO ANÁLOGOS

El metabolito de nemorrubicina o los restos de fármaco análogos que se describen en el presente documento tienen una estructura:

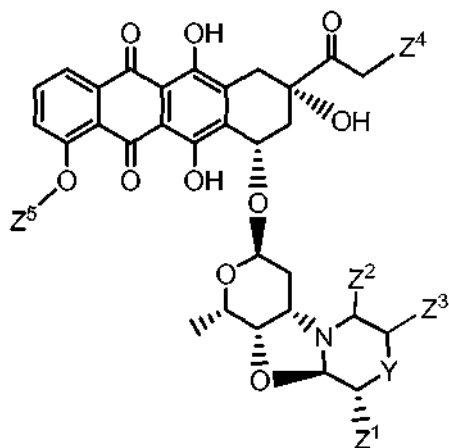


en la que Y es N-X⁶ u O; y el conector divalente, L, está unido a uno de X¹, X², X³, X⁴, X⁵, o X⁶. El conector también está unido covalentemente al anticuerpo de acuerdo con el conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula I.

El metabolito de nemorrubicina y los restos de fármaco análogos D incluyen todos los estereoisómeros, incluyendo enantiómeros, diastereómeros, atropisómeros, y mezcla racémicas, es decir cualquier combinación de las configuraciones R y S en los carbonos quirales de D.

REACTIVOS DE RESTO DE FÁRMACO

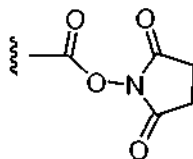
El metabolito de nemorrubicina y los reactivos de resto de fármaco análogo tienen generalmente la estructura:



en la que Y es N-X⁶ u O; y

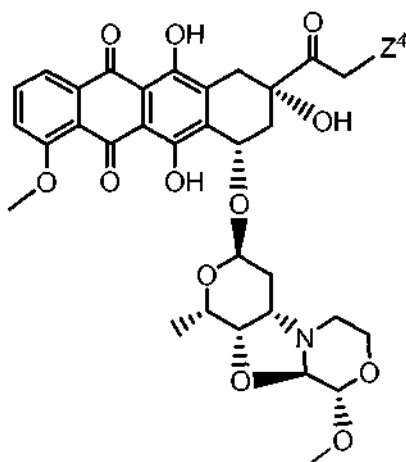
uno de Z¹, Z², Z³, Z⁴, Z⁵, o Z⁶ comprende un grupo funcional reactivo seleccionado entre maleimida, tiol, amino, bromuro de alquilo, yoduro de alquilo, carboxilo, y éster NHS.

Las realizaciones del grupo funcional reactivo incluyen NHR¹⁰, OH, SH, -CH₂CH₂SH, -CO₂H, y



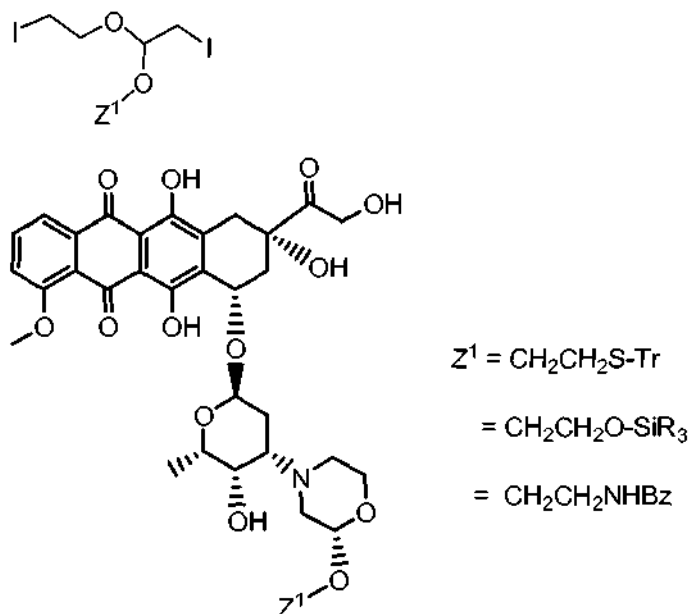
donde R¹⁰ es H, alquilo C₁-C₈, alquénilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, carbociclilo C₃-C₁₂, heterociclilo C₂-C₂₀, arilo C₆-C₂₀, o heteroarilo C₁-C₂₀, opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, I, -CH₂OH, CH₂C₆H₅, -CN, -CF₃, -CO₂H, -CONH₂, -CONHCH₃, -NO₂, -N(CH₃)₂, -NHCOCH₃, -NHS(O)₂CH₃, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -S(O)₂NH₂, y -S(O)₂CH₃.

Por lo tanto, los reactivos de resto de fármaco incluyen las estructuras:

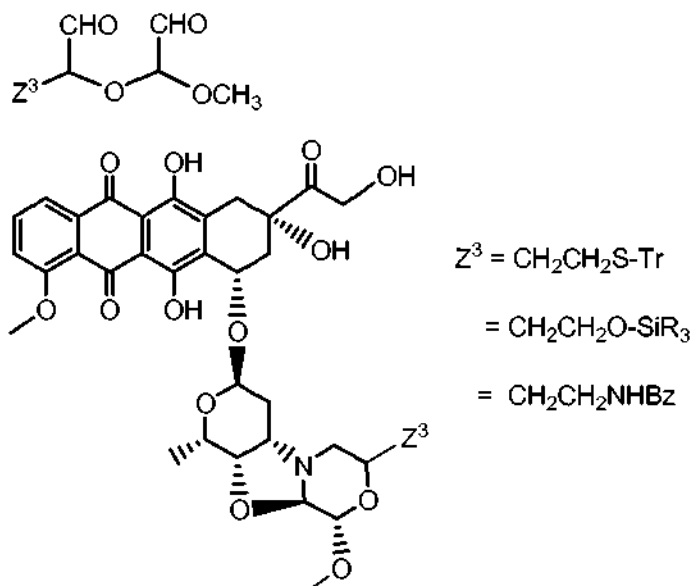


en la que Z⁴ comprende un grupo reactivo maleimida, o una forma protegida del grupo funcional del mismo.

El metabolito de nemorrubicina y los reactivos de resto de fármaco análogo se pueden preparar por ciclación de doxorubicina con 2-yodo-1-(2-yodoetoxi)-1-metoxietano, siguiendo los métodos de los documentos de Patente US 5304687 y WO 2005/005455. La ciclación de la doxorubicina con versiones funcionalizadas de 2-yodo-1-(2-yodoetoxi)-1-metoxietano permite análogos de nemorrubicina funcionalizados:

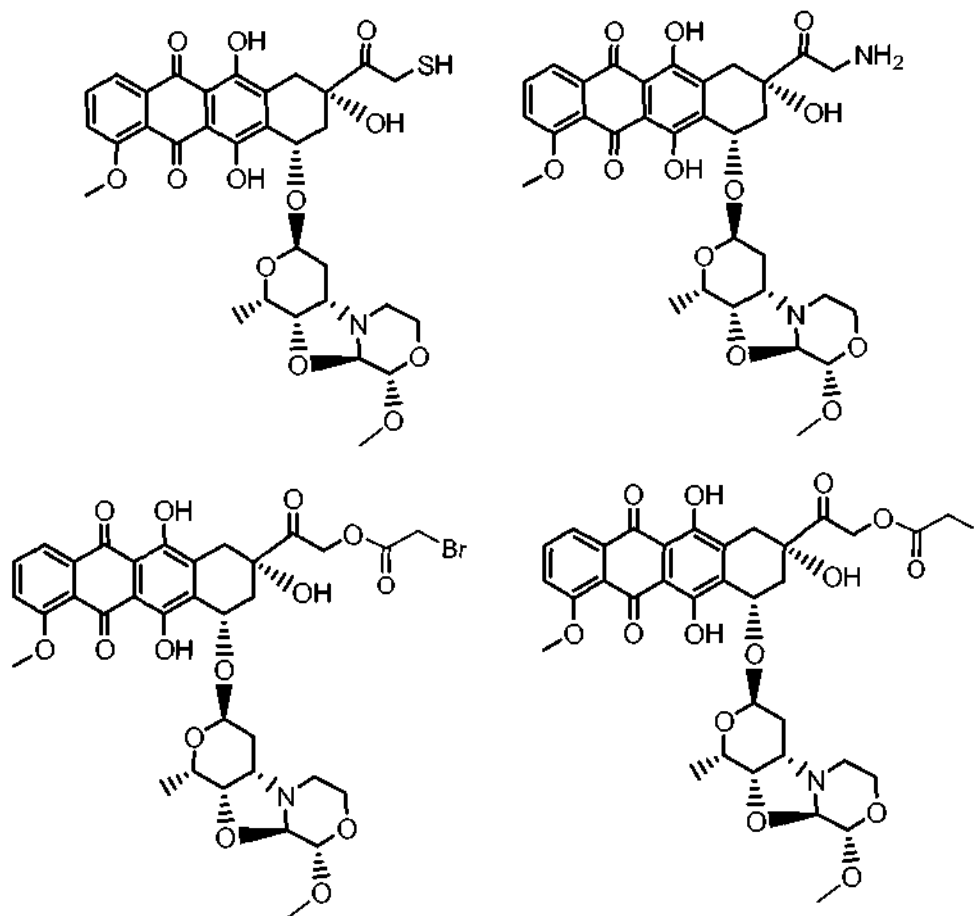


- 5 Los derivados con puente de oxígeno que tienen la subestructura 3'-desamino-3'',4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-oxi-4''-morfolinilo] de PNU(159682) se pueden preparar por alquilación reductora de doxorubicina con análogos funcionalizados del dialdehído, 2,2'-oxidiacetaldehído (documentos de Patente US 4826964; US 4672057; US 6630579).



- 10 La nemorubicina y otros análogos de morfolino doxorubicina también se pueden ciclar en la subestructura 3'-desamino-3'',4'-anhidro-[2''(S)-metoxi-3''(R)-oxi-4''-morfolinilo] de compuestos de tipo PNA (159682) mediante la formación del N-óxido con peróxido de hidrógeno (documento de Patente GB 2296495) y ciclación oxidativa con cloruro ferroso y un agente complejante de hierro, tal como ácido tartárico (documento de Patente EP 0889898).

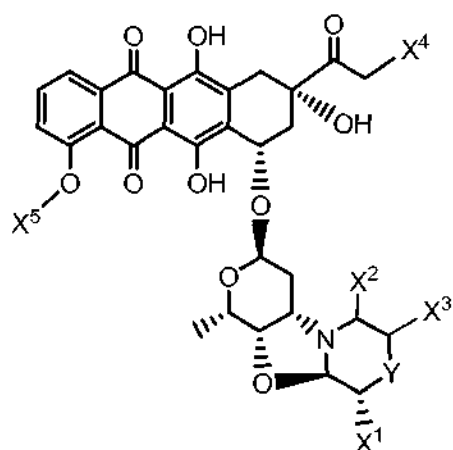
- 15 Los reactivos de resto de fármaco incluyen los compuestos:



REACTIVOS FÁRMACO-CONECTOR

5

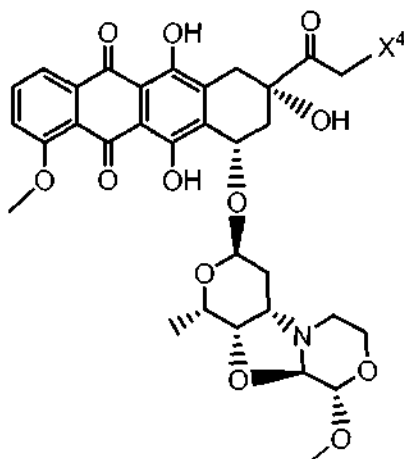
Los reactivos de fármaco-conector tienen generalmente la estructura:



10 en la que Y es N-X⁶, S, u O; y
 uno de X¹, X², X³, X⁴, X⁵, o X⁶ comprende un conector y un grupo funcional reactivo seleccionado entre un grupo maleimida, un grupo tiol, un grupo carboxilo, y un éster NHS.

15 Por lo tanto, los reactivos de fármaco-conector incluyen la estructura:

15



CONECTORES

- 5 El conector, L, une el anticuerpo al resto de fármaco a través de un enlace o enlaces covalentes. El conector es un resto difuncional o multifuncional que se puede usar para unir uno o más restos de fármaco (D) a una unidad de anticuerpo (Ab) para formar conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de Fórmula I. El conector (L) puede ser estable fuera de la célula, es decir extracelular, o puede ser escindible por la actividad enzimática, hidrólisis, u otras condiciones metabólicas. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) se pueden preparar convenientemente usando
- 10 un conector que tiene una funcionalidad reactiva para la unión al resto de fármaco y al anticuerpo. Un tiol de una cisteína, o una amina, por ejemplo N-terminal o una cadena lateral de aminoácido tal como lisina, del anticuerpo (Ab) puede formar un enlace con un grupo funcional de un reactivo conector, resto de fármaco (D) o reactivo de fármaco-conector (D-L).
- 15 Numerosas posiciones del metabolito de nemorrubicina y los compuestos análogos pueden ser útiles como la posición de unión, dependiendo del tipo de unión. Por ejemplo, se pueden formar uniones éster a partir de un grupo hidroxilo del resto de fármaco; se pueden formar uniones cetel e hidrazona a partir de un grupo carbonilo del resto de fármaco; se pueden formar uniones amida, carbamato, y urea a partir de un grupo amino del resto de fármaco; y se pueden formar diversas uniones alquilo, éster, tioéter, disulfuro y acilo a partir de los anillos fenilo y arilo del resto de fármaco mediante reacciones de alquilación y acilación de tipo Friedel-Crafts.
- 20

Las uniones son preferentemente estables extracelularmente. Antes del transporte o suministro a una célula, el conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) es preferentemente estable y permanece intacto, es decir, el anticuerpo permanece unido al resto de fármaco. Los conectores son estables fuera de la diana celular y se pueden escindir en

25 cierta cantidad eficaz en el interior de la célula. Un conector eficaz: (i) mantendrá las propiedades de unión específicas del anticuerpo; (ii) permitirá el suministro intracelular del conjugado o resto de fármaco; (iii) permanecerá estable e intacto, es decir, no se escindirá, hasta que el conjugado se haya suministrado o transportado a su sitio fijado como diana; y (iv) mantendrá el efecto citotóxico destructor de células o el efecto citostático del metabolito de nemorrubicina y el resto de fármaco análogo. La estabilidad del ADC se puede medir mediante técnicas analíticas convencionales tales como espectroscopía de masas, HPLC, y la técnica de separación/análisis LC/MS.

30

La unión covalente del anticuerpo y el resto de fármaco requiere que el conector tenga dos grupos funcionales reactivos, es decir divalencia en un sentido reactivo. Se conocen reactivos conectores divalentes que son útiles para unir dos o más restos funcionales o biológicamente activos, tales como péptidos, ácidos nucleicos, fármacos,

35 toxinas, anticuerpos, haptenos, y grupos indicadores, y métodos que han descrito sus conjugados resultantes (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: Nueva York, p 234-242).

En otra realización, el conector puede estar sustituido con grupos que modulan la solubilidad o reactividad. Por ejemplo, un sustituyente sulfonato puede aumentar la solubilidad en agua del reactivo y facilitar la reacción de acoplamiento del reactivo conector con el anticuerpo o el resto de fármaco, o facilitar la reacción de acoplamiento de Ab-L con D, o D-L con Ab, dependiendo de la ruta sintética empleada para preparar el ADC.

40

Los grupos nucleofílicos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino azúcar donde el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol, e hidroxilo son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos de los restos de conector y los reactivos de conector incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBT, haloformatos, y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo, y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros reducibles intercadena, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer

45

reactivos para la conjugación con reactivos de conector por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreititol). Cada puente de cisteína formará de ese modo, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleofílicos adicionales en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Se pueden introducir grupos tiol reactivos en el anticuerpo (o el fragmento del mismo) por introducción de uno, dos, tres, cuatro, o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos de aminoácido de cisteína no nativos). El documento de Patente US 2007/0092940 enseña la modificación por ingeniería de anticuerpos por introducción de aminoácidos cisteína reactivos.

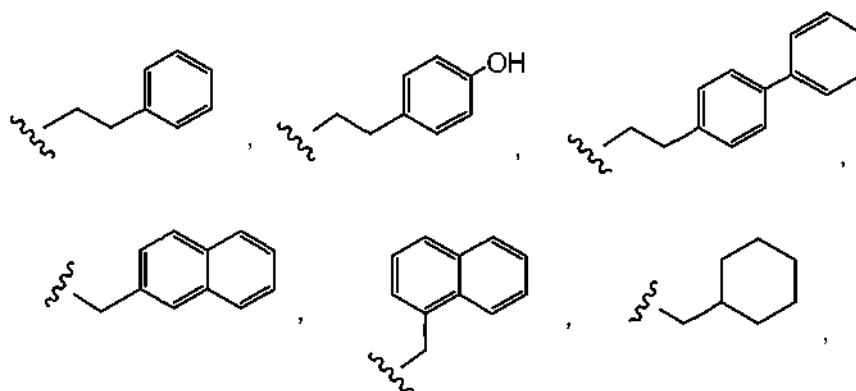
En algunas realizaciones, un conector tiene un grupo nucleofílico reactivo que es reactivo con un grupo electrofílico presente en un anticuerpo. Los grupos electrofílicos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los grupos carbonílicos aldehído y cetona. El heteroátomo de un grupo nucleofílico de un conector puede reaccionar con un grupo electrofílico de un anticuerpo y formar un enlace covalente con una unidad de anticuerpo. Algunos grupos nucleofílicos útiles en un conector incluyen, pero no se limitan a, hidrazida, oxima, amino, hidroxilo, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y arilhidrazida. El grupo electrofílico de un anticuerpo proporciona un sitio conveniente para la unión a un conector.

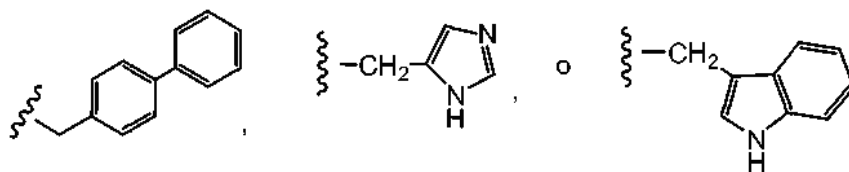
Los grupos nucleofílicos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos de los restos de conector y los reactivos de conector incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBT, haloformatos, y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo, y maleimida.

Los conectores pueden ser peptídicos, comprendiendo una o más unidades de aminoácido. Los reactivos de conector peptídico se pueden preparar mediante métodos de síntesis en fase sólida o fase líquida (E. Schröder y K. Lübke, *The Peptides*, volumen 1, pp 76-136 (1965) Academic Press) que se conocen bien en el campo de la química de péptidos, incluyendo química t-BOC (Geiser *et al.* "Automation of solid-phase peptide synthesis" en *Macromolecular Sequencing and Synthesis*, Alan R. Liss, Inc., 1988, pp. 199-218) y química Fmoc/HBTU (Fields, G. y Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids", *Int. J. Peptide Protein Res.* 35:161-214), en un sintetizador automatizado tal como el Sintetizador de Péptidos Rainin Symphony (Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ), o el Modelo 433 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Algunos conectores de aminoácido a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Algunos dipéptidos a modo de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Algunos tripéptidos a modo de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Algunos restos de aminoácido que comprenden un componente de conector de aminoácido incluyen los de origen natural, así como aminoácidos minoritarios y análogos de aminoácidos de origen natural, tales como citrulina. Los componentes de conector de aminoácido se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática mediante enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D, o una plasmina proteasa.

Las cadenas laterales de aminoácido incluyen las de origen natural, así como aminoácidos minoritarios y análogos de aminoácidos de origen natural, tales como citrulina. Algunas cadenas laterales de aminoácido incluyen hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo, así como las siguientes estructuras:

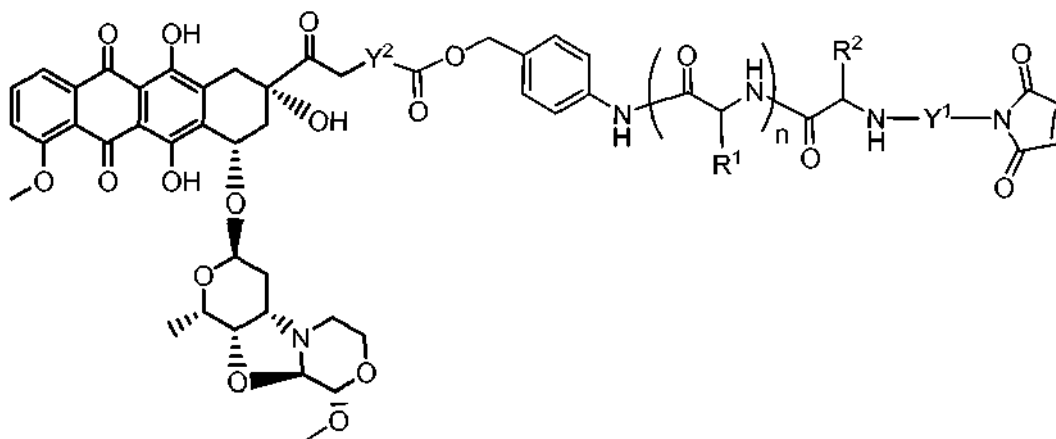




Cuando las cadenas laterales de aminoácido incluidas son distintas de hidrógeno (glicina), el átomo de carbono al que está unido la cadena lateral de aminoácido es quiral. Cada átomo de carbono de la cadena lateral de aminoácido unido está independientemente en la configuración (S) o (R), o una mezcla racémica. Los reactivos de fármaco-conector pueden ser de ese modo enantioméricamente puros, racémicos, o diastereoméricos.

En realizaciones a modo de ejemplo, las cadenas laterales de aminoácido se seleccionan entre las de aminoácidos naturales y naturales, incluyendo alanina, ácido 2-amino-2-ciclohexilacético, ácido 2-amino-2-fenilacético, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, norleucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, ácido γ -aminobutírico, ácido α,α -dimetil γ -aminobutírico, ácido β,β -dimetil γ -aminobutírico, ornitina, y citrulina (Cit).

Las realizaciones de reactivos fármaco-conector incluyen:



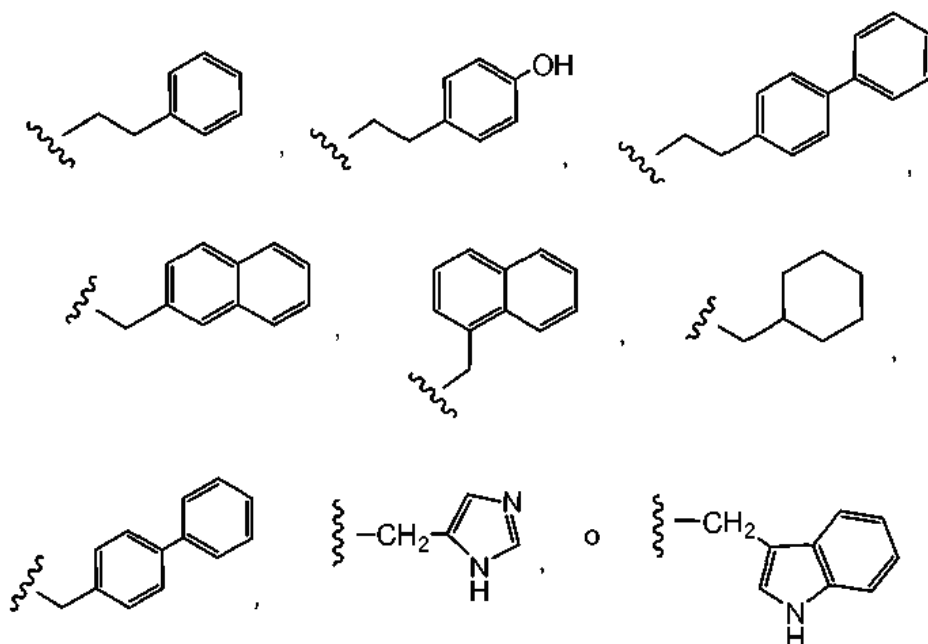
en la que

Y^1 es $C(O)(C(R^{10})_2)_q$, $(C(R^{10})_2)_q$, o $(C(R^{10})_2)_qO(C(R^{10})_2)_q$;

q es 2, 3, 4, 5 o 6.

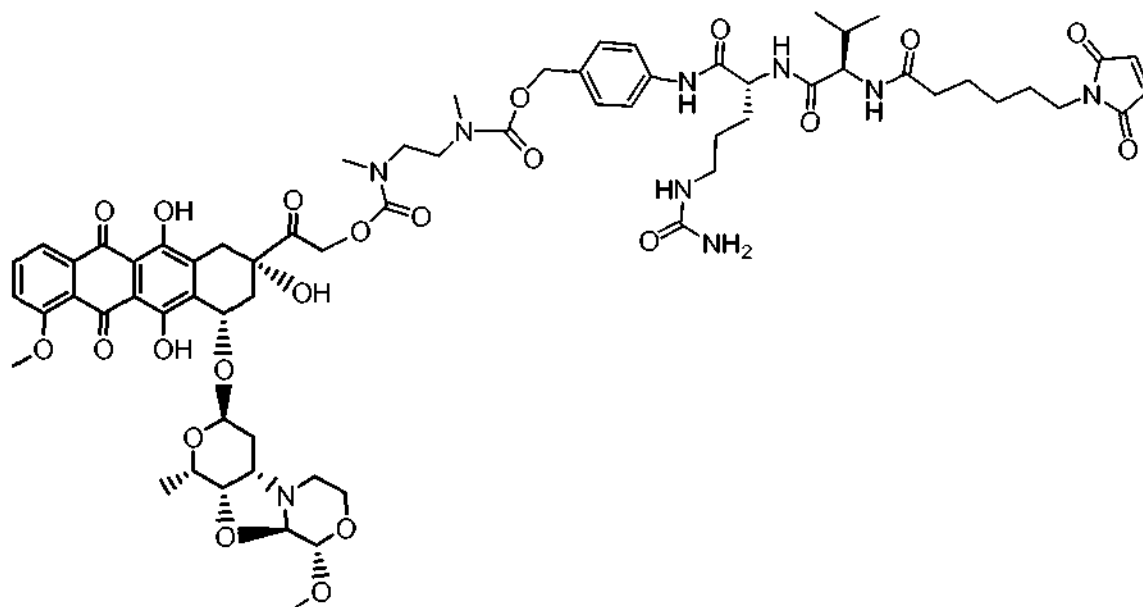
Y^2 es O, NR^{10} , S, $OC(O)NR^{10}$ -(alquil C_1 - C_6)- NR^{10} ;

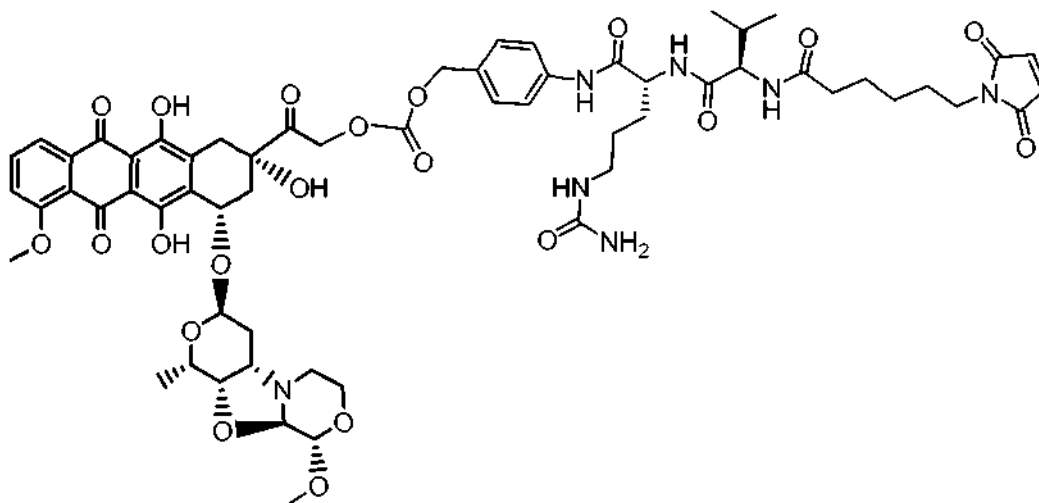
R^1 y R^2 son independientemente una cadena lateral de aminoácido seleccionada entre hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo, y las estructuras:



- 5 cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_8 , alqueno C_2-C_8 , alquino C_2-C_8 , carbociclilo C_3-C_{12} , heterociclilo C_2-C_{20} , arilo C_6-C_{20} , y heteroarilo C_1-C_{20} , opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, I, $-CH_2OH$, $-CH_2C_6H_5$, $-CN$, $-CF_3$, $-CO_2H$, $-CONH_2$, $-CONHCH_3$, $-NO_2$, $-N(CH_3)_2$, $-NHCOCH_3$, $-NHS(O)_2CH_3$, $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-S(O)_2NH_2$, y $-S(O)_2CH_3$;
y
n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7.

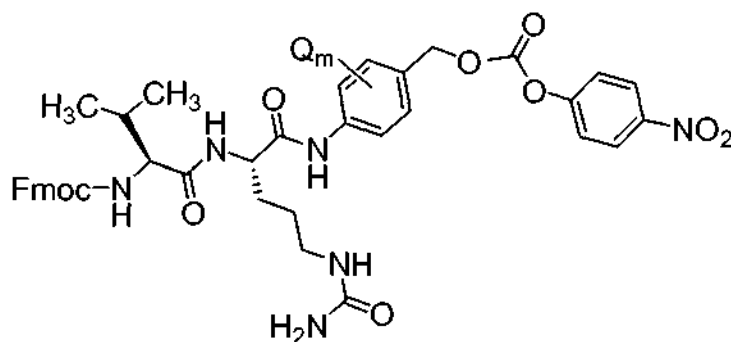
- 10 Las realizaciones de reactivos fármaco-conector incluyen:





REACTIVOS DE CONECTOR

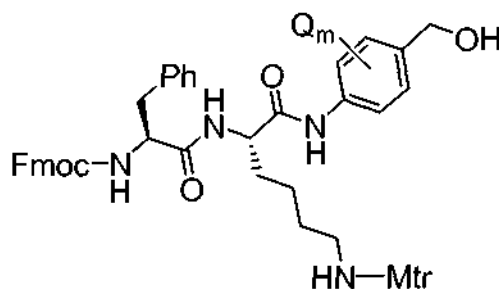
- 5 Los conectores de beta-glucurónido entre el anticuerpo y el resto de fármaco son sustratos para la escisión mediante beta-glucuronidasa (Jeffrey *et al.* (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:831-840; documento de Patente WO 2007/011968). La unión acetal del beta-glucurónido libera un hidroxilo fenólico en el anillo arilo, potenciando la "autoinmolación" y la 1,6-eliminación del grupo benciloxicarbonilo.
- 10 Un reactivo de conector de dipéptido valina-citrulina (val-cit o vc) a modo de ejemplo que tiene un extensor de maleimida y un espaciador autoinmolativo de para-aminobencilcarbamoilo (PAB) tiene la estructura:



- 15 donde Q es alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -NO₂ o -CN; y m es un número entero que varía de 0-4.

Un reactivo de conector de dipéptido phe-lys (Mtr) a modo de ejemplo que tiene una unidad extensora de maleimida y una unidad espaciadora autoinmolativa de p-aminobencil se puede preparar de acuerdo con Dubowchik, *et al.* (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:5257-60, y tienen la estructura:

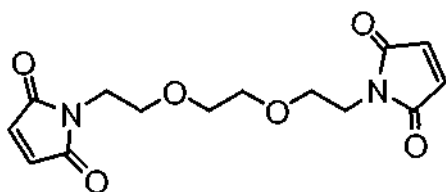
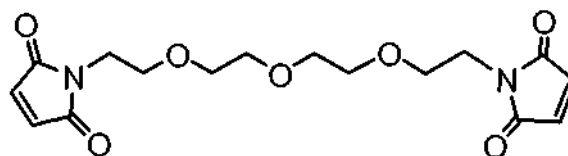
20



donde Mtr es mono-4-metoxitritilo, Q es alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -NO₂ o -CN; y m es un número entero que varía de 0-4.

El "espaciador autoinmolutivo", PABC o PAB (para-aminobenciloxycarbonilo), une el resto de fármaco al anticuerpo en el conjugado (Carl *et al.* (1981) J. Med. Chem. 24:479-480; Chakravarty *et al.* (1983) J. Med. Chem. 26:638-644; documentos de Patente US 6214345; US20030130189; US20030096743; US6759509; US20040052793; US6218519; US6835807; US6268488; US20040018194; WO98/13059; US20040052793; US6677435; US5621002; US20040121940; WO2004/032828). Otros ejemplos de espaciadores autoinmolutivos además de PAB incluyen, pero no se limitan a: (i) compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay *et al.* (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), tiazoles (documento de Patente US 2005/0256030), múltiples unidades de PAB elongadas (de Groot *et al.* (2001) J. Org. Chem. 66:8815-8830; y orto o para-aminobencilacetales; y (ii) análogos de estiril PAB homologados (documento de Patente US 7223837). Se pueden usar espaciadores que experimentan ciclación tras hidrólisis del enlace amida, tales como amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y sin sustituir (Rodrigues *et al.* (1995) Chemistry Biology 2:223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos de forma apropiada (Storm *et al.* (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropionico (Amsberry, *et al.* (1990) J. Org. Chem. 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la glicina (Kingsbury *et al.* (1984) J. Med. Chem. 27:1447) son también ejemplos de espaciadores autoinmolutivos útiles en ADC.

Algunos reactivos de conector útiles para los conjugados anticuerpo fármaco de la invención incluyen, pero no se limitan a: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), e incluyendo reactivos de bis-maleimida: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-bis-maleimidodietilenglicol (BM(PEO)₂), y 1,11-bis-maleimidotrietilenglicol (BM(PEO)₃), que están disponibles en el mercado en Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL, y otros proveedores de reactivos. Los reactivos de bis-maleimida permiten la unión de un grupo tiol libre de un resto de cisteína de un anticuerpo a un resto de fármaco, etiqueta, o compuesto intermedio de conector, que contiene tiol, de una forma secuencial o concurrente. Otros grupos funcionales además de maleimida, que son reactivos con un grupo tiol de un anticuerpo, metabolito de nemorubicina y resto de fármaco análogo, o compuesto intermedio de conector, incluyen yodoacetamida, bromoacetamida, vinil piridina, disulfuro, disulfuro de piridilo, isocianato, e isotiocianato.

BM(PEO)₂BM(PEO)₃

Otros reactivos de conector son: N-succinimidil-4-(2-piridil)pentanoato (SPP), N-succinimidil-3-(2-piridil)propionato (SPDP, Carlsson *et al.* (1978) Biochem. J. 173:723-737), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados difuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoyl) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato tolueno), y compuestos de bis-flúor activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Algunos reactivos de conector útiles también se pueden obtener a través de otras fuentes comerciales, tales como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o sintetizar de acuerdo con los procedimientos que se describen en Toki *et al.* (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; y los documentos de Patente US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; y WO 04/032828.

El conector puede ser un conector de tipo dendrítico para la unión covalente de más de un resto de fármaco a través de un resto de conector multifuncional ramificado a un anticuerpo (documentos de Patente US 2006/116422; US 2005/271615; de Groot *et al.* (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494; Amir *et al.* (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499; Shamis *et al.* (2004) J. Am. Chem. Soc. 126:1726-1731; Sun *et al.* (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun *et al.* (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King *et al.* (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990). Los conectores dendríticos pueden aumentar la proporción molar de fármaco con respecto a anticuerpo, es decir, la carga, que está relacionada con la potencia del ADC. De ese modo, cuando un anticuerpo porta únicamente un grupo tiol de cisteína reactivo, se puede unir una multitud de restos de fármaco a través de un conector dendrítico o ramificado.

ANTICUERPOS

La unidad de anticuerpo (Ab) de Fórmula I incluye cualquier unidad, tipo, o clase de anticuerpo que se une o asocia reactivamente o forma un complejo con un receptor, antígeno u otro resto receptor asociado a una población de células diana dada. Un anticuerpo puede ser cualquier proteína o molécula de tipo proteína que se une a, forma un complejo, o reacciona con, un resto de una población de células que se busca que sea modificada terapéuticamente o biológicamente de otro modo. En un aspecto, la unidad de anticuerpo actúa para suministrar el metabolito de nemorubicina y el resto de fármaco análogo a la población de células diana particular con la que la unidad de anticuerpo reacciona. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, proteínas de gran peso molecular, tales como anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos de Fórmula I permiten alcanzar altas concentraciones de moléculas de metabolito activo en células cancerígenas. La fijación de diana intracelular se puede conseguir mediante métodos y compuestos que permiten la acumulación o retención de agentes biológicamente activos en el interior de las células. Tal fijación de diana eficaz puede ser aplicable a diversas formulaciones y procedimientos terapéuticos.

En una realización, el ADC se une específicamente a un receptor codificado por un gen ErbB, tal como EGFR, HER2, HER3 y HER4. El ADC se puede unir específicamente al dominio extracelular del receptor HER2. El ADC puede inhibir el crecimiento de células tumorales que sobreexpresan del receptor HER2.

En otra realización, el anticuerpo (Ab) de Fórmula I es un anticuerpo humanizado tal como huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 o huMAb4D5-8 (trastuzumab).

Los anticuerpos de la intervención incluyen anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína donde uno o más aminoácidos de cualquier forma de anticuerpo de tipo silvestre o precursor están reemplazados con un aminoácido cisteína. El aminoácido cisteína modificado por ingeniería es un aminoácido cisteína libre y no es parte de una unidad de disulfuro intracadena o intercadena. Cualquier forma, tipo, o variante de anticuerpo se puede modificar de ese modo por ingeniería, es decir, mutar. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo Fab precursor se puede modificar por ingeniería para formar un Fab modificado por ingeniería con cisteína, denominado en el presente documento "TioFab". De forma análoga, un anticuerpo monoclonal precursor se puede modificar por ingeniería para formar un "TioMab". Se debería observar que una mutación de sitio individual proporciona un resto de cisteína modificado por ingeniería individual en un TioFab, mientras que una mutación de sitio individual proporciona dos restos de cisteína modificados por ingeniería en un TioMab, debido a la naturaleza dimérica del anticuerpo IgG. Los anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína de la invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, polipéptidos de fusión y análogos que se unen preferentemente a polipéptidos asociados a células.

Los anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína se han diseñado como fragmentos de anticuerpo Fab (TioFab) y se expresan como anticuerpos IgG monoclonales de longitud completa (TioMab) (documento de Patente US 2007/0092940). Los anticuerpos TioFab y TioMab se han conjugado a través de conectores en los tioles de cisteína recién introducidos con reactivos conectores y reactivos de fármaco-conector reactivos frente a tiol para preparar conjugados anticuerpos fármaco (Tio ADC).

Los anticuerpos que comprenden los conjugados anticuerpos-fármaco de la invención retienen preferentemente la capacidad de unión a antígeno de sus homólogos de tipo salvaje nativos. De ese modo, los anticuerpos de la invención son capaces de unirse, preferentemente de forma específica, a antígenos. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, antígenos asociados a tumor (TAA), proteínas receptoras de la superficie celular y otras moléculas de superficie celular, factores reguladores de la supervivencia celular, factores reguladores de la proliferación celular, moléculas asociadas (por ejemplo, por que se conoce o sospecha que contribuyen funcionalmente) al desarrollo o diferenciación tisular, linfocinas, citoquinas, moléculas implicadas en la regulación del ciclo celular, moléculas implicadas en vasculogénesis y moléculas asociadas (por ejemplo, por que se conoce o sospecha que contribuyen funcionalmente) a angiogénesis. El antígeno asociado a tumor puede ser un factor de cúmulo de diferenciación (es decir, una proteína CD). Un antígeno al que se puede unir un anticuerpo de la invención puede ser un miembro de un subconjunto de una de las categorías mencionadas anteriormente, en el que los demás subconjuntos de dicha categoría comprenden otras moléculas/antígenos que tienen características distintas (con respecto al antígeno de interés).

En una realización, el anticuerpo de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) se une específicamente a un receptor codificado por un gen ErbB. El anticuerpo se puede unir específicamente a un receptor ErbB seleccionado entre EGFR, HER2, HER3 y HER4. El ADC se puede unir específicamente al dominio extracelular (ECD) del receptor HER2 e inhibir el crecimiento de las células tumorales que sobreexpresan el receptor HER2. El anticuerpo del ADC puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo un anticuerpo monoclonal murino, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo humanizado puede ser huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 o huMAb4D5-8 (trastuzumab). El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fab.

Los anticuerpos en los conjugados anticuerpo-fármaco (APC) de Fórmula I y que son útiles en el tratamiento de cáncer incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos frente a receptores de la superficie celular y antígenos asociados a tumor (TAA). Tales antígenos asociados a tumor se conocen en la técnica, y se pueden preparar para su uso en generar anticuerpos usando métodos e información que se conocen bien en la técnica. En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana o de otro modo asociados a tumor que se expresen de forma específica en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerígenas en comparación con una o más células normales no cancerígenas. A menudo, los polipéptidos asociados a tumor se expresan de forma más abundante en la superficie de las células cancerígenas en comparación con la superficie de las células no cancerígenas. La identificación de tales polipéptidos antígeno de la superficie celular asociados a tumor ha dado lugar a la capacidad de fijar como diana de forma específica células cancerígenas para su destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos.

Algunos ejemplos de TAA incluyen, pero no se limitan a, los antígenos asociados a tumor (1)-(36) enumerados a continuación. Por conveniencia, la información que se refiere a estos antígenos, toda cual se conoce en la técnica, se enumera posteriormente e incluye nombres, nombres alternativos, números de referencia de Genbank y referencias principales, seguido de las convenciones de identificación de secuencias de ácidos nucleico y proteína del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias de ácido nucleico y proteína que corresponden a TAA (1)-(36) están disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank. Los antígenos asociados a tumor fijados como diana por anticuerpos incluyen todas las variantes e isoformas de la secuencia de aminoácidos que poseen al menos aproximadamente un 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % de identidad de secuencia con respecto a las secuencias identificadas en las referencias citadas, o que exhiben básicamente las mismas propiedades o características biológicas que un TAA que tiene una secuencia que se encuentra en las referencias citadas. Por ejemplo, un TAA que tiene una secuencia variante generalmente es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo que se une específicamente al TAA con la secuencia enumerada correspondiente.

ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR (1)-(36):

(1) BMPR1B (receptor de tipo IB de proteína morfogénica ósea, N° de referencia de Genbank NM_001203); ten Dijke, P., *et al.* Science 264 (5155):101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997); Patente WO2004063362 (Reivindicación 2); Patente WO2003042661 (Reivindicación 12); Patente US2003134790-A1 (Página 38-39); Patente WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 296); Patente WO2003055443 (Páginas 91-92); Patente WO200299122 (Ejemplo 2; Páginas 528-530); Patente WO2003029421 (Reivindicación 6); Patente WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 112); Patente WO200298358 (Reivindicación 1; Página 183); Patente WO200254940 (Páginas 100-101); Patente WO200259377 (Páginas 349-350); Patente WO200230268 (Reivindicación 27; Página 376); Patente WO200148204 (Ejemplo; Fig 4); receptor de tipo IB de proteína morfogénica ósea NP_001194 /pid = NP_001194.1; Referencias cruzadas: MIM:603248; NP_001194.1; AY065994;

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, N° de referencia de Genbank NM_003486); Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., *et al.* (1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273; Patente WO2004048938 (Ejemplo 2); Patente WO2004032842 (Ejemplo IV); Patente WO2003042661 (Reivindicación 12); Patente WO2003016475 (Reivindicación 1); Patente WO200278524 (Ejemplo 2); Patente WO200299074 (Reivindicación 19; Páginas 127-129); Patente WO200286443 (Reivindicación 27; Páginas 222, 393); Patente WO2003003906 (Reivindicación 10; Página 293); Patente WO200264798 (Reivindicación 33; Páginas 93-95); Patente WO200014228 (Reivindicación 5; Páginas 133-136); Patente US2003224454 (Fig 3); Patente WO2003025138 (Reivindicación 12; Página 150); Patente US 20050107595; Patente US 20050106644; familia de vehículo soluto 7 NP_003477 (transportador de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 5 /pid = NP_003477.3 -*Homo sapiens*; Referencias cruzadas: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1;

(3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata, N° de referencia de Genbank NM_012449); Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (25):14523-14528; Patente WO2004065577 (Reivindicación 6); Patente WO2004027049 (Fig 1L); Patente EP1394274 (Ejemplo 11); Patente WO2004016225 (Reivindicación 2); Patente WO2003042661 (Reivindicación 12); Patente US2003157089 (Ejemplo 5); Patente US2003185830 (Ejemplo 5); Patente US2003064397 (Fig 2); Patente WO200289747 (Ejemplo 5; Páginas 618-619); Patente WO2003022995 (Ejemplo 9; Fig 13A, Ejemplo 53; Página 173, Ejemplo 2; Fig 2A); antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata NP_036581; Referencias cruzadas: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1;

(4) 0772P (CA125, MUC16, N° de referencia de Genbank AF361486); J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001); Patente WO2004045553 (Reivindicación 14); Patente WO200292836 (Reivindicación 6; Fig 12); Patente WO200283866 (Reivindicación 15; Páginas 116-121); Patente US2003124140 (Ejemplo 16); Patente US2003091580 (Reivindicación 6); Patente WO200206317 (Reivindicación 6; Páginas 400-408); Referencias cruzadas: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486_1;

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina, N° de referencia de Genbank NM_005823); Yamaguchi, N., *et al.* Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995); Patente WO2003101283 (Reivindicación 14); (Patente WO2002102235 (Reivindicación 13; Páginas 287-288); Patente WO2002101075 (Reivindicación 4; Páginas 308-309); Patente WO200271928 (Páginas 320-321); Patente WO9410312 (Páginas 52-57); Referencias cruzadas: MIM:601051; NP_005814.2;

NM_005823_1;

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPT1b, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b, N° de referencia de Genbank NM_006424); J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., *et al.* (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582; Patente WO2004022778 (Reivindicación 2); EP1394274 (Ejemplo 11); WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 326); Patente EP875569 (Reivindicación 1; Páginas 17-19); Patente WO200157188 (Reivindicación 20; Página 329); Patente WO2004032842 (Ejemplo IV); Patente WO200175177 (Reivindicación 24; Páginas 139-140); Referencias cruzadas: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1.

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B, N° de referencia de Genbank AB040878); Nagase T., *et al.* (2000) DNA Res. 7 (2):143-150; Patente WO2004000997 (Reivindicación 1); Patente WO2003003984 (Reivindicación 1); Patente WO200206339 (Reivindicación 1; Página 50); Patente WO200188133 (Reivindicación 1; Páginas 41-43, 48-58); Patente WO2003054152 (Reivindicación 20); Patente WO2003101400 (Reivindicación 11); Referencia: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12, N° de referencia de Genbank AY358628); Ross *et al.* (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; Patente US2003129192 (Reivindicación 2); Patente US2004044180 (Reivindicación 12); Patente US2004044179 (Reivindicación 11); Patente US2003096961 (Reivindicación 11); Patente US2003232056 (Ejemplo 5); Patente WO2003105758 (Reivindicación 12); Patente US2003206918 (Ejemplo 5); EP1347046 (Reivindicación 1); Patente WO2003025148 (Reivindicación 20); Referencias cruzadas: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1;

(9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B, N° de referencia de Genbank AY275463); Nakamuta M., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., *et al.* Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., *et al.* J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., *et al.* J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., *et al.* J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., *et al.* Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C., *et al.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., *et al.* Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., *et al.* Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., *et al.* Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., *et al.* Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., *et al.* Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., *et al.* Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., *et al.* Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., *et al.* Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., *et al.* Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., *et al.* Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., *et al.* (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; Patente WO2004045516 (Reivindicación 1); Patente WO2004048938 (Ejemplo 2); Patente WO2004040000 (Reivindicación 151); Patente WO2003087768 (Reivindicación 1); Patente WO2003016475 (Reivindicación 1); Patente WO2003016475 (Reivindicación 1); Patente WO200261087 (Fig 1); Patente WO2003016494 (Fig 6); Patente WO2003025138 (Reivindicación 12; Página 144); Patente WO200198351 (Reivindicación 1; Páginas 124-125); Patente EP522868 (Reivindicación 8; Fig 2); Patente WO200177172 (Reivindicación 1; Páginas 297-299); Patente US2003109676; Patente US6518404 (Fig 3); Patente US5773223 (Reivindicación 1a; Col 31-34); Patente WO2004001004;

(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315, N° de referencia de Genbank NM_017763); Patente WO2003104275 (Reivindicación 1); Patente WO2004046342 (Ejemplo 2); Patente WO2003042661 (Reivindicación 12); Patente WO2003083074 (Reivindicación 14; Página 61); Patente WO2003018621 (Reivindicación 1); Patente WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 93); Patente WO200166689 (Ejemplo 6); Referencias cruzadas: LocusID:54894; NP_060233.2; NM_017763_1;

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana, N° de referencia de Genbank AF455138); Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002); Patente WO2003087306; Patente US2003064397 (Reivindicación 1; Fig 1); Patente WO200272596 (Reivindicación 13; Páginas 54-55); Patente WO200172962 (Reivindicación 1; Fig 4B); Patente WO2003104270 (Reivindicación 11); Patente WO2003104270 (Reivindicación 16); Patente US2004005598 (Reivindicación 22); Patente WO2003042661 (Reivindicación 12); Patente US2003060612 (Reivindicación 12; Fig 10); Patente WO200226822 (Reivindicación 23; Fig 2); Patente WO200216429 (Reivindicación 12; Fig 10); Referencias cruzadas: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138_1;

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico de potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4, N° de referencia de Genbank NM_017636); Xu, X.Z., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003); Patente US2003143557 (Reivindicación 4); Patente WO200040614 (Reivindicación 14; Páginas 100-103); Patente WO200210382 (Reivindicación 1; Fig 9A); Patente WO2003042661 (Reivindicación 12); Patente WO200230268 (Reivindicación 27; Página 391); Patente US2003219806 (Reivindicación 4); Patente WO200162794 (Reivindicación 14; Fig 1A-D); Referencias cruzadas: MIM:606936; NP_060106.2; NM_017636_1;

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor decrecimiento derivado de teratocarcinoma, N° de referencia de Genbank NP_003203 o NM_003212); Ciccociola, A., *et al.* EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991); Patente US2003224411 (Reivindicación 1); Patente WO2003083041 (Ejemplo 1); Patente WO2003034984 (Reivindicación 12); Patente WO200288170 (Reivindicación 2; Páginas 52-53); Patente WO2003024392 (Reivindicación 2; Fig 58); Patente WO200216413 (Reivindicación 1; Páginas 94-

95, 105); Patente WO200222808 (Reivindicación 2; Fig 1); Patente US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); Patente US5792616 (Fig 2); Referencias cruzadas: MIM:187395; NP_003203.1; NM_003212_1;

(14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento 2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs. 73792, N° de referencia de Genbank M26004); Fujisaku *et al.* (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125; Weis J.J., *et al.* J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987; Barel M., *et al.* Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., *et al.* (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; Patente WO2004045520 (Ejemplo 4); Patente US2004005538 (Ejemplo 1); Patente WO2003062401 (Reivindicación 9); Patente WO2004045520 (Ejemplo 4); Patente WO9102536 (Fig 9.1-9.9); Patente WO2004020595 (Reivindicación 1); Referencia: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1;

(15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (asociado a inmunoglobulina beta), B29, N° de referencia de Genbank NM_000626 o 11038674); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller *et al.* (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625; Patente WO2004016225 (reivindicación 2, Fig 140); Patente WO2003087768, Patente US2004101874 (reivindicación 1, página 102); Patente WO2003062401 (reivindicación 9); Patente WO200278524 (Ejemplo 2); Patente US2002150573 (reivindicación 5, página 15); Patente US5644033; Patente WO2003048202 (reivindicación 1, páginas 306 y 309); Patente WO 99/558658, Patente US6534482 (reivindicación 13, Fig 17A/B); Patente WO200055351 (reivindicación 11, páginas 1145-1146); Referencias cruzadas: MIM:147245; NP_000617.1; NM_000626_1;

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje a fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C, N° de referencia de Genbank NM_030764, AY358130); Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., *et al.* (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; Patente WO2004016225 (Reivindicación 2); Patente WO2003077836; Patente WO200138490 (Reivindicación 5; Fig 18D-1-18D-2); Patente WO2003097803 (Reivindicación 12); Patente WO2003089624 (Reivindicación 25); Referencias cruzadas: MIM:606509; NP_110391.2; NM_030764_1;

(17) HER2 (ErbB2, N° de referencia de Genbank M11730); Coussens L., *et al.* Science (1985) 230(4730):1132-1139; Yamamoto T., *et al.* Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., *et al.* J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., *et al.* J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., *et al.* Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., *et al.* (1993) Genomics 15, 426-429; Patente WO2004048938 (Ejemplo 2); Patente WO2004027049 (Fig 1I); Patente WO2004009622; Patente WO2003081210; Patente WO2003089904 (Reivindicación 9); Patente WO2003016475 (Reivindicación 1); Patente US2003118592; Patente WO2003008537 (Reivindicación 1); Patente WO2003055439 (Reivindicación 29; Fig 1A-B); Patente WO2003025228 (Reivindicación 37; Fig 5C); Patente WO200222636 (Ejemplo 13; Páginas 95-107); Patente WO200212341 (Reivindicación 68; Fig 7); Patente WO200213847 (Páginas 71-74); Patente WO200214503 (Páginas 114-117); Patente WO200153463 (Reivindicación 2; Páginas 41-46); Patente WO200141787 (Página 15); Patente WO200044899 (Reivindicación 52; Fig 7); Patente WO200020579 (Reivindicación 3; Fig 2); Patente US5869445 (Reivindicación 3; Col 31-38); Patente WO9630514 (Reivindicación 2; Páginas 56-61); Patente EP1439393 (Reivindicación 7); Patente WO2004043361 (Reivindicación 7); Patente WO2004022709; Patente WO200100244 (Ejemplo 3; Fig 4); Referencia: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1;

(18) NCA (CEACAM6, N° de referencia de Genbank M18728); Barnett T., *et al.* Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002; Patente WO2004063709; Patente EP1439393 (Reivindicación 7); Patente WO2004044178 (Ejemplo 4); Patente WO2004031238; Patente WO2003042661 (Reivindicación 12); Patente WO200278524 (Ejemplo 2); Patente WO200286443 (Reivindicación 27; Página 427); Patente WO200260317 (Reivindicación 2); Referencia: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;

(19) MDP (DPEP1, N° de referencia de Genbank BC017023); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002); Patente WO2003016475 (Reivindicación 1); Patente WO200264798 (Reivindicación 33; Páginas 85-87); JP05003790 (Fig 6-8); Patente WO9946284 (Fig 9); Referencias cruzadas: MIM: 179780; AAH17023.1; BC017023_1;

(20) IL20Rα (IL20Ra, ZCYTOR7, N° de referencia de Genbank AF184971); Clark H.F., *et al.* Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., *et al.* Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., *et al.* Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., *et al.* J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., *et al.* J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., *et al.* (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., *et al.* (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; EP1394274 (Ejemplo 11); Patente US2004005320 (Ejemplo 5); Patente WO2003029262 (Páginas 74-75); Patente WO2003002717 (Reivindicación 2; Página 63); Patente WO200222153 (Páginas 45-47); Patente US2002042366 (Páginas 20-21); Patente WO200146261 (Páginas 57-59); Patente WO200146232 (Páginas 63-65); Patente WO9837193 (Reivindicación 1; Páginas 55-59); Referencia: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1;

(21) Brevican (BCAN, BEHAB, N° de referencia de Genbank AF229053); Gary S.C., *et al.* Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., *et al.* Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Patente US2003186372 (Reivindicación 11); Patente US2003186373 (Reivindicación 11); Patente US2003119131 (Reivindicación 1; Fig 52); Patente US2003119122 (Reivindicación 1; Fig 52); Patente US2003119126 (Reivindicación 1); Patente US2003119121 (Reivindicación 1; Fig 52); Patente US2003119129 (Reivindicación 1); Patente US2003119130 (Reivindicación 1); Patente US2003119128 (Reivindicación 1; Fig 52); Patente US2003119125 (Reivindicación 1); Patente WO2003016475 (Reivindicación

1); Patente WO200202634 (Reivindicación 1);
 (22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, N° de referencia de Genbank NM_004442); Chan, J. y Watt, V.M.,
 Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998),
 Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); Patente WO2003042661 (Reivindicación 12); Patente WO200053216
 5 (Reivindicación 1; Página 41); Patente WO2004065576 (Reivindicación 1); Patente WO2004020583
 (Reivindicación 9); Patente WO2003004529 (Páginas 128-132); Patente WO200053216 (Reivindicación 1;
 Página 42); Referencias cruzadas: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1;
 (23) ASLG659 (B7h, N° de referencia de Genbank AX092328); Patente US20040101899 (Reivindicación 2);
 Patente WO2003104399 (Reivindicación 11); Patente WO2004000221 (Fig 3); Patente US2003165504
 10 (Reivindicación 1); Patente US2003124140 (Ejemplo 2); Patente US2003065143 (Fig 60); Patente
 WO2002102235 (Reivindicación 13; Página 299); Patente US2003091580 (Ejemplo 2); Patente WO200210187
 (Reivindicación 6; Fig 10); Patente WO200194641 (Reivindicación 12; Fig 7b); Patente WO200202624
 (Reivindicación 13; Fig 1A-1B); Patente US2002034749 (Reivindicación 54; Páginas 45-46); Patente
 WO200206317 (Ejemplo 2; Páginas 320-321, Reivindicación 34; Páginas 321-322); Patente WO200271928
 15 (Páginas 468-469); Patente WO200202587 (Ejemplo 1; Fig 1); Patente WO200140269 (Ejemplo 3; Páginas 190-
 192); Patente WO200036107 (Ejemplo 2; Páginas 205-207); Patente WO2004053079 (Reivindicación 12);
 Patente WO2003004989 (Reivindicación 1); Patente WO200271928 (Páginas 233-234, 452-453); Patente WO
 0116318;
 (24) PSCA (precursor de antígeno de célula madre de próstata, N° de referencia de Genbank AJ297436); Reiter
 20 R.E., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., *et al.* Oncogene 19, 1288-1296, 2000;
 Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; Patente WO2004022709; Patente EP1394274
 (Ejemplo 11); Patente US2004018553 (Reivindicación 17); Patente WO2003008537 (Reivindicación 1); Patente
 WO200281646 (Reivindicación 1; Página 164); Patente WO2003003906 (Reivindicación 10; Página 288);
 Patente WO200140309 (Ejemplo 1; Fig 17); Patente US2001055751 (Ejemplo 1; Fig 1b); Patente WO200032752
 25 (Reivindicación 18; Fig 1); Patente WO9851805 (Reivindicación 17; Página 97); Patente WO9851824
 (Reivindicación 10; Página 94); Patente WO9840403 (Reivindicación 2; Fig 1B); Referencia: 043653; EMBL;
 AF043498; AAC39607.1;
 (25) GEDA (N° de referencia de Genbank AY260763); proteína de tipo compañero de fusión HMGIC de lipoma
 AAP14954 /pid = AAP14954.1 *Homo sapiens* (ser humano); Patente WO2003054152 (Reivindicación 20);
 30 Patente WO2003000842 (Reivindicación 1); Patente WO2003023013 (Ejemplo 3, Reivindicación 20); Patente
 US2003194704 (Reivindicación 45); Referencias cruzadas: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763_1;
 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor BLyS 3, BR3, N° de referencia de
 Genbank AF116456); receptor BAFF /pid = NP_443177.1 - *Homo sapiens*; Thompson, J.S., *et al.* Science 293
 (5537), 2108-2111 (2001); Patente WO2004058309; Patente WO2004011611; Patente WO2003045422
 35 (Ejemplo; Páginas 32-33); Patente WO2003014294 (Reivindicación 35; Fig 6B); Patente WO2003035846
 (Reivindicación 70; Páginas 615-616); Patente WO200294852 (Col 136-137); Patente WO200238766
 (Reivindicación 3; Página 133); Patente WO200224909 (Ejemplo 3; Fig 3); Referencias cruzadas: MIM:606269;
 NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600;
 (27) CD22 (isoforma del receptor de linfocitos B CD22-B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, N° de
 40 referencia de Genbank AK026467); Wilson *et al.* (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; Patente WO2003072036
 (Reivindicación 1; Fig 1); Referencias cruzadas: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1;
 (28) CD79a (CD79A, CD79α, asociado a inmunoglobulina alfa, una proteína específica de linfocitos B que
 interactúa covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con moléculas de IgM,
 transduce una señal implicada en la diferenciación de linfocitos B); 226 aa, pl: 4.84, Pm: 25028 TM: Cromosoma
 45 Génico 2 [P]: 19q13.2, N° de referencia de Genbank NP_001774.10; Patente WO2003088808, Patente
 US20030228319; Patente WO2003062401 (reivindicación 9); Patente US2002150573 (reivindicación 4, páginas
 13-14); Patente WO9958658 (reivindicación 13, Fig 16); Patente WO9207574 (Fig 1); Patente US5644033; Ha *et al.*
 (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Mueller *et al.* (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625; Hashimoto *et al.*
 (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme *et al.* (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu *et al.*
 50 (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi *et al.* (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;
 (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1, un receptor acoplado a proteína G que se activa por la
 quimioquina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y en la defensa humoral, desempeña un papel en la
 infección por VIH-2 y posiblemente en el desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma, y leucemia); 372 aa, pl: 8.54 Pm:
 41959 TM: Cromosoma Génico 7 [P]: 11q23.3, N° de referencia de Genbank NP_001707.1); Patente
 55 WO2004040000; Patente WO2004015426; Patente US2003105292 (Ejemplo 2); Patente US6555339 (Ejemplo
 2); Patente WO200261087 (Fig 1); Patente WO200157188 (Reivindicación 20, página 269); Patente
 WO200172830 (páginas 12-13); Patente WO200022129 (Ejemplo 1, páginas 152-153, Ejemplo 2, páginas 254-
 256); Patente WO9928468 (reivindicación 1, página 38); Patente US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); Patente
 WO9428931 (páginas 56-58); Patente WO9217497 (reivindicación 7, Fig 5); Dobner *et al.* (1992) Eur. J.
 60 Immunol. 22:2795-2799; Barella *et al.* (1995) Biochem. J. 309:773-779;
 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los
 presenta a linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 6.56 Pm: 30820 TM: Cromosoma Génico 1 [P]: 6p21.3, N° de
 referencia de Genbank NP_002111.1); Tonnelle *et al.* (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson *et al.* (1989)
 Immunogenetics 29(6):411-413; Beck *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg *et al.* (2002) Proc. Natl.
 65 Acad. Sci USA 99:16899-16903; Servenius *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck *et al.* (1996) J. Mol.
 Biol. 255:1-13; Naruse *et al.* (2002) Tissue Antigens 59:512-519; Patente WO9958658 (reivindicación 13, Fig 15);

Patente US6153408 (Col 35-38); Patente US5976551 (col 168-170); Patente US6011146 (col 145-146); Kasahara *et al.* (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larham-mar *et al.* (1985) J. Biol. Chem. 260(26): 14111-14119;

(31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por ligando del receptor purinérgico P2X, un canal iónico abierto por ATP extracelular, puede estar implicado en la transmisión sináptica y en la neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de inestabilidad de detrusor idiopática); 422 aa, pl: 7.63, Pm: 47206 TM: Cromosoma Génico 1 [P]: 17p13.3, N° de referencia de Genbank NP_002552.2); Le *et al.* (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; Patente WO2004047749; Patente WO2003072035 (reivindicación 10); Touch-man *et al.* (2000) Genome Res. 10:165-173; Patente WO200222660 (reivindicación 20); Patente WO2003093444 (reivindicación 1); Patente WO2003087768 (reivindicación 1); Patente WO2003029277 (página 82);

(32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2); 359 aa, pl: 8.66, Pm: 40225 TM: Cromosoma Génico 1 [P]: 9p13.3, N° de referencia de Genbank NP_001773.1); Patente WO2004042346 (reivindicación 65); Patente WO2003026493 (páginas 51-52, 57-58); Patente WO200075655 (páginas 105-106); Von Hoegen *et al.* (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg *et al.* (2002) Proc. Natl. Acad. Sci Patente USA 99:16899-16903;

(33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR), regula la activación y apoptosis de linfocitos B, la pérdida de función está asociada a un aumento de la actividad de la enfermedad en pacientes con lupus sistémico eritematoso); 661 aa, pl: 6.20, Pm: 74147 TM: Cromosoma Génico 1 [P]: 5q12, N° de referencia de Genbank NP_005573.1); Patente US2002193567; Patente WO9707198 (reivindicación 11, páginas 39-42); Miura *et al.* (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura *et al.* (1998) Blood 92:2815-2822; Patente WO2003083047; Patente WO9744452 (reivindicación 8, páginas 57-61); Patente WO200012130 (páginas 24-26);

(34) FcRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina que contiene los dominios de tipo Ig de tipo C2 e ITAM, puede tener un papel en la diferenciación de los linfocitos B); 429 aa, pl: 5.28, Pm: 46925 TM: Cromosoma Génico 1 [P]: 1q21-1q22, N° de referencia de Genbank NP_443170.1); Patente WO2003077836; Patente WO200138490 (reivindicación 6, Fig 18E-1-18-E-2); Davis *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; Patente WO2003089624 (reivindicación 8); Patente EP1347046 (reivindicación 1); Patente WO2003089624 (reivindicación 7);

(35) IRTA2 (FcRH5, Receptor 2 asociado a translocación de la superfamilia de inmunoglobulinas, un inmunoreceptor putativo con posibles papeles en el desarrollo de los linfocitos B y la linfomagenesis; la desregulación del gen por translocación se produce en algunas neoplasias de linfocitos B); 977 aa, pl: 6.88 Pm: 106468 TM: Cromosoma Génico 1 [P]: 1q21, (N° de referencia de Genbank Humano: AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Ratón: AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1); Patente WO2003024392 (reivindicación 2, Fig 97); Nakayama *et al.* (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; Patente WO2003077836; Patente WO200138490 (reivindicación 3, Fig 18B-1-18B-2);

(36) TENB2 (TMEFF2, tomorregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano transmembrana putativo, relacionado con la familia EGF/herregulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa, Referencia de NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, RefSeq de NCBI: NP_057276; Gen de NCBI: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; (N° de referencia de Genbank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436); Patente WO2004074320; JP2004113151; Patente WO2003042661; Patente WO2003009814; EP1295944 (páginas 69-70); Patente WO200230268 (página 329); Patente WO200190304; Patente US2004249130; Patente US2004022727; Patente WO2004063355; Patente US2004197325; Patente US2003232350; Patente US2004005563; Patente US2003124579; Patente US 6410506; Patente US 66420061; Horie *et al.* (2000) Genomics 67:146-152; Uchida *et al.* (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang *et al.* (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynn-Jones *et al.* (2001) Int J Cancer. Oct 15;94(2):178-84.

CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

Los compuestos de la invención incluyen aquellos con utilidad para actividad anticancerígena. En particular, los compuestos incluyen un anticuerpo conjugado, es decir, unido covalentemente mediante un conector, a un metabolito de nemorrubicina y un resto de fármaco análogo donde el fármaco, cuando no está conjugado a un anticuerpo, tiene un efecto citotóxico o citostático. La actividad biológica del resto de fármaco está modulada de ese modo por la conjugación a un anticuerpo. Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención pueden suministrar selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico a un tejido tumoral mediante lo cual se consigue una mayor selectividad, es decir, una menor dosis eficaz.

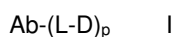
En una realización, la biodisponibilidad del ADC, o de un metabolito intracelular del ADC, mejora en un mamífero cuando se compara con el correspondiente metabolito de nemorrubicina y el compuesto análogo solos. Además, la biodisponibilidad del ADC, o de un metabolito intracelular del ADC, mejora en un mamífero cuando se compara con el correspondiente anticuerpo solo (anticuerpo del ADC, sin el resto de fármaco o el conector).

En una realización, el metabolito de nemorrubicina y el resto de fármaco análogo del ADC no se escinden del anticuerpo hasta que el conjugado anticuerpo-fármaco se une al receptor de superficie celular o entra en una célula con el receptor de superficie celular específico para el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco. El resto de fármaco se puede escindir del anticuerpo después de que el conjugado anticuerpo-fármaco entre en la célula. En un

mamífero, el metabolito de nemorrubicina y el resto de fármaco análogo se pueden escindir intracelularmente del anticuerpo del compuesto, o de un metabolito intracelular del compuesto, por acción enzimática, hidrólisis, oxidación, u otro mecanismo.

Los conjugados anticuerpo fármaco de la invención también se pueden producir por modificación del anticuerpo para introducir restos electrofílicos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos del reactivo de conector o el fármaco. Los azúcares de los anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos de conector o los restos de fármaco. Los grupos imina base de Schiff resultantes pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar uniones amina estables. En una realización, la reacción de la parte carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con una galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados del fármaco (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: Nueva York, p 234-242). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en el lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento de Patente US 5362852). Se puede hacer reaccionar tal aldehído con un nucleófilo del resto de fármaco o de un conector.

Los conjugados anticuerpo-fármaco (APC) se pueden representar mediante la Fórmula I:

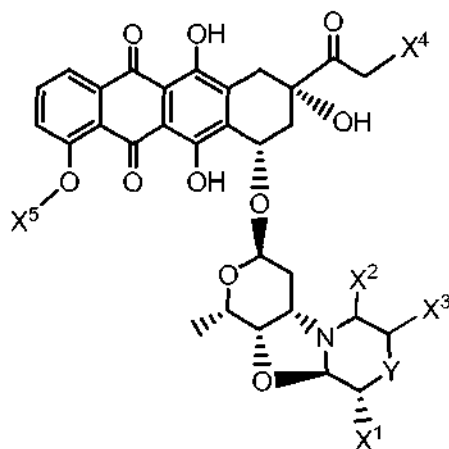


que comprende un anticuerpo unido covalentemente mediante un conector a uno o más metabolitos de nemorrubicina o restos de fármaco análogos, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

Ab es un anticuerpo;

L es un conector; y

D es un metabolito de nemorrubicina o un resto de fármaco análogo que tiene la estructura:



en la que:

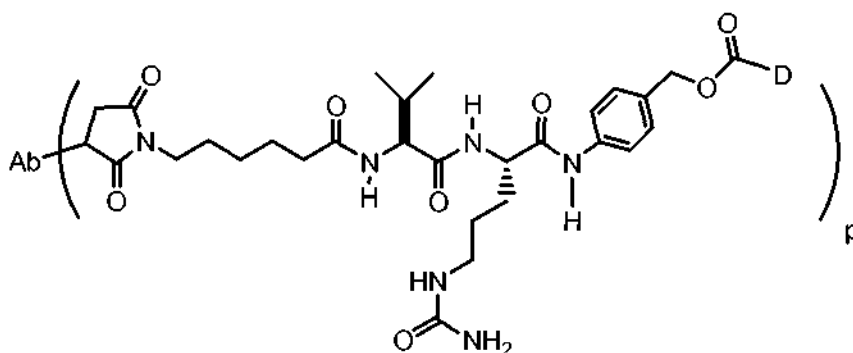
Y es N-X⁶ u O;

L está unido en X⁴; y

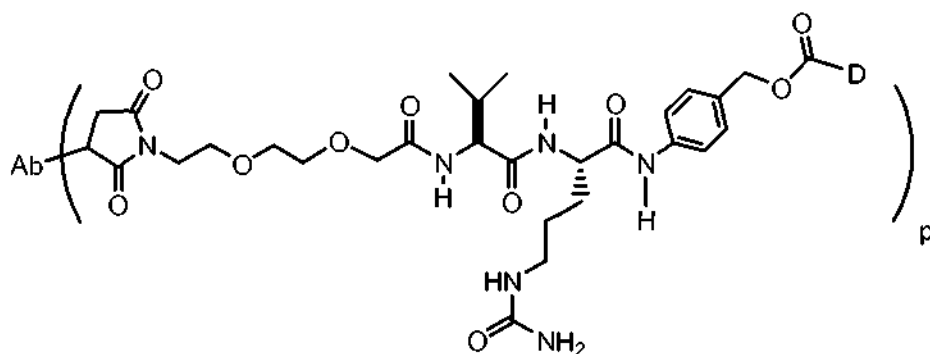
p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8.

La proporción de fármaco con respecto a anticuerpo o carga de fármaco está representada por p en los compuestos de Fórmula I. El valor de la carga de fármaco p es de 1 a 8. Los compuestos de Fórmula I incluyen todas las mezclas de conjugados anticuerpo-fármaco cargados y unidos de forma diversa donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 restos de fármaco están unidos covalentemente al anticuerpo.

Las realizaciones de conjugados anticuerpo-fármaco incluyen:

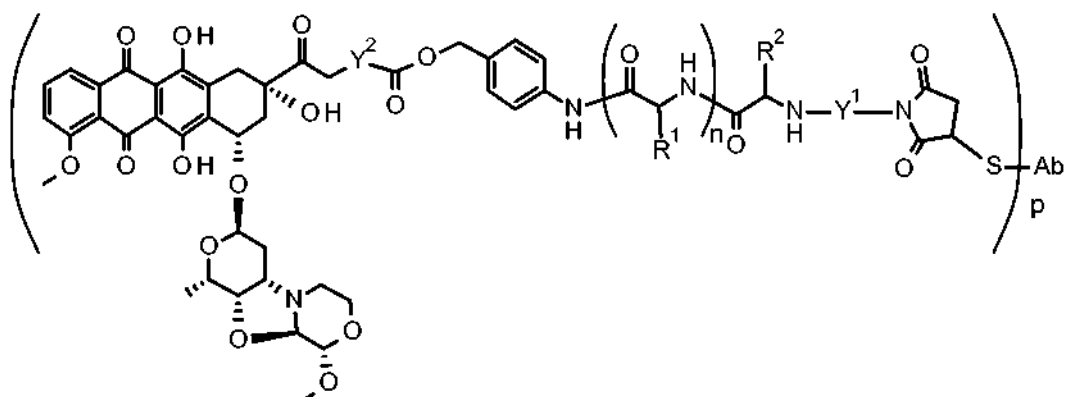


MC-val-cit-PAB



MPEG-val-cit-PAB

Las realizaciones de conjugados anticuerpo-fármaco incluyen:



5

en la que

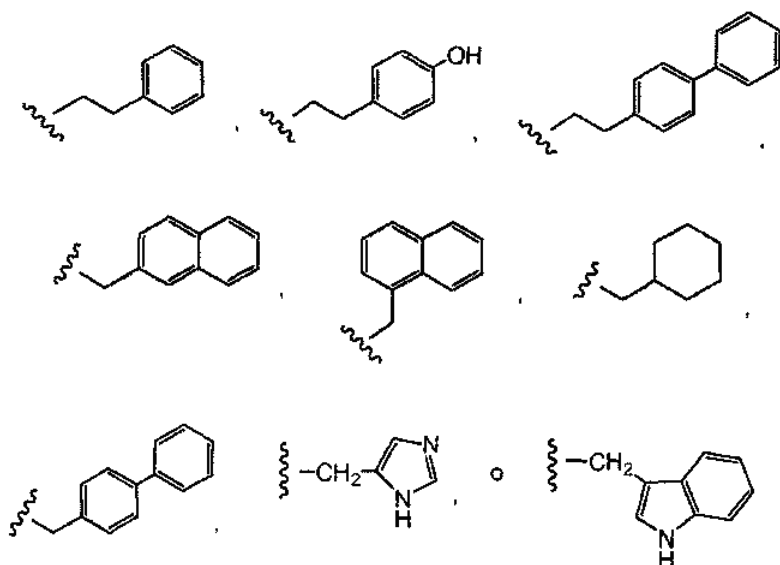
Y^1 es $C(O)(C(R^{10})_2)_q$, $(C(R^{10})_2)_q$, o $(C(R^{10})_2)_qO(C(R^{10})_2)_q$;

q es 2, 3, 4, 5 o 6.

10 Y^2 es O, NR^{10} , S, $OC(O)NR^{10}$ -(alquil C_1 - C_6)- NR^{10} ;

R^1 y R^2 son independientemente una cadena lateral de aminoácido seleccionada entre hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo, y las estructuras:

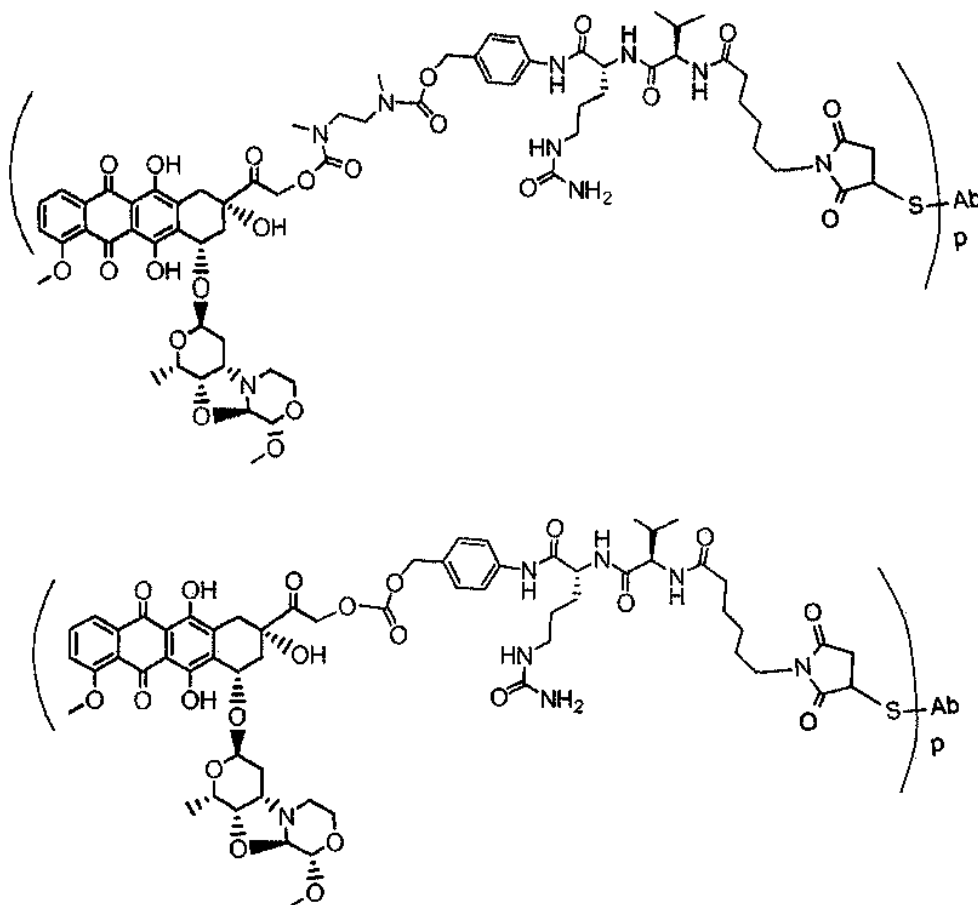
15



5 cada R^{10} se selecciona independientemente entre H, alquilo C_1-C_8 , alqueniilo C_2-C_8 , alquinilo C_2-C_8 , carbociclilo C_3-C_{12} , heterociclilo C_2-C_{20} , arilo C_6-C_{20} , y heteroarilo C_1-C_{20} , opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, I, $-CH_2OH$, $-CH_2C_6H_5$, $-CN$, $-CF_3$, $-CO_2H$, $-CONH_2$, $-CONHCH_3$, $-NO_2$, $-N(CH_3)_2$, $-NHCOCH_3$, $-NHS(O)_2CH_3$, $-OH$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-S(O)_2NH_2$, y $-S(O)_2CH_3$;

y
n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7.

Las realizaciones de conjugados anticuerpo-fármaco incluyen:



CARGA DE FÁRMACO

La carga de fármaco está representada por p en la molécula de conjugado anticuerpo-fármaco de Fórmula I, el número promedio de metabolitos de nemorrubicina y fármacos análogos por anticuerpo. La carga de fármaco puede variar de 1 a 8 fármacos (D) por anticuerpo (Ab), es decir, donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 restos de fármaco están unidos covalentemente al anticuerpo. Las composiciones de ADC de Fórmula I incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 8. El número promedio de fármacos por anticuerpo en las preparaciones de ADC provenientes de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayos de ELISA, electroforesis, y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de ADC en términos de p . El valor promedio de p en una preparación de ADC particular se puede determinar mediante ELISA (Hamblett *et al.* (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson *et al.* (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Sin embargo, la distribución de los valores de p (fármaco) no es discernible mediante la unión anticuerpo-antígeno y la limitación de detección de ELISA. Además, el ensayo de ELISA para la detección de conjugados anticuerpo-fármaco no determina dónde se unen los restos de fármaco al anticuerpo, tal como los fragmentos de cadena pesada o cadena ligera, o los restos de aminoácido en particular. En algunos casos, se puede conseguir la separación, purificación, y caracterización de ADC homogéneos donde p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco mediante medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis.

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

Por lo general, se conjugan menos restos de fármaco que el valor teórico máximo a un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, numerosos restos de lisina que no reaccionan con el compuesto intermedio de fármaco-conector (D-L) o el reactivo de conector. Solo los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo de conector reactivo frente a amina. Además, solo los grupos tiol de cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo de conector reactivo frente al tiol. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos, en el caso que los hubiera, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que se puedan unir a un resto de fármaco. La mayoría de los restos tiol de cisteína de los anticuerpos de los compuestos existen en forma de puentes disulfuro y se deben reducir con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP, en condiciones de reducción parcial o total. Además, el anticuerpo se debe someter a condiciones de desnaturalización para manifestar los grupos nucleofílicos reactivos tales como lisina o cisteína. La carga (proporción fármaco/anticuerpo) de un ADC se puede controlar de varias maneras diferentes, incluyendo: (i) limitando el exceso molar del compuesto intermedio de fármaco-conector (D-L) o del reactivo de conector con respecto al anticuerpo, (ii) limitando el tiempo o la temperatura de la reacción de conjugación, y (iii) empleando condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de cisteína.

Se pueden modificar por ingeniería los aminoácidos cisteína en los sitios reactivos en un anticuerpo para que no formen uniones disulfuro intracadena o intermoleculares (documento de patente US 2007/0092940). Los tioles de cisteína modificados por ingeniería pueden reaccionar con reactivos de conector o reactivos de fármaco-conector de la presente invención que tienen grupos electrofílicos reactivos frente al tiol tales como maleimida o alfa-halo amidas para formar ADC con anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína y el metabolito de nemorrubicina o los restos de fármaco análogos. De ese modo, se puede diseñar, controlar, y conocer la ubicación del resto de fármaco. La carga de fármaco se puede controlar dado que los grupos tiol de cisteína modificados por ingeniería reaccionan por lo general con un alto rendimiento con reactivos de conector o reactivos de fármaco-conector reactivos frente a tiol. La modificación por ingeniería de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido cisteína por sustitución en un sitio individual de la cadena pesada o ligera proporciona dos nuevas cisteínas en el anticuerpo simétrico. Se puede conseguir una carga cercana a 2 y casi la homogeneidad del producto de conjugación ADC.

Cuando más de un grupo nucleofílico o electrofílico del anticuerpo reacciona con un compuesto intermedio de fármaco-conector, o un reactivo de conector seguido de un reactivo de resto de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de restos de fármaco unidos a un anticuerpo, por ejemplo 1, 2, 3, etc. Los métodos de cromatografía líquida tales como fase inversa polimérica (PLRP) e interacción hidrofóbica (HIC) pueden separar los compuestos de la mezcla por el valor de carga de fármaco. Se pueden aislar las preparaciones de ADC con un valor de carga de fármaco único (p) aunque, sin embargo, estos ADC con valor de carga único aún pueden ser mezclas heterogéneas debido a que los restos de fármaco se pueden unir, a través del conector, a diferentes sitios del anticuerpo.

PREPARACIÓN DE CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

El ADC de Fórmula I se puede preparar mediante diversas rutas, empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleofílico o un grupo electrofílico de un anticuerpo con un reactivo de conector divalente, para formar un compuesto intermedio de anticuerpo-conector Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de reacción con un reactivo de resto de fármaco

activado; y (2) reacción de un grupo nucleofílico o un grupo electrofílico de un reactivo de resto de fármaco con un reactivo de conector, para formar un reactivo de fármaco-conector D-L, a través del enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleofílico o el grupo electrofílico de un anticuerpo. La conjugación de los métodos (1) y (2) se puede emplear con diversos anticuerpos, restos de fármaco, y conectores para preparar los conjugados de anticuerpo-fármaco de Fórmula I.

Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino azúcar donde el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol, e hidroxilo son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos de los restos de conector y los reactivos de conector incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo, y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros reducibles intercadena, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer reactivos para la conjugación con reactivos de conector por tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditioneitol) o TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz *et al.* (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Cada puente disulfuro de cisteína formará de ese modo, teóricamente, dos nucleófilos tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleofílicos adicionales en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol.

Los conjugados anticuerpo-fármaco también se pueden producir por modificación del anticuerpo para introducir restos electrofílicos, que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos del reactivo de conector o el fármaco. Los azúcares de los anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos de conector o los restos de fármaco. Los grupos imina base de Schiff resultantes pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar uniones amina estables. En una realización, la reacción de la parte carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con una galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados del fármaco (Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: Nueva York, p 234-242). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato sódico, dando como resultado la producción de un aldehído en el lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento de Patente US 5362852). Se puede hacer reaccionar tal aldehído con un nucleófilo del resto de fármaco o de un conector.

De forma análoga, los grupos nucleofílicos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos de los restos de conector y los reactivos de conector incluyendo: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos, y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo, y maleimida. Se pueden introducir grupos nucleofílicos reactivos en los compuestos de metabolito de nemorubicina y análogos mediante interconversiones de grupos funcionales convencionales. Por ejemplo, se pueden convertir grupos hidroxilo en grupos tiol mediante reacciones de tipo Mitsunobu, para formar compuestos de fármaco modificados con tiol.

ANÁLISIS SISTEMÁTICO PARA CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO (ADC) DIRIGIDOS FRENTE A ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR Y RECEPTORES DE LA SUPERFICIE CELULAR

Los métodos de ensayo para detectar células cancerígenas comprenden exponer las células a un compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco, y determinar el grado de unión del compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco a las células. Los compuestos de ADC que se identifican en los modelos animales y los ensayos basados en células se pueden someter a ensayo adicionalmente en ensayos clínicos de primates superiores y seres humanos que portan el tumor.

Los animales y las líneas celulares transgénicos son particularmente útiles en el análisis sistemático de los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que tienen potencial como tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos que implican la sobreexpresión de antígenos asociados a tumor y receptores de la superficie celular, por ejemplo HER2 (documento de Patente US 6632979). El análisis sistemático para un ADC útil puede implicar administrar el ADC candidato con un intervalo de dosis al animal transgénico, y evaluar en diversos puntos de tiempo el efecto o efectos del ADC en la enfermedad o trastorno que se está evaluando. Además, o alternativamente, el fármaco se puede administrar antes de, o simultáneamente a, la exposición a un inductor de la enfermedad, si fuera pertinente. El ADC candidato se puede analizar sistemáticamente en serie e individualmente, o en paralelo en un formato de análisis sistemático de alto o medio rendimiento. La velocidad con la que se puede analizar sistemáticamente el ADC para la utilidad en tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos está limitada solamente por la velocidad de la metodología de síntesis o de análisis sistemático, incluyendo la detección/medida/análisis de datos.

Una realización es un método de análisis sistemático que comprende (a) trasplantar células de una línea celular de cáncer de mama estable a un animal no humano, (b) administrar un fármaco ADC candidato al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato para inhibir la formación de tumores de la línea celular trasplantada. La invención también se refiere a un método de análisis sistemático de ADC candidatos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de una proteína receptora que comprende (a) poner en contacto células de una línea celular de cáncer de mama estable con un candidato de fármaco y (b) evaluar la capacidad del APC candidato para inhibir el crecimiento de la línea celular estable.

Una realización es un método de análisis sistemático que comprende (a) poner en contacto células de una línea celular de cáncer de mama estable con un fármaco ADC candidato y (b) evaluar la capacidad del ADC candidato para inducir muerte celular, inducir apoptosis, bloquear la unión de herregulina, bloquear la fosforilación de tirosina estimulada por ligando, o bloquear la activación del ligando de HER2. Otra realización es para evaluar la capacidad del ADC candidato. En otra realización se evalúa la capacidad del ADC candidato.

Otra realización es un método de análisis sistemático que comprende (a) administrar un fármaco ADC candidato a un mamífero no humano transgénico que sobreexpresa, por ejemplo, en sus células de las glándulas mamarias, una proteína nativa humana, por ejemplo HER2 o un fragmento de la misma, en el que tal mamífero transgénico tiene integrada de forma estable en su genoma una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína nativa humana o un fragmento de la misma que tiene la actividad biológica de la proteína nativa humana, unida operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción que dirigen su expresión, y desarrolla un tumor. Se analiza sistemáticamente el ADC candidato por administración al animal transgénico en un intervalo de dosis, y evaluación de la respuesta fisiológica del animal a los compuestos a lo largo del tiempo. La administración puede ser oral, o mediante inyección adecuada, dependiendo de la naturaleza química del compuesto que se está evaluando. En algunos casos, puede ser apropiado administrar el compuesto junto con cofactores que aumentarían la eficacia del compuesto. Las líneas celulares derivadas de los animales transgénicos objeto se usan para analizar sistemáticamente los compuestos útiles en el tratamiento de diversos trastornos asociados con la sobreexpresión de proteínas de antígeno asociado a tumor o receptores de la superficie celular, por ejemplo sobreexpresión de HER2. Para identificar los compuestos de ADC inhibidores del crecimiento que fijan como diana específicamente HER2, se puede analizar sistemáticamente el ADC que inhibe el crecimiento de las células cancerígenas que sobreexpresan HER2 derivado de los animales transgénicos (documento de Patente US 5677171).

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

Generalmente, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) se mide mediante: exposición de células de mamífero que tienen antígenos asociados a tumor o proteínas receptoras al anticuerpo del ADC en un medio de cultivo celular; cultivo de las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y medida de la viabilidad celular. Se pueden usar ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad, es decir la proliferación (CI₅₀), citotoxicidad (CE₅₀), e inducción a la apoptosis (activación de caspasa) del ADC. El Ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo disponible en el mercado (Promega Corp., Madison, WI) basado en la expresión recombinante de luciferasa de coleóptero (documentos de Patente US 5583024; US 5674713; US 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de las células metabólicamente activas (Crouch *et al.* (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88; US 6602677). El Ensayo CellTiter-Glo® se lleva a cabo en un formato de 96 pocillos, haciéndolo susceptible al análisis sistemático de alto rendimiento automatizado (HTS) (Cree *et al.* (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica añadir el reactivo individual (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en medio complementado con suero. No se requieren las etapas de lavado de las células, retirada del medio y múltiples pipeteos. El sistema detecta una cantidad tan baja como 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de la adición del reactivo y la mezcla.

ELIMINACIÓN EN SUERO *IN VIVO* Y ESTABILIDAD EN RATONES

La eliminación en suero y la estabilidad del ADC se puede investigar en ratones desnudos sin tratar (sin tumores recibidos mediante injertos exógenos). La diferencia en la cantidad de anticuerpo total y ADC indica la eliminación del conector y la separación de anticuerpo de su resto de fármaco.

EFICACIA *IN VIVO*

La eficacia de los conjugados anticuerpo-fármaco de la invención se puede medir *in vivo* mediante implantación de aloinjertos o xenoinjertos de células cancerígenas o tumores primarios en roedores y tratamiento de los tumores con ADC. Se han de esperar resultados variables dependiendo de la línea celular, la especificidad de la unión del anticuerpo del ADC a los receptores presentes en las células cancerígenas, el régimen de dosificación, y otros factores. Por ejemplo, la eficacia *in vivo* de ADC anti-HER2 se puede medir mediante un modelo de ratón de explante transgénico que expresa altos niveles de HER2. Se puede propagar un aloinjerto desde el ratón transgénico Fo5 mmtv que no responde, o casi no responde, a terapia de HERCEPTIN®. Los sujetos se tratan una vez con ADC y se monitorizan durante 3-6 semanas para medir el tiempo en que se duplica el tumor, el log de

eliminación celular, y el encogimiento del tumor. A continuación se pueden llevar a cabo además experimentos de dosis-respuesta y múltiples dosis.

TOXICIDAD EN ROEDORES

Se pueden evaluar conjugados de anticuerpo-fármaco y un control negativo de ADC, "vehículo", en un modelo de rata de toxicidad aguda (Brown *et al.* (2002) Cancer Chemother. Pharmacol. 50:333-340). La toxicidad de ADC se investiga por tratamiento de ratas hembra Sprague-Dawley con el ADC y posterior inspección y análisis de los efectos en diversos órganos. Basándose en observaciones generales (pesos corporales), parámetros de patología clínica (química de suero y hematología) e histopatología, se puede observar, caracterizar y medir la toxicidad de ADC.

Se puede llevar a cabo un estudio de toxicidad aguda de múltiples días en ratones hembra adolescentes mediante una o más dosis de un ADC candidato, un control de ADC, un metabolito de nemorrubicina y un compuesto análogo libres y un control de vehículo (día 0). Se mide periódicamente el peso corporal. También se lleva a cabo periódicamente un análisis de química clínica, enzimas en suero y hematología; concluyendo con una necropsia completa con evaluación histopatológica. Las señales de toxicidad incluyeron la observación clínica de pérdida de peso, considerando que la pérdida de peso, o el cambio del peso con respecto a animales dosificados solo con vehículo en animales después de dosificación con ADC, es un indicador en bruto o general de la toxicidad sistémica o localizada. También se puede medir la hepatotoxicidad mediante: (i) enzimas hepáticas elevadas tales como AST (aspartato aminotransferasa), ALT (alanina aminotransferasa), GGT (g-glutamyl transferasa); (ii) números elevados de figuras mitóticas y apoptóticas; y (iii) necrosis de hepatocitos. La toxicidad hematolinfóide se observa por reducción de leucocitos, principalmente granulocitos (neutrófilos), y/o plaquetas, y los órganos linfoides implicados, es decir atrofia o actividad apoptótica. La toxicidad también se indica mediante lesiones del tracto gastrointestinal tales como números elevados de figuras mitóticas y apoptóticas y enterocolitis degenerativa.

ADMINISTRACIÓN DE FORMULACIONES FARMACÉUTICAS DE CONJUGADO ANTICUERPO-FÁRMACO

Los conjugados anticuerpo-fármaco terapéuticos (ADC) se puede administrar mediante cualquier ruta apropiada para la afección que se va a tratar. El ADC se administrará por lo general por vía parenteral, es decir, infusión, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal, bolo, intratumoral o epidural (Shire *et al.* (2004) J. Pharm. Sciences 93(6):1390-1402). Las formulaciones farmacéuticas de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) terapéuticos se preparan por lo general para administración parenteral con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable en una forma inyectable de dosificación unitaria. Un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que tiene el grado deseado de pureza se mezcla opcionalmente con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, en forma de una formulación liofilizada o una solución acuosa (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16ª edición, Osol, A. Ed.).

Los vehículos, diluyentes, portadores, excipientes, y estabilizantes parenterales aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen: (i) tampones tales como fosfato, citrato, fosfato de calcio dibásico, estearato de magnesio, y otros ácidos orgánicos; (ii) antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; (iii) conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; (iv) alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); (v) polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; (vi) polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; (vii) aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; (viii) monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, trehalosa, almidón glicolato sódico, sorbitol manosa, carboximetilcelulosa, o dextrinas; (ix) agentes quelantes tales como EDTA; (x) contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); (xi) tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG); (xii) sustancias de deslizamiento o agentes de granulación tales como estearato de magnesio, carboximetilcelulosa, talco, sílice, y aceite vegetal hidrogenado; (xiii) disgregantes tales como crospovidona, almidón glicolato sódico o almidón de maíz; (xiv) agentes espesantes tales como gelatina y polietilenglicol; (xv) revestimientos entéricos tales como citrato de trietilo; y/o (xvi) modificadores del sabor y la textura, agentes antiespumantes, pigmentos, y desecantes. Por ejemplo, se describen formulaciones liofilizadas de anticuerpo anti-ErbB2 en el documento de Patente WO 97/04801. Una formulación a modo de ejemplo de un ADC contiene aproximadamente 100 mg/ml de trehalosa (2-(hidroximetil)-6-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidropiran-2-il]oxi-tetrahidropiran-3,4,5-triol; C₁₂H₂₂O₁₁; N° CAS 99-20-7) y aproximadamente un 0,1 % de TWEEN™ 20 (polisorbato 20; éster de 2-[2-[3,4-bis(2-hidroxietoxi)tetrahidrofurano-2-il]-2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etilo del ácido dodecanoico; C₂₆H₅₀O₁₀; N° CAS 9005-64-5) a aproximadamente pH 6.

Las formulaciones farmacéuticas de un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) terapéutico pueden contener ciertas cantidades de resto de fármaco (D), compuesto intermedio anticuerpo-conector (Ab-L), y/o compuesto intermedio fármaco-conector (D-L), sin reaccionar, como consecuencia de la purificación y separación incompletas de reactivos en exceso, impurezas, y productos secundarios, en el proceso de preparación del ADC; o hidrólisis por tiempo/temperatura o degradación tras almacenamiento del ADC a granel o de la composición de ADC formulada.

Por ejemplo, una formulación del ADC puede contener una cantidad detectable de fármaco libre. Además, o alternativamente, puede contener una cantidad detectable de compuesto intermedio de fármaco-conector. Además, o alternativamente, puede contener una cantidad detectable del anticuerpo. Los ingredientes farmacéuticos activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Algunos ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el ADC, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Algunos ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (documento de Patente US 3773919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Se encuentran generalmente técnicas y formulaciones en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, PA). Tales métodos incluyen la etapa de poner en contacto el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan en condiciones estériles y mediante puesta en contacto uniforme e íntima del ADC con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, si fuera necesario, conformación del producto.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos (ADC) en una mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábica, y agentes de dispersión o humectación tales como una fosfatida de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileño con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo monooleato de polioxietileno sorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las composiciones farmacéuticas de ADC pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes de dispersión o humectación adecuados que se ha mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como una solución en 1,3-butanodiol o preparado en forma de un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se puede emplear se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, se pueden emplear convencionalmente aceites estériles no volátiles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite no volátil insípido incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar del mismo modo ácidos grasos tales como ácido oleico en las preparaciones inyectables.

La cantidad del ingrediente activo que se puede combinar con el material de vehículo para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del hospedador tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una solución acuosa destinada para infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 mg del ingrediente activo por mililitro de solución con el fin de que se pueda producir una infusión de un volumen adecuado con una velocidad de aproximadamente 30 ml/h. Se puede efectuar la administración subcutánea (bolo) con aproximadamente 1,5 ml o menos de volumen total y una concentración de aproximadamente 100 mg de ADC por ml. Para el ADC que requiere administración frecuente y crónica, se puede emplear la vía subcutánea, tal como mediante tecnología de dispositivo de jeringa con prellenado o autoinyector.

Como proposición general, la cantidad inicial farmacéuticamente eficaz de ADC administrada por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,01-100 mg/kg, en concreto aproximadamente de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal de paciente por día, siendo el intervalo inicial habitual de compuesto usado de 0,3 a 15 mg/kg/día. Por ejemplo, los pacientes humanos se pueden dosificar inicialmente con aproximadamente 1,5 mg de ADC por kg de peso corporal de paciente. La dosis se puede escalar hasta la máxima dosis tolerada (MTD). La programación de dosificación puede ser aproximadamente cada 3 semanas, pero de acuerdo con la afección diagnosticada o la respuesta, la programación puede ser más o menos frecuente. La dosis se puede ajustar además durante el curso del tratamiento para que esté en o por debajo de la MTD y que se pueda administrar de forma segura durante múltiples ciclos, tales

como aproximadamente 4 o más.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor destinado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Aunque la administración oral de compuestos terapéuticos proteicos está generalmente desfavorecida debido a una mala biodisponibilidad debido a la absorción limitada, hidrólisis o desnaturalización en el intestino, se pueden preparar formulaciones de ADC adecuadas para administración oral en forma de unidades discretas tales como cápsulas, sobrecitos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del ADC.

Las formulaciones se pueden envasar en envases de dosis unitaria o de dosis múltiples, por ejemplo ampollas y viales cerrados herméticamente, y se pueden almacenar en forma seca congelada (liofilizada) requiriendo solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua, para la inyección inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se preparan a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente. Las formulaciones de dosificación unitaria a modo de ejemplo contienen una dosis diaria o una subdosis diaria unitaria, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

TRATAMIENTOS DE CONJUGADO ANTICUERPO-FÁRMACO

El ADC se puede usar para tratar diversas enfermedades o trastornos en un paciente, tales como cáncer y afecciones autoinmunes que incluyen las caracterizadas por la sobreexpresión de un antígeno asociado a tumor. Algunas afecciones o trastornos a modo de ejemplo incluyen tumores benignos o malignos; leucemia y neoplasias linfoides; otros trastornos tales como trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos, glandulares, de los macrófagos, epiteliales, del estroma y blastocóelicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos. Los tipos de cáncer susceptibles al tratamiento con ADC incluyen los que se caracterizan por la sobreexpresión de ciertos antígenos o receptores de la superficie celular asociados a tumor, por ejemplo HER2.

Un método es para tratamiento de cáncer en un mamífero, en el que el cáncer se caracteriza por la sobreexpresión de un receptor ErbB. El mamífero opcionalmente no responde, o responde mal, al tratamiento con un anticuerpo anti-ErbB sin conjugar. El método comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco. El crecimiento de las células tumorales que sobreexpresan un receptor de factor de crecimiento tal como el receptor HER2 o el receptor de EGF se puede inhibir por administración a un paciente de un ADC de Fórmula I que se une específicamente a dicho receptor de factor de crecimiento y un agente quimioterapéutico en el que dicho conjugado anticuerpo-fármaco y dicho agente quimioterapéutico se administran cada uno en cantidades eficaces para inhibir el crecimiento de las células tumorales en el paciente.

Un paciente humano susceptible a, o diagnosticado con, un trastorno caracterizado por la sobreexpresión de receptor ErbB2, se puede tratar por administración de una combinación de un

ADC y un agente quimioterapéutico. Tal activación excesiva se puede atribuir a la sobreexpresión o aumento de producción del receptor ErbB o un ligando de ErbB. En una realización, se llevará a cabo un ensayo diagnóstico o pronóstico para determinar si el cáncer del paciente se caracteriza por la activación excesiva de un receptor ErbB. Por ejemplo, se puede determinar la amplificación del gen ErbB y/o la sobreexpresión de un receptor ErbB en el cáncer. Están disponibles en la técnica diversos ensayos para determinar la amplificación/sobreexpresión e incluyen IHC, FISH y ensayos de separación de antígeno.

Algunos ejemplos de cáncer que se pueden tratar el presente documento incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Algunos ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de la cabeza y el cuello.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un ADC dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si la molécula se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico al cargo. La formulación de ADC se administra en forma adecuada al paciente de una vez o en una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 mg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de ADC es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente tanto, por ejemplo, en una o más administraciones distintas, como

en infusión continua. Un régimen de dosificación habitual podría variar de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosificación a modo de ejemplo de ADC que se va a administrar a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más prolongadas, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Un régimen de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanales de aproximadamente 2 mg/kg del ADC. Pueden ser útiles otros regímenes de dosificación.

10 TERAPIA DE COMBINACIÓN

Un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) se puede combinar en una formulación farmacéutica de combinación, o régimen de dosificación en forma de terapia de combinación, con un segundo compuesto que tiene propiedades anticancerígenas. El segundo compuesto de la formulación o régimen de dosificación farmacéutico de combinación tiene preferentemente actividades complementarias al ADC de la combinación de modo que no se vean afectados adversamente entre sí.

El segundo compuesto puede ser un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal, inhibidor de aromatasas, inhibidor de proteína quinasa, inhibidor de lípido quinasa, antiandrógeno, oligonucleótido antisentido, ribozima, vacuna de terapia génica, agente antiangiogénico y/o cardioprotector. Tales moléculas están presentes adecuadamente en la combinación en cantidades que son eficaces para el fin destinado. Una composición farmacéutica que contiene un ADC también puede tener una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico tal como un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de topoisomerasa, o un aglutinante de ADN.

Además, o alternativamente, el segundo compuesto puede ser un anticuerpo que se une o bloquea la activación de ligando de un antígeno o receptor asociado a tumor. El segundo anticuerpo puede estar conjugado con un agente citotóxico o quimioterapéutico, por ejemplo, un depsipéptido macrocíclico, una auristatina, una calicheamicina, o un resto de 1,8-bis-naftalimida. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además anticuerpos que se unan a EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF) en la formulación o régimen de dosificación.

La terapia de combinación se puede administrar como régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones. La administración combinada incluye administración conjunta, usando formulaciones distintas o una formulación farmacéutica individual, y administración consecutiva en cualquier orden, en la que existe un período de tiempo en el que los dos (o todos) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

En una realización, el tratamiento con un ADC de la presente invención implica la administración combinada de un agente anticancerígeno identificado en el presente documento, y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores de crecimiento. La preparación y las programaciones de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según se determine empíricamente por el médico practicante experto. La preparación y las programaciones de dosificación para tal quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)*.

El ADC se puede combinar con un compuesto antihormonal; por ejemplo, un compuesto antiestrogénico tal como tamoxifeno; una antiprogesterona tal como onapristona (documento de Patente EP 616812); o un antiandrógeno tal como flutamida, en dosificaciones conocidas para tales moléculas. Cuando el cáncer que se va a tratar es un cáncer independiente de hormonas, el paciente se puede haber sometido previamente a una terapia antihormonal y, después de que el cáncer se vuelva independiente a las hormonas, se puede administrar el anticuerpo anti-ErbB2 (y opcionalmente otros agentes que se describen en el presente documento) al paciente. También puede ser beneficioso administrar conjuntamente un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción de miocardio asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a una retirada quirúrgica de las células cancerígenas y/o terapia de radiación.

Las dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes administrados conjuntamente anteriores son las que se usan en la actualidad y se pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente recién identificado y los demás agentes o tratamientos quimioterapéuticos.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y resultar "sinérgica", es decir, el efecto conseguido cuando los ingredientes activos se usan conjuntamente es mayor que la suma de los efectos que resultan de usar los compuestos por separado. Se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos: (1) se formulan y se administran conjuntamente o se suministran simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) se suministran mediante alternación o en paralelo en forma de formulaciones distintas; o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se suministran en una terapia de alternación, se puede obtener un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo mediante inyecciones

diferentes en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternación, se administra secuencialmente una dosificación eficaz de cada ingrediente activo, es decir en serie, mientras que en la terapia de combinación, se administran conjuntamente dosificaciones eficaces de dos o más ingredientes activos.

5 METABOLITOS DE LOS CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

También entran dentro del alcance de la presente invención los productos metabólicos *in vivo* de los compuestos de ADC que se describen en el presente documento, en la medida que tales productos son nuevos y no evidentes con respecto a la técnica anterior. Tales productos pueden resultar, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación, escisión enzimática, y similar, del compuesto administrado. Por lo tanto, la invención incluye compuestos nuevos y no evidentes producidos mediante un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de la presente invención con un mamífero durante un período de tiempo suficiente para producir un producto metabólico del mismo.

Los productos de metabolitos se pueden identificar mediante preparación de un ADC radiomarcado (por ejemplo, ^{14}C o ^3H), administración de los mismos por vía parenteral en una dosis detectable (por ejemplo, mayor de aproximadamente 0,5 mg/kg) a un animal tal como una rata, ratón, cobaya, mono, o a un hombre, dejando tiempo suficiente para que se produzca el metabolismo (por lo general aproximadamente 30 segundos a 30 horas) y aislando sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente dado que están marcados (otros se aíslan mediante el uso de anticuerpos capaces de unir epítomos que sobreviven en el metabolito). Las estructuras de metabolito se determinan de forma convencional, por ejemplo mediante análisis por MS, LC/MS o RMN. En general, el análisis de metabolitos se realiza de la misma forma que los estudios de metabolismo de fármacos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. Los productos de conversión, siempre que no se encuentren de otro modo *in vivo*, son útiles en ensayos diagnósticos para dosificación terapéutica de los compuestos de ADC.

Los metabolitos incluyen los productos de escisión *in vivo* del ADC donde se produce la escisión de cualquier enlace que une el resto de fármaco con el anticuerpo. La escisión metabólica puede resultar de ese modo en el anticuerpo desnudo, o en un fragmento de anticuerpo. El metabolito de anticuerpo puede estar unido a una parte, o a la totalidad, del conector. La escisión metabólica también puede resultar en la producción de un resto de fármaco o parte del mismo. El metabolito de resto de fármaco puede estar unido a una parte, o a la totalidad, del conector.

ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

Se proporciona un artículo de fabricación, o "kit", que contiene el ADC y los materiales útiles para el tratamiento de los trastornos que se han descrito anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en, o asociado a, el recipiente. Tales recipientes incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, o un envase blíster. Los envases se pueden formar a partir de diversos materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que se puede perforar mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un ADC. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer.

En una realización, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa, y un prospecto que indica que el primer y el segundo compuestos se pueden usar para tratar cáncer. Además puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína para conjugación mediante reducción y reoxidación

Se expresan anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería con cisteína de longitud completa (TioMab) en células CHO y portan aductos de cisteína (cistinas) en las cisteínas modificadas por ingeniería debido a las condiciones de cultivo celular (documento de Patente US 2007/0092940; Junutula *et al.* "CYSTEINE ENGINEERED ANTI-MUC16 ANTIBODIES AND ANTIBODY DRUG CONJUGATES", documento de Patente de Estados Unidos con N° de serie 60/916657, presentado en el 8 de mayo de 2007). Para liberar los grupos tiol reactivos de las cisteínas modificadas por ingeniería, los TioMab se disuelven en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM aproximadamente pH 8,0 y se reducen con un exceso de aproximadamente 50-100 veces de TCEP 1 mM (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz *et al.* (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) durante aproximadamente 1-2 h a 37 °C. El TioMab reducido se diluye y se carga en una columna HiTrap S en acetato sódico 10 mM, a pH 5, y se eluye con PBS que contiene cloruro sódico 0,3 M. El TioMab reducido eluido se trata con ácido deshidroascórbico 2 mM (dhAA) a pH 7 durante 3 horas, o sulfato de cobre (CuSO₄) acuoso 2 mM a

temperatura ambiente durante una noche. También puede ser eficaz la oxidación en el aire ambiente. El tampón se intercambia por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. Se comprueba el valor tiol/Ab por determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm.

Ejemplo 2 Conjugación de anticuerpos modificados por ingeniería con cisteína y reactivos fármaco-conector

Después de los procedimientos de reducción y reoxidación del Ejemplo 1, el anticuerpo modificado por ingeniería con cisteína se disuelve en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se enfría sobre hielo. Se disuelven aproximadamente 1,5 equivalentes molares, con respecto a las cisteínas modificadas por ingeniería por anticuerpo, de metabolito de nemorubicina o reactivo de fármaco-conector análogo, tal como MC-D (maleimidocaproilo), MC-val-cit-PAB-D, o MC-val-cit-PAB-D, con un grupo funcional reactivo frente a tiol tal como maleimido, en DMSO, diluido en acetonitrilo y agua, y se añaden al anticuerpo modificado por ingeniería con cisteína reducido y reoxidado enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para interrumpir la reacción y proteger cualquier grupo tiol de anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el conjugado anticuerpo-fármaco se purifica y se desala por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles, y se congela para almacenamiento.

Ejemplo 3 Preparación de Ab-MC-PNU (159682) por conjugación de anticuerpo y MC-PNU(159682)

El anticuerpo, disuelto en borato sódico 500 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 8,0 se trata con un exceso de ditiotreitilo 100 mM (DTT). Después de incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, en tampón se intercambia por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. Se comprueba el valor tiol/Ab por determinación de la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido se disuelve en PBS enfriado en hielo.

El reactivo de fármaco conector, maleimidocaproil-PNU (159682), disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, y se añade al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para interrumpir la reacción y se protege cualquier grupo tiol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y Ab-MC-PNU (159682) se purifica y se desala por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles, y se congela para almacenamiento.

Ejemplo 4 Preparación de Ab-MCC-PNU (159682)

El anticuerpo purificado se derivatiza con 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) para introducir el conector MCC. El anticuerpo se trata a 20 mg/ml en fosfato potásico 50 mM/cloruro sódico 50 mM/EDTA 2 mM, a pH 6,5 con 7,5 equivalentes molares de SMCC (20 mM en DMSO, 6,7 mg/ml). Después de agitar durante 2 horas en atmósfera de argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una columna de Sephadex G25 equilibrada con fosfato potásico 50 mM/cloruro sódico 50 mM/EDTA 2 mM, a pH 6,5. Las fracciones que contienen el anticuerpo se mezclan y se someten a ensayo.

El Ab-MCC de la etapa anterior se diluye con fosfato potásico 50 mM/cloruro sódico 50 mM/EDTA 2 mM, a pH 6,5, hasta una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml, y se hace reaccionar con una solución 10 mM de PNU (159682) modificado con tiol (1,7 equivalentes suponiendo 5 MCC/Ab, 7,37 mg/ml) en dimetilacetamida. La reacción se agita a temperatura ambiente en atmósfera de argón 16,5 horas. La mezcla de reacción de conjugación se filtra a través de una columna de filtración de gel de Sephadex G25 (1,5 x 4,9 cm) con 1 x PBS a pH 6,5. La proporción de fármaco con respecto a anticuerpo (p) puede ser aproximadamente de 2 a 5, según se mide mediante la absorbancia a 252 nm y a 280 nm.

Ejemplo 5 Preparación de Ab-SPP-PNU (159682)

El anticuerpo purificado se derivatiza con N-succinimidil-4-(2-piridil)pentanoato para introducir los grupos ditiopiridilo y formar Ab-SPP-Py. El anticuerpo purificado (376,0 mg, 8 mg/ml) en 44,7 ml de tampón fosfato potásico 50 mM (pH 6,5) que contiene NaCl (50 mM) y EDTA (1 mM) se trata con SPP (5,3 equivalentes molares en 2,3 ml de etanol). Después de incubación durante 90 minutos en atmósfera de argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra en gel a través de una columna de Sephadex G25 equilibrada con citrato sódico 35 mM, NaCl 154 mM, EDTA 2 mM. Las fracciones que contienen el anticuerpo se mezclan y se someten a ensayo. El grado de modificación del anticuerpo se determina como se ha descrito anteriormente.

Se diluye Ab-SPP-Py (aproximadamente 10 mmol de grupos 2-tiopiridina liberables) con el tampón citrato sódico 35 mM anterior, a pH 6,5, hasta una concentración final de aproximadamente 2,5 mg/ml. A continuación se añade PNU(159682) modificado con tiol (1,7 equivalentes, 17 mmol) en dimetilacetamida 3,0 mM (DMA, al 3 % v/v en la

mezcla de reacción final) a la solución de anticuerpo. La reacción transcurre a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante aproximadamente 20 horas.

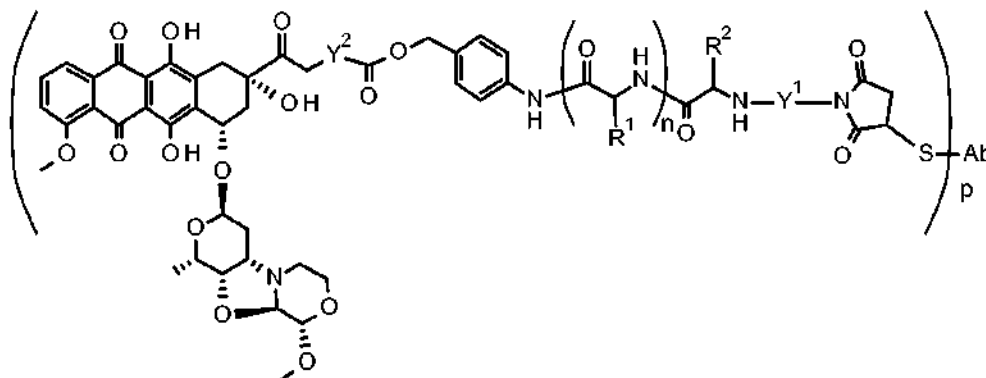
La reacción se carga en una columna de filtración en gel de Sephacril S300 (5,0 cm x 90,0 cm, 1,77 l) equilibrada con citrato sódico 35 mM, NaCl 154 mM, a pH 6,5. El caudal puede ser aproximadamente 5,0 ml/min y se recogen 65 fracciones (20,0 ml cada una). El número de moléculas de fármaco unidas por molécula de anticuerpo (p) se determina por medición de la absorbancia a 252 nm y 280 nm.

Ejemplo 6 Preparación de Ab-BMPEO-PNU (159682)

Un anticuerpo con un grupo tiol de cisteína reactivo, tal como un anticuerpo modificado por ingeniería con cisteína o un anticuerpo tratado previamente con un agente reductor tal como DTT para reducir las uniones disulfuro, se hace reaccionar con 1,11-bis-maleimidotrietilenglicol (BM(PEO)₃) (Pierce BioTechnology, ThermoScientific), dejando un grupo maleimido sin reaccionar en la superficie del anticuerpo. Esto se puede conseguir por disolución de BM(PEO)₃ en una mezcla al 50 % de etanol/agua hasta una concentración de 10 mM y adición de un exceso 10 veces molar a una solución que contiene el anticuerpo en solución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y dejándola reaccionar durante 1 hora para formar un compuesto intermedio de anticuerpo-conector, Ab-PEO. El exceso de BM(PEO)₃ se retira mediante filtración en gel (columna HiTrap, Pharmacia) en tampón citrato 30 mM, a pH 6 con NaCl 150 mM. Se disuelve un exceso aproximadamente 10 veces molar de PNU (159682) modificado con tiol en dimetil acetamida (DMA) y se añade el compuesto intermedio Ab-PEO. También se puede emplear dimetil formamida (DMF) para disolver el reactivo del resto de fármaco. La mezcla de reacción se deja reaccionar durante una noche antes de filtración en gel o diálisis en PBS para retirar el PNU (159682) sin reaccionar. Se usa filtración en gel de columnas S200 en PBS para retirar los agregados de alto peso molecular y proporcionar Ab-PEO-PNU (159682) purificado.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco representado por la estructura:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

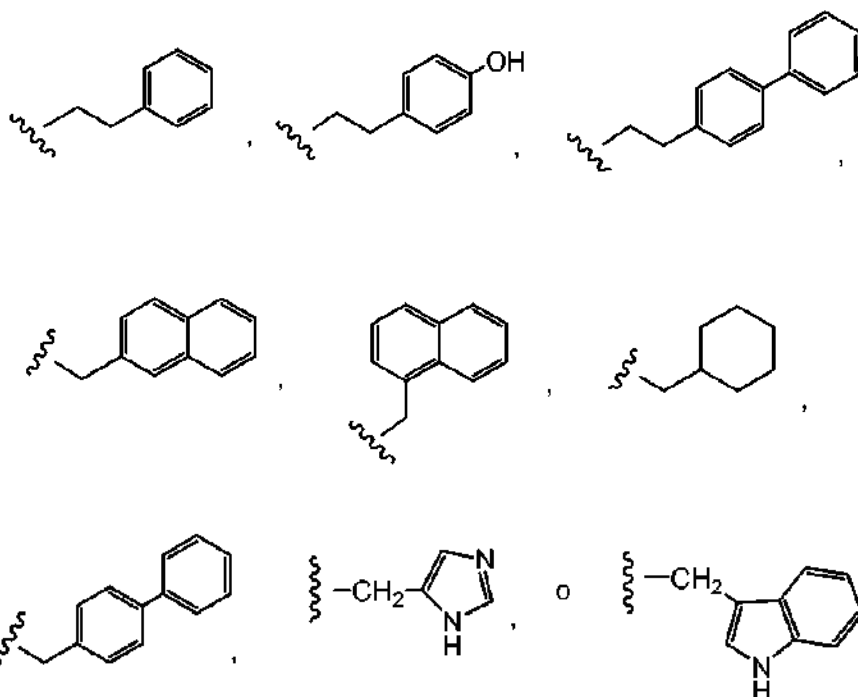
Ab es un anticuerpo;

Y¹ es C(O)(C(R¹⁰)₂)_q, (C(R¹⁰)₂)_q o (C(R¹⁰)₂)_qO(C(R¹⁰)₂)_q;

q es 2, 3, 4, 5 o 6,

Y² es O, NR¹⁰, S, OC(O)NR¹⁰-(alquil C₁-C₆)-NR¹⁰;

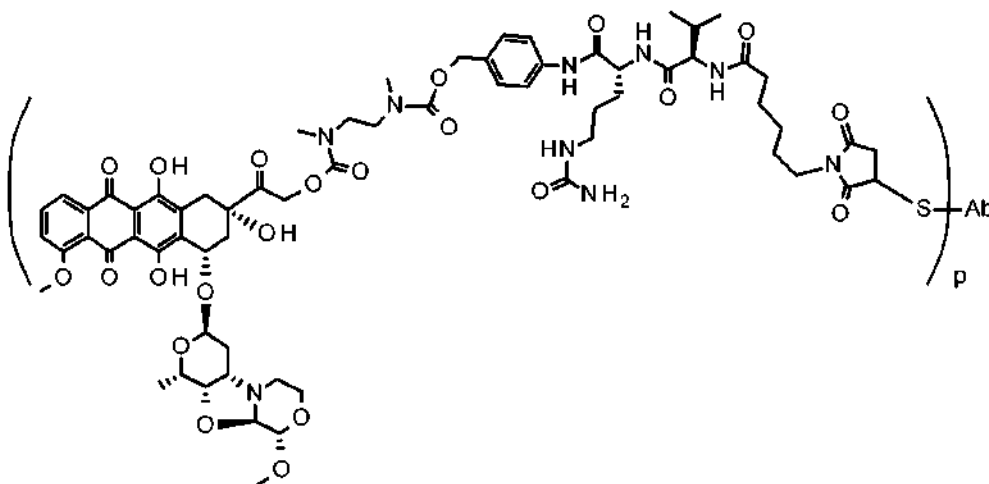
R¹ y R² son independientemente una cadena lateral de aminoácido seleccionada entre hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo y las estructuras:



cada R¹⁰ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, carbociclilo C₃-C₁₂, heterociclilo C₂-C₂₀, arilo C₆-C₂₀ y heteroarilo C₁-C₂₀, opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, I, -CH₂OH, -CH₂C₆H₅, -CN, -CF₃, -CO₂H, -CONH₂, -

CONHCH₃, -NO₂, -N(CH₃)₂, -NHCOCH₃, -NHS(O)₂CH₃, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -S(O)₂NH₂ y -S(O)₂CH₃;
n es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7; y
p es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

- 5 2. El compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 que tiene la siguiente estructura:



- 10 3. El compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que Ab es un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumor o receptores de superficie celular seleccionados entre (1)-(36):

- (1) BMPR1B (receptor de tipo IB de proteína morfogénica ósea);
- (2) E16 (LAT1, SLC7A5);
- 15 (3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata);
- (4) 0772P (CA125, MUC16);
- (5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor de potenciación de megacariocitos, mesotelina);
- (6) Napi3b (NAPI-3B, NPT1b, SLC34A2, familia de transportadores de soluto 34 (fosfato sódico), miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio de tipo II 3b);
- 20 (7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, Semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (de tipo1 y similar al tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplasmático corto, (semaforina) 5B);
- (8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN cDNA 2700050C12, gen RIKEN cDNA 2700050C12);
- (9) ETBR (Receptor de endotelina de tipo B);
- 25 (10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315);
- (11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis dominios transmembrana);
- (12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canal catiónico de potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4);
- 30 (13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma);
- (14) CD21 (CR2 (Receptor de complemento 2) o C3DR (receptor de C3d/virus de Epstein Barr) o Hs 73792);
- (15) CD79b (CD79B, CD79β, Igb (asociado a inmunoglobulina beta), B29);
- (16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (proteína 1a de anclaje a fosfatasa que contiene el dominio SH2), SPAP1B, SPAP1C);
- 35 (17) HER2;
- (18) NCA;
- (19) MDP;
- (20) IL20Rα;
- 40 (21) Brevican;
- (22) EphB2R;
- (23) ASLG659;
- (24) PSCA;
- (25) GEDA;
- 45 (26) BAFF-R (receptor del factor de activación de linfocitos B, receptor BLyS 3, BR3);
- (27) CD22 (isoforma del receptor de linfocitos B CD22-B);
- (28) CD79a (CD79A, CD79α, asociado a inmunoglobulina alfa);

- (29) CXCR5 (receptor del linfoma de Burkitt 1);
 (30) HLA-DOB (Subunidad beta de la molécula MHC de clase II (antígeno Ia));
 (31) P2X5 (Canal iónico 5 abierto por ligando del receptor purinérgico P2X);
 (32) CD72 (antígeno CD72 de diferenciación de linfocitos B, Lyb-2);
 (33) LY64 (Antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repetición rica en leucina (LRR));
 (34) FcRH1 (proteína 1 de tipo receptor de Fc);
 (35) IRTA2 (Receptor 2 asociado a translocación de la superfamilia de inmunoglobulinas); y
 (36) TENB2 (proteoglicano transmembrana putativo).

4. El compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que Ab es un anticuerpo modificado por ingeniería con cisteína.

5. El compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que Ab es un anticuerpo que se une a un receptor ErbB.

6. El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 5 en el que Ab es trastuzumab.

7. El compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que p es 1, 2, 3 o 4.

8. Composición que comprende una mezcla del compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la carga de fármaco promedio por anticuerpo en la mezcla de compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco es de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, y opcionalmente es de aproximadamente 3 a aproximadamente 4.

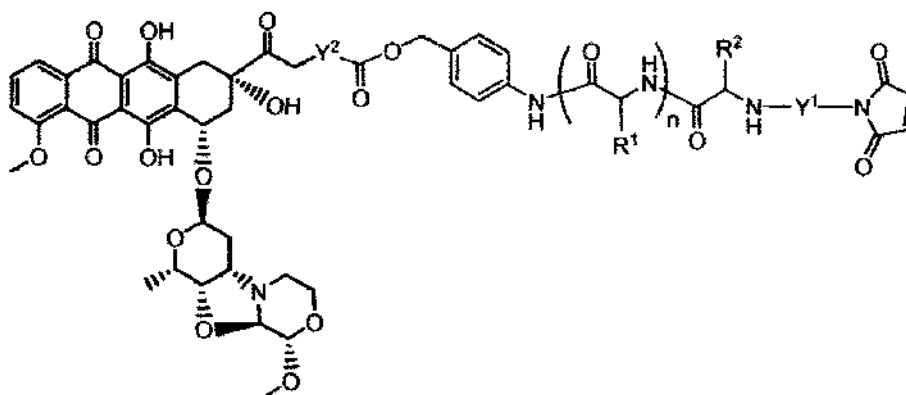
9. Composición farmacéutica que comprende la composición de la reivindicación 8, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables, y que opcionalmente comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico.

10. Método *ex vivo* de inhibición de proliferación celular que comprende tratar células de mamífero en un medio de cultivo celular con un compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, mediante el cual se inhibe la proliferación de las células.

11. Compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en un método de tratamiento de cáncer, comprendiendo el método administrar a un paciente una formulación del compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco.

12. El compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde se administra al paciente un agente quimioterapéutico, en combinación con el compuesto de conjugado anticuerpo-fármaco.

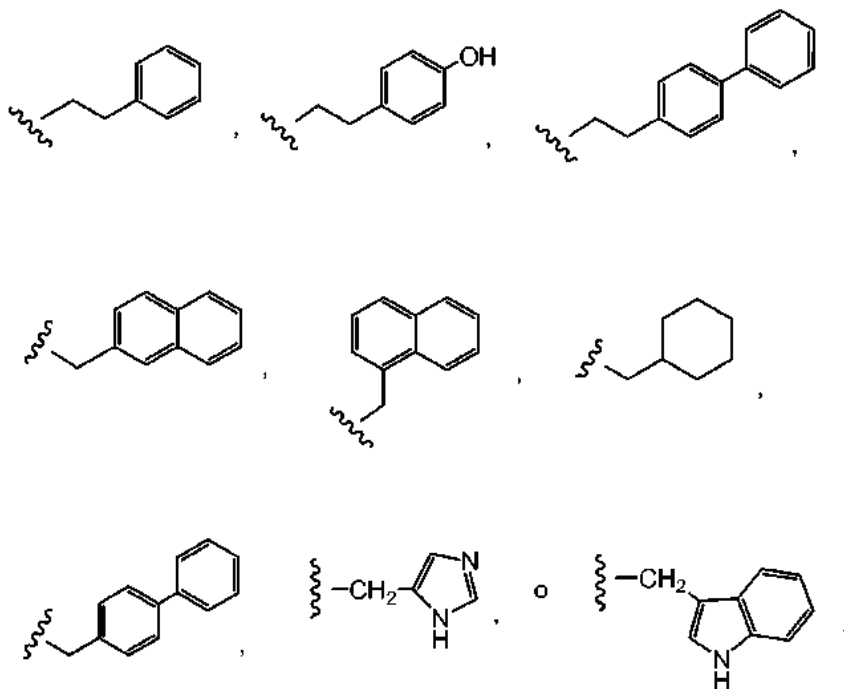
13. Reactivo de fármaco-conector seleccionado entre las estructuras:



en la que:

- Y^1 es $C(O)(C(R^{10})_2)_q$, $(C(R^{10})_2)_q$, o $(C(R^{10})_2)_qO(C(R^{10})_2)_q$;
 q es 2, 3, 4, 5 o 6,
 Y^2 es O, NR^{10} , S, $OC(O)NR^{10}$ -(alquil C_1 - C_6)- NR^{10} ;

- 5 R¹ y R² son independientemente una cadena lateral de aminoácido seleccionada entre hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo y las estructuras:



- 10 cada R¹⁰ se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁-C₈, alquenilo C₂-C₈, alquinilo C₂-C₈, carbociclilo C₃-C₁₂, heterociclilo C₂-C₂₀, arilo C₆-C₂₀ y heteroarilo C₁-C₂₀, opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente entre F, Cl, Br, I, -CH₂OH, -CH₂C₆H₅, -CN, -CF₃, -CO₂H, -CONH₂, -CONHCH₃, -NO₂, -N(CH₃)₂, -NHCOCH₃, -NHS(O)₂CH₃, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -S(O)₂NH₂ y -S(O)₂CH₃;
- 15 y n es 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

14. El reactivo de fármaco-conector de la reivindicación 13 que tiene la siguiente estructura:

