

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 641**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C07K 5/06 (2006.01)
C07K 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2003 E 11165210 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2357006**

54 Título: **Conjugados de fármacos y su uso para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa**

30 Prioridad:

31.07.2002 US 400403 P

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

19.01.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SENER, PETER D.;
DORONINA, SVETLANA y
TOKI, BRIAN E.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 556 641 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de fármacos y su uso para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a conjugados de fármaco-enlazador-ligando y a compuestos de fármaco-enlazador, para composiciones que comprenden un conjugado de fármaco-enlace-ligando o un compuesto de fármaco-enlazador, y al uso de los mismos para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

2. Antecedentes de la invención

10 Se han aislado varios compuestos peptídicos cortos de fuentes naturales y se ha descubierto que éstos poseen actividad biológica. También se han preparado análogos de estos compuestos y se descubrió que algunos tenían actividad biológica. Por ejemplo, la auristatina E (patente US 5.635.483 de Pettit et al.) es un análogo sintético del producto marino natural dolastatina 10, un agente que inhibe la polimerización de la tubulina uniéndose al mismo sitio en la tubulina que el fármaco contra el cáncer vincristina ((G. R. Pettit, Prog. Chem. Org. Nat. Prod., 70: 1-79 (1997)). La dolastatina 10, la auristatina PE y la auristatina E son péptidos lineales que tienen cuatro aminoácidos, de los cuales tres son exclusivos de la clase dolastatina de los compuestos. Tanto la dolastatina 10 como la auristatina PE están siendo utilizadas en ensayos clínicos en humanos para tratar el cáncer. Las diferencias estructurales entre la dolastatina 10 y la auristatina E residen en el residuo terminal C, en el que el grupo tiazolfeniletilamino de la dolastatina 10 se sustituye por una unidad de norefedrina en la auristatina E.

15

Las siguientes referencias describen compuestos de dolastatina y auristatina y sus análogos, y su uso para tratar el cáncer:

20 Publicación Internacional nº WO 96/33212 A1 a nombre de Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.;

Publicación Internacional nº WO 96/14856 A1 a nombre de Arizona Board of Regents;

Publicación de patente europea nº EP 695757 A2 a nombre de Arizona Board of Regents;

Publicación de patente europea nº EP 695758 A2 a nombre de Arizona Board of Regents;

Publicación de patente europea nº EP 695759 A2 a nombre de Arizona Board of Regents;

25 Publicación Internacional nº WO 95/09864 A1 a nombre de Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.;

Publicación Internacional nº WO 93/03054 A1 a nombre de Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.;

Patente US 6.323.315 B1 a nombre de Pettit et al.;

G.R. Pettit et al., Anti-Cancer Drug Des. 13(4): 243-277 (1998);

G.R. Pettit et al., Anti-Cancer Drug Des. 10(7): 529-544 (1995); y

30 K. Miyazaki et al., Chem. Pharm. Bull. 43(10), 1706-18 (1995).

A pesar de los datos in vitro de los compuestos de la clase de la dolastatina y su análogo, los importantes efectos tóxicos generales en las dosis necesarias para lograr un efecto terapéutico comprometen su eficacia en estudios clínicos. En consecuencia, existe una clara demanda en la técnica de derivados de dolastatina que tengan una toxicidad significativamente menor pero una eficacia terapéutica útil, en comparación con las terapias con fármacos de dolastatina actuales.

35

El enunciado de cualquier referencia en la Sección 2 de esta solicitud no quiere decir que se admita que la referencia constituya la técnica anterior a esta solicitud.

3. Sumario de la invención

40 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos, que comprende compuestos de la fórmula Ia:



Ia

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos en los que,

L- es un anticuerpo monoclonal que se une inmunoespecíficamente al antígeno CD30;

-A- es una unidad de extensor;

a es 1;

5 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

w es un número entero que varía de 2 a 12;

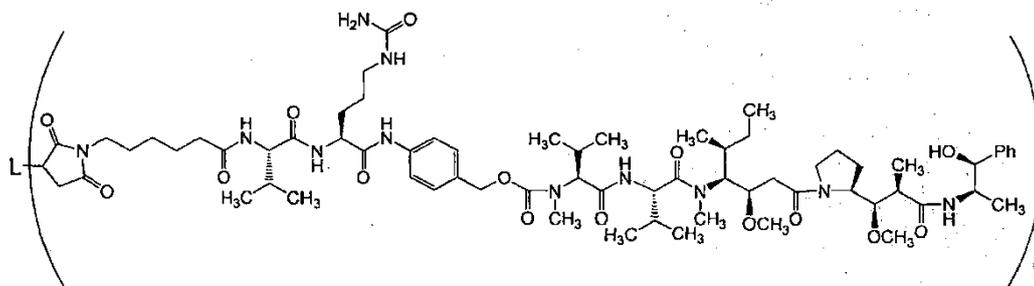
- Y- es una unidad de espaciador que se autoinmola;

y es 1 ó 2;

10 p varía de 1 a alrededor de 20, y es el número promedio de unidades -A_a-W_w-Y_y-D por anticuerpo en la composición; y

- D es una unidad de fármaco,

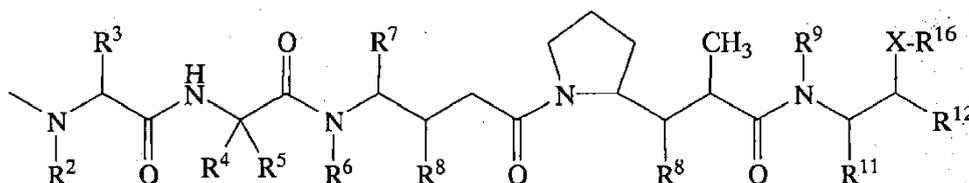
en el que los compuestos de fórmula la tienen la estructura



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15 Un compuesto de fórmula Ia, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo (un conjugado de "fármaco-enlazador-ligando") es útil para tratar o prevenir el cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en un animal.

También se describen compuestos de fármaco-ligando de la fórmula IIa:



20 y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

donde, de forma independiente en cada lugar:

25 R¹ se selecciona de -H, -C₁-C₈ alquilo y -C₃-C₈ carbociclo; y R² se selecciona de -H y -C₁-C₈ alquilo; o R¹ y R² juntos, tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n, donde R^a y R^b se seleccionan independientemente de -H, -C₁-C₈ alquilo y -C₃-C₈ carbociclo y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de nitrógeno al que están unidos;

R³ se selecciona de -H, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo);

30 R⁴ se selecciona de -H, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo) donde R⁵ se selecciona de -H y -metilo;

o R⁴ y R⁵ juntos, tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n- donde R^a y R^b se seleccionan independientemente de -H, -C₁-C₈ alquilo y -C₃-C₈ carbociclo y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos;

R⁶ se selecciona de -H y -C₁-C₈ alquilo;

5 R⁷ se selecciona de -H, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo);

cada R⁸ se selecciona independientemente de -H, -OH, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo y -O-(C₁-C₈ alquilo);

R⁹ se selecciona de -H y -C₁-C₈ alquilo;

X es -O-, -S-, -NH- o -N(R¹⁴)-;

10 R¹¹ se selecciona de -H, -OH, -NH₂, -NHR¹⁴, -N(R¹⁴)₂, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo); o R¹¹ es un átomo de oxígeno que forma una unidad de carbonilo (C=O) con el átomo de carbono al cual está unido y un átomo de hidrógeno en este átomo de carbono se sustituye por uno de los enlaces en el enlace doble (C=O);

cada R¹² se selecciona independientemente de -arilo y -C₃-C₈ heterociclo;

15 cada R¹⁴ es independientemente -H o -C₁-C₈ alquilo; y

R¹⁶ es -Y_y-W_w-A'

donde

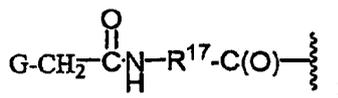
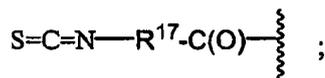
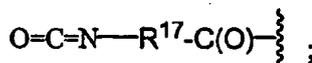
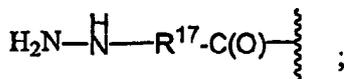
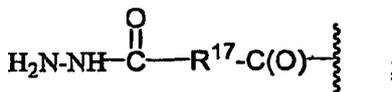
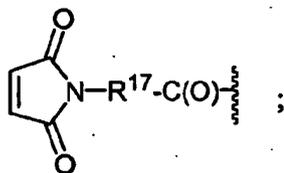
cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

-Y- es una unidad de espaciador;

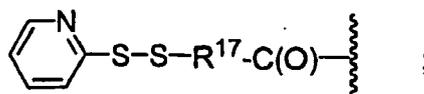
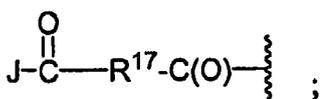
20 w es un número entero que varía de 0 a 12;

y es 0, 1 ó 2; y

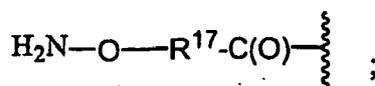
-A' se selecciona de



25



y



donde

G se selecciona de -Cl, -Br, -I, -O-mesilo y -O-tosilo;

5 J se selecciona de -Cl, -Br, -I, -F, -OH, -O-N-succinimida, -O-(4-nitrofenilo), -O-pentafluorofenilo, -O-tetrafluorofenilo y -O-C(O)-OR¹⁸;

10 R¹⁷ se selecciona de -C₁-C₁₀ alquileo-, -C₃-C₈ carbociclo-, -O-(C₁-C₈ alquil)-, -arileno-, -C₁-C₁₀ alquileo-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀ alquileo-, -C₁-C₁₀ alquileo-(C₃-C₈ carbociclo)-, -(C₃-C₈ carbociclo)-C₁-C₁₀ alquileo-, -C₃-C₈ heterociclo-, -C₁-C₁₀ alquileo-(C₃-C₈ heterociclo)-, -(C₃-C₈ heterociclo)-C₁-C₁₀ alquileo-, -(CH₂CH₂O)_r- y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-;

r es un número entero que varía de 1-10; y

R¹⁸ es -C₁-C₈ alquilo o -arilo.

15 Un compuesto de la fórmula Ila o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo (un compuesto de "fármaco-enlazador") es útil para tratar el cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en un animal o sirve como intermediario para la síntesis de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

También se describen composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando y un soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describen composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador y un soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 También se describen métodos para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

También se describen métodos para tratar cáncer, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador.

25 También se describen métodos para tratar cáncer, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

También se describen métodos para eliminar o inhibir la replicación de una célula que exprese un anticuerpo autoinmune, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador.

30 También se describen métodos para eliminar o inhibir la replicación de una célula que exprese un anticuerpo autoinmune, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

También se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador.

35 También se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

También se describen métodos para tratar una enfermedad infecciosa, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador.

40 También se describen métodos para tratar una enfermedad infecciosa, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

También se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador.

También se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

5 También se describen métodos para prevenir el cáncer, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador.

También se describen métodos para prevenir el cáncer, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

10 También se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula que exprese un anticuerpo autoinmune, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador.

También se describen métodos para prevenir la multiplicación de una célula que exprese un anticuerpo autoinmune, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

15 También se describen métodos para prevenir una enfermedad autoinmune, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador.

También se describen métodos para prevenir una enfermedad autoinmune, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

También se describen métodos para prevenir una enfermedad infecciosa, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de fármaco-enlazador.

20 También se describen métodos para prevenir una enfermedad infecciosa, que comprenden administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

También se describe un compuesto de fármaco-enlazador que puede ser utilizado como producto intermedio para la síntesis de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

25 La presente invención se puede entender con más detalle con referencia a la siguiente descripción detallada, las figuras y los ejemplos ilustrativos, que están destinados a ilustrar las realizaciones de la invención.

4. Descripción breve de los dibujos

FIG. 1 muestra la citotoxicidad del compuesto 49 y del compuesto 53 contra la línea celular H3396. La línea -D- representa el compuesto 49 y la línea -o- representa el compuesto 53.

30 FIG. 2 muestra la citotoxicidad de los compuestos 64, 65, 68 y 69 contra la línea celular H3396. La línea -◆- representa el compuesto 64, la línea -■- representa el compuesto 65, la línea -▲- representa el compuesto 68, y la línea -X- representa el compuesto 69.

FIG. 3 muestra la citotoxicidad de los compuestos 64, 65, 68 y 69 contra la línea celular HCT-116. La línea -◆- representa el compuesto 64, la línea -■- representa el compuesto 65, la línea -▲- representa el compuesto 68, y la línea -X- representa el compuesto 69.

35 FIG. 4 muestra la citotoxicidad de los compuestos 66 y 68 contra la línea celular H3396. La línea -□- representa el compuesto 66 y la línea -*- representa el compuesto 68.

FIG. 5 muestra la citotoxicidad de los compuestos 66, 68 y 69 contra la línea celular colorrectal humana Karpas. La línea -◆- representa el compuesto 66, la línea -▲- representa el compuesto 68 y la línea -X- representa el compuesto 69.

40 FIG. 6 muestra la citotoxicidad de los compuestos 66 y 67 contra la línea celular H3396 en función de la duración de exposición. Las células se expusieron a los conjugados durante todo el tiempo que duró el ensayo, sin lavar (96 horas), o fueron expuestas a los conjugados durante 2 horas, lavadas y luego incubadas durante otras 94 horas. Al final del periodo de 96 horas, las células fueron pulsadas con azul Alamar para determinar la viabilidad celular. La línea -□- representa el compuesto 66 con una exposición de 2 h, la línea -- representa el compuesto 67 con una
45 exposición de 2 h, la línea -.- representa el compuesto 66 con una exposición de 96 h, y la línea - - representa el compuesto 67 con una exposición de 96 h.

FIG. 7 muestra el efecto de los compuestos 66-69 en el crecimiento de tumores en un aloinjerto de adenocarcinoma pulmonar humano L2987, que se implantaron en ratones calvos. La línea -X- representa el tumor sin tratar, la línea -

▼ - representa el compuesto 66, la línea -◆- representa el compuesto 68, la línea -V- representa el compuesto 67 y la línea -◇- representa el compuesto 69.

FIG. 8 muestra los efectos de los compuestos 66-69 en el crecimiento de tumores en un aloinjerto de linfoma de células grandes anaplásico humano que se implantaron en ratones calvos. La línea -X- representa el tumor sin tratar, la línea -A- representa el compuesto 67, la línea -•- representa el compuesto 69, la línea -△- representa el compuesto 66 y la línea -o- representa el compuesto 68.

5. Descripción detallada de la invención

5.1 definiciones

Los ejemplos de un "animal" incluye, aunque no exclusivamente, humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro, gato, pájaro y aves de corral. "Ariilo" se refiere a un grupo aromático carbocíclico. Ejemplos de grupos ariilo incluyen, aunque no exclusivamente, fenilo, naftilo y antraceno. Un grupo aromático carbocíclico o un grupo aromático heterocíclico puede ser sustituido o no sustituido con uno o más grupos, incluyendo, aunque no exclusivamente, $-C_1-C_8$ alquilo, $-O-(C_1-C_8)$ alquilo, -arilo, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, halógeno, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ y $-CN$, donde cada R' se selecciona independientemente de $-C_1-C_8$ alquilo y ariilo.

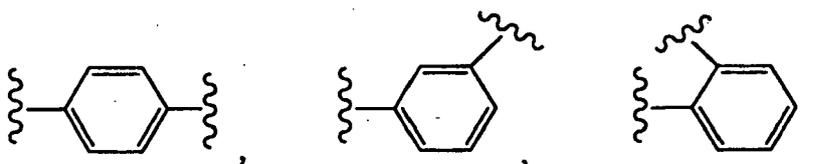
El término " C_1-C_8 alquilo", como se usa aquí se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos " C_1-C_8 alquilo" representativos incluyen, aunque no exclusivamente, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo, -n-octilo, -n-nonilo y -n-decilo; mientras que los C_1-C_8 alquilos incluyen, aunque no exclusivamente, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -*terc*-butilo, -isopentilo, 2-metilbutilo, los C_1-C_8 alquilos incluyen, aunque no exclusivamente, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, -3-metil-1-butinilo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *n*-hexilo, isohexilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2,3,4-trimetilpentilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 3,5-dimetilhexilo, 2,4-dimetilheptilo, 2-metilheptilo, 3-metilheptilo, *n*-heptilo, isoheptilo, *n*-octilo, e isooctilo. Un grupo C_1-C_8 alquilo puede ser sustituido o no sustituido con uno o más grupos, incluyendo, aunque no exclusivamente, $-C_1-C_8$ alquilo, $-O-(C_1-C_8)$ alquilo, -arilo, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, halógeno, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ y $-CN$, donde cada R' se selecciona independientemente de $-C_1-C_8$ alquilo y ariilo.

Un " C_3-C_8 carbociclo" es un anillo de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros carbocíclicos no aromático saturado o insaturado. Los C_3-C_8 carbociclos representativos incluyen, aunque no exclusivamente, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo y -ciloctadienilo. Un grupo C_3-C_8 carbociclo puede ser sustituido o no sustituido con uno o más grupos, incluyendo, aunque no exclusivamente, $-C_1-C_8$ alquilo, $-O-(C_1-C_8)$ alquilo, -arilo, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, halógeno, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ y $-CN$, donde cada R' se selecciona independientemente de $-C_1-C_8$ alquilo y ariilo.

Un " C_3-C_8 carbociclo" se refiere a un grupo C_3-C_8 carbociclo definido arriba donde uno de los átomos de hidrógeno de los grupos carbociclo es sustituido con un enlace.

Un " C_1-C_{10} alquilenilo" es un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal de la fórmula $-(CH_2)_{1-10}-$. Ejemplos de un grupo C_1-C_{10} alquilenilo incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

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



en el que el grupo fenilo puede ser sustituido o no sustituido con hasta cuatro grupos, incluyendo, aunque no exclusivamente, $-C_1-C_8$ alquilo, $-O-(C_1-C_8)$ alquilo, -arilo, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-$

$C(O)N(R')_2$ -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente de -C₁-C₈ alquilo y arilo.

Un "C₃-C₈ heterociclo" se refiere a un anillo aromático o no aromático C₃-C₈ carbociclo en el que de uno a cuatro de los átomos de carbono son independientemente sustituidos con un heteroátomo del grupo formado por O, S y N. Los ejemplos representativos de un C₃-C₈ heterociclo incluyen, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un grupo C₃-C₈ heterociclo puede ser sustituido o no sustituido con hasta siete grupos, incluyendo, -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente de -C₁-C₈ alquilo y arilo.

Un "C₃-C₈ heterociclo" se refiere a un grupo C₃-C₈ heterociclo definido arriba donde uno de los átomos de hidrógeno de los grupos heterociclo es sustituido con un enlace. Un grupo C₃-C₈ heterociclo puede ser sustituido o no sustituido con hasta seis grupos, incluyendo, -C₁-C₈ alquilo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂ -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente de -C₁-C₈ alquilo y arilo.

Un "compuesto de la invención" es un compuesto de fármaco-enlazador o un conjugado de fármaco-enlazador-ligando.

En una forma de realización, los compuestos de la invención están en forma aislada o purificada. Como se usa aquí, "aislado", significa separado de los demás componentes de (a) una fuente natural, tal como una célula vegetal o animal o cultivo celular, o (b) una mezcla de reacción química orgánica sintética. Como se usa aquí, "purificado" significa que, cuando se aísla, el aislamiento contiene al menos el 95%, preferentemente al menos 98%, de un compuesto de la invención en peso del producto aislado.

Los ejemplos de un "grupo protector hidroxilo" incluyen éter metoximetílico, éter 2-metoxietoximetílico, éter tetrahidropirranílico, éter bencílico, éter p-metoxibencílico, éter trimetilsilílico, éter triisopropilsilílico, éter t-butildimetilsilílico, éter trifenilmetsilílico, éster de acetato, ésteres de acetato sustituidos, pivaloato, benzoato, metanosulfonato y p-toluenosulfonato.

"Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que puede ser sustituido por otro grupo funcional. Tales grupos salientes son muy conocidos en la técnica, y los ejemplos incluyen un haluro (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluenosulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato), y trifluorometilsulfonato.

El término "anticuerpo", como se usa aquí, se refiere a 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 del antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de un objetivo de interés o parte del mismo, estos objetivos, incluyendo células cancerosas o células que producen autoanticuerpos autoinmunes asociados con una enfermedad autoinmune. La inmunoglobulina descrita en la presente memoria puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden provenir de cualquier especie. Preferiblemente, sin embargo, la inmunoglobulina es de origen humano, murino o de conejo. Los anticuerpos útiles en la invención son monoclonales, e incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fv, Fab, fragmentos "F(ab')", fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos antiidiotipo (anti-Id), CDR, y fragmentos de unión de epítomos de alguno de los anteriores que se una inmunoespecíficamente al antígeno CD30.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa aquí, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Los compuestos de la invención contienen al menos un grupo amino, y en consecuencia, se pueden formar sales de adición ácidas con este grupo amino. Las sales preferidas incluyen 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, glucaronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula como un ión de acetato, un ión de succinato u otros contraiones. El contraión puede ser cualquier porción orgánica o inorgánica que estabilice la carga en el compuesto original. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en que varios átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener varios contraiones. Así pues, 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 solventes y un compuesto de la invención. Los ejemplos de solventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

5 En el contexto del cáncer, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todo de lo siguiente: prevenir el crecimiento de células tumorales o células cancerosas, prevenir la replicación de las células tumorales o células cancerosas, disminuir el volumen total del tumor y mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

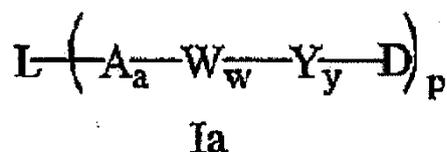
10 En el contexto de una enfermedad autoinmune, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todo de lo siguiente: prevenir la replicación de las células asociadas con un estado de enfermedad autoinmune, incluyendo, aunque no exclusivamente, las células capaces de producir un anticuerpo autoinmune, disminuir la cantidad de anticuerpos autoinmunes y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.

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

15 Las siguientes abreviaturas se utilizan en la presente memoria y tienen las definiciones que se indican: AE es auristatina E, Boc es *N*-(*t*-butoxicarbonilo), cit es citrulina, DAP es dolaproina, DCC es 1,3-diciclohexilcarbodiimida, DCM es diclorometano, DEA es dietilamina, DEAD es dietilo, DEPC es dietilfosforilcianidato, DIAD es diisopropilazodicarboxilato, DIEA es *N,N*-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleuina, DMAP es 4-dimetilaminopiridina, DME es éter dimetilico de etilenglicol (o 1,2-dimetoxietano), DMF es *N,N*-dimetilformamida, DMSO es dimetilsulfóxido, doe es dolafenina, dov es *N,N*-dimetilvalina, DTNB es 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), DTPA es ácido dietilentriaminopentaacético, DTT es ditioneitol, EDCI es hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida, EEDQ es 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina, ES-MS es espectrometría de masas con electrospray, EtOAc es acetato de etilo, Fmoc es *N*-(9-fluorenilmetoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N,N'*-tetrametiluronio, HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeCN es acetonitrilo, MeOH es metanol, Mtr es 4-anisildifenilmétilo (o 4-metoxitritilo), nor es (1*S*,2*R*)-(+)-norefedrina, PAB es *p*-aminobencilo, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), PEG es polietilenglicol, Ph es fenilo, Pnp es *p*-nitrofenilo, MC es 6-maleimidocaproilo, Ph es fenilo, phe es *L*-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio, SEC es tamaño con exclusión por tamaño, Su es succinimida, TFA es ácido trifluoroacético, TLC es cromatografía de capa fina, UV es ultravioleta, val es valina.

30 5.2 conjugados de fármaco-enlazador-ligando

Como se ha indicado arriba, la invención proporciona de la fórmula Ia: una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos, que comprende compuestos de la fórmula Ia:



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos en los que,

35 L- es un anticuerpo monoclonal que se une inmuno-específicamente al antígeno CD30;

-A- es una unidad de extensor;

a es 1;

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

w es un número entero que varía de 2 a 12;

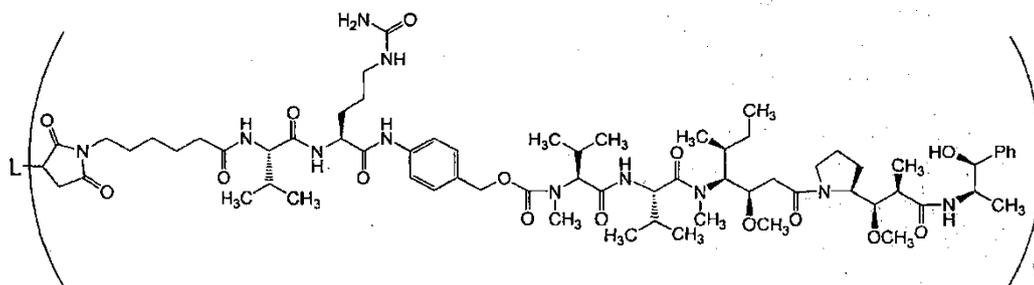
40 - Y- es una unidad de espaciador que se autoinmola;

y es 1 ó 2;

p varía de 1 a alrededor de 20, y es el número promedio de unidades -A_a-W_w-Y_y-D por anticuerpo en la composición; y

- D es una unidad de fármaco,

en el que los compuestos de fórmula la tienen la estructura



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En una forma de realización, p varía de 1 a alrededor de 8.

5 En otra forma de realización, p varía de 1 a alrededor de 3.

En otra forma de realización, p varía de alrededor de 3 a alrededor de 5.

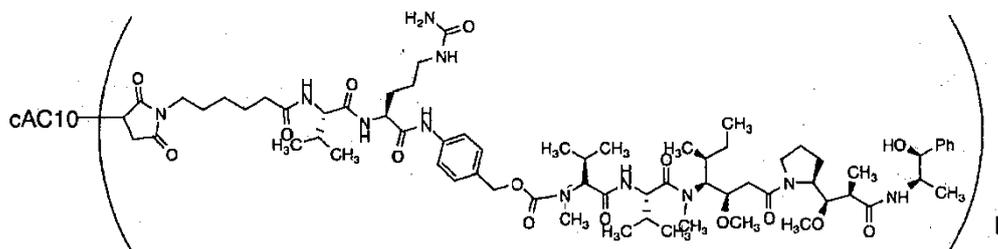
En otra forma de realización más, p varía de alrededor de 7 a alrededor de 9.

En otra forma de realización, p es alrededor de 8.

En otra forma de realización, p es alrededor de 4.

10 En otra forma de realización, p es alrededor de 2.

Un compuesto ilustrativo de la fórmula la tiene la estructura:



y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo,

donde p varía de alrededor de 7 a alrededor de 9.

15 En una forma de realización, p varía de 1 a alrededor de 3.

En otra forma de realización, p varía de alrededor de 3 a alrededor de 5.

En otra forma de realización, p es alrededor de 8.

En otra forma de realización más, p es alrededor de 4.

En otra forma de realización, p es alrededor de 2.

20 Se entiende que p es el número promedio de unidades de A_a-W_w-Y_y-D por ligando en un conjugado de fármaco-enlazador-ligando de la fórmula la.

En una forma de realización, p varía de 1 a 15.

En otra forma de realización, p varía de 1 a 10.

En otra forma de realización, p varía de 1 a alrededor de 8.

25 En otra forma de realización, p varía de 1 a alrededor de 5.

En otra forma de realización, p varía de 1 a alrededor de 3.

En una forma de realización, p varía de alrededor de 3 a alrededor de 5.

En una forma de realización, p varía de alrededor de 7 a alrededor de 9.

En otra forma de realización, p es alrededor de 8.

En otra forma de realización más, p es alrededor de 4.

5 En otra forma de realización más, p es alrededor de 2.

Los conjugados de fármaco-enlazador-ligando de la fórmula la pueden existir en forma de mezclas, donde cada componente de una mezcla tiene un valor de p diferente. Por ejemplo, un conjugado de fármaco-enlazador-ligando puede existir como una mezcla de dos conjugados separados, con un componente del conjugado en el que p es 7 y el otro componente del conjugado en el que p es 8.

10 En una forma de realización, un conjugado de fármaco-enlazador-ligando existe como una mezcla de tres conjugados separados en el que p para los tres conjugados separados es 1, 2 y 3, respectivamente.

En otra forma de realización, un conjugado de fármaco-enlazador-ligando existe como una mezcla de tres conjugados separados en el que p para los tres conjugados separados es 3, 4 y 5, respectivamente.

15 En otra forma de realización, un conjugado de fármaco-enlazador-ligando existe como una mezcla de tres conjugados separados en el que p para los tres conjugados separados es 5, 6 y 7, respectivamente.

En otra forma de realización más, un conjugado de fármaco-enlazador-ligando existe como una mezcla de tres conjugados separados en el que p para los tres conjugados separados es 7, 8 y 9, respectivamente.

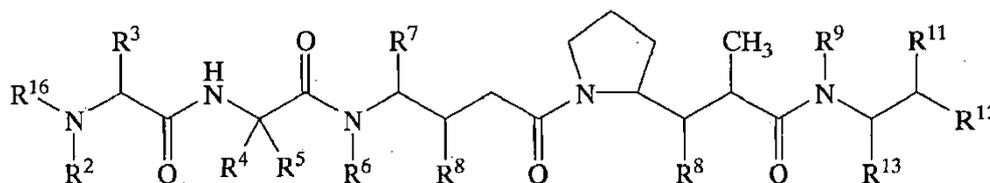
En otra forma de realización más, un conjugado de fármaco-enlazador-ligando existe como una mezcla de tres conjugados separados en el que p para los tres conjugados separados es 9, 10 y 11, respectivamente.

20 En otra forma de realización más, un conjugado de fármaco-enlazador-ligando existe como una mezcla de tres conjugados separados en el que p para los tres conjugados separados es 11, 12 y 13, respectivamente.

En otra forma de realización, un conjugado de fármaco-enlazador-ligando existe como una mezcla de tres conjugados separados en el que p para los tres conjugados separados es 13, 14 y 15, respectivamente.

5.3 COMPUESTOS DE FÁRMACO-ENLAZADOR

25 También se describen los compuestos de la fórmula Iii:



III

y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

donde, de forma independiente en cada lugar:

R² se selecciona de -H y -C₁-C₈ alquilo;

30 R³ se selecciona de -H, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo);

R⁴ se selecciona de -H, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo) donde R⁵ se selecciona de -H y -metilo; o R⁴ y R⁵ juntos, tienen la fórmula - (CR^aR^b)_n- donde R^a y R^b se seleccionan independientemente de -H, C₁-C₈ alquilo y -C₃-C₈ carbociclo y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos;

35

R⁶ se selecciona de -H y -C₁-C₈ alquilo;

R⁷ se selecciona de -H, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo);

cada R⁸ se selecciona independientemente de -H, -OH, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo y -O-(C₁-C₈ alquilo);

R⁹ se selecciona de -H y -C₁-C₈ alquilo;

- 5 R¹¹ se selecciona de -H, -OH, -NH₂, -NHR¹⁴, -N(R¹⁴)₂, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo); o R¹¹ es un átomo de oxígeno que forma una unidad de carbonilo (C=O) con el átomo de carbono al cual está unido y un átomo de hidrógeno en este átomo de carbono se sustituye por uno de los enlaces en el enlace doble (C=O);

cada R¹² se selecciona independientemente de -arilo y -C₃-C₈ heterociclo;

- 10 R¹³ se selecciona de hidrógeno, -OH, -NH₂, -NHR¹⁴, -N(R¹⁴)₂, C₁-C₈ alquilo, C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y alquil-(C₃-C₈ heterociclo);

cada R¹⁴ es independientemente -H o -C₁-C₈ alquilo;

R¹⁶ es -Y_y-W_w-A'

donde

- 15 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

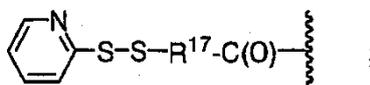
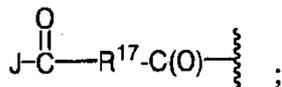
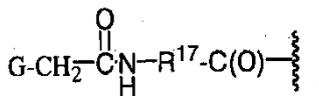
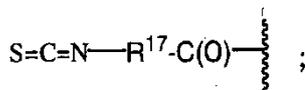
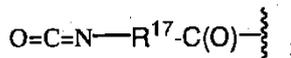
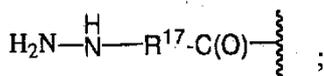
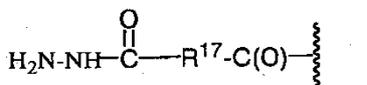
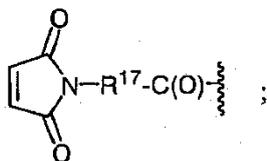
-Y- es una unidad de espaciador;

w es un número entero que varía de 0 a 12;

y es 0, 1 ó 2; y

-A' se selecciona de

20



y

25



donde

G se selecciona de -Cl, -Br, -I, -O-mesilo y -O-tosilo;

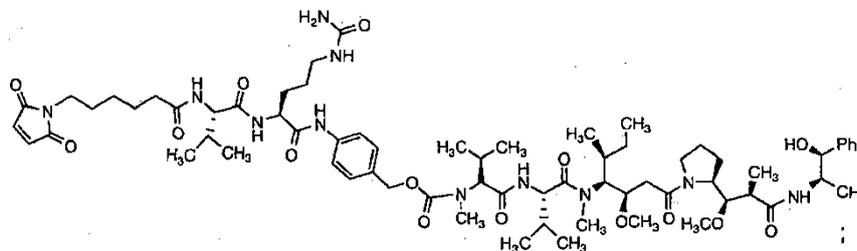
J se selecciona de -Cl, -Br, -I, -F, -OH, -O-N-succinimida, -O-(4-nitrofenilo), -O-pentafluorofenilo, -O-tetrafluorofenilo y -O-C(O)-OR¹⁸;

- 30 R¹⁷ se selecciona de -C₁-C₁₀ alquilen-, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo)-, -arileno-, -C₁-C₁₀ alquilen-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀ alquilen-, -C₁-C₁₀ alquilen-(C₃-C₈ carbociclo)-, -(C₃-C₈ carbociclo)-C₁-C₁₀ alquilen-, -C₃-C₈

heterociclo-, -C₁-C₁₀ alquileo-(C₃-C₈ heterociclo)-, -(C₃-C₈ heterociclo)-C₁-C₁₀ alquileo-, -(CH₂CH₂O)_r-, y -(CH₂CH₂O)-CH₂-; r es un número entero que varía entre 1-10; y

R¹⁸ es -C₁-C₈ alquilo o -arilo.

El compuesto de la fórmula III que tiene la estructura:



5 es un compuesto que se puede usar para formar conjugados de fármaco-espaciador-ligando para uso en la presente invención.

Los compuestos de la fórmula III son útiles para tratar o prevenir el cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en un animal.

10 5.4 LA UNIDAD DE ENLAZADOR

La unidad de enlazador del conjugado de fármaco-enlazador-ligando enlaza la unidad de fármaco y la unidad de ligando y tiene la fórmula:



donde:

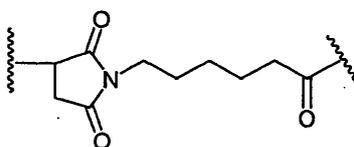
- 15 -A- es una unidad de extensor;
- a es 1;
- cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;
- w es independientemente un número entero de 2 a 12;
- Y- es una unidad de espaciador que se autoinmola; e

20 y es 1 ó 2;

5.4.1 la unidad de extensor

25 La unidad de extensor (-A-) enlaza una unidad de ligando a una unidad de aminoácido (-W-). A este respecto, un ligando (L) tiene un grupo funcional que puede formar una unión con un grupo funcional de un extensor. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un ligando, ya sea naturalmente o por medio de manipulación química incluyen sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. Los grupos funcionales del ligando preferidos son sulfhidrilo y amino. Los grupos sulfhidrilo pueden ser generados por la reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un ligando. Alternativamente, los grupos sulfhidrilo pueden ser generados por la reacción de un grupo amino de una porción de lisina de un ligando utilizando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo que genere sulfhidrilo.

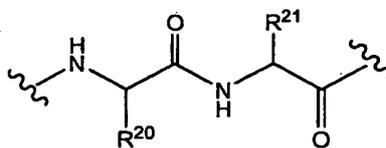
30 En una forma de realización, la unidad de extensor forma una unión con un átomo de azufre de la unidad de ligando. El átomo de azufre se pueden derivar de un grupo sulfhidrilo de un ligando. La unidad de extensor es la de la fórmula



5.4.2 la unidad de aminoácido

La unidad de aminoácido (-W-) enlaza la unidad de extensor a la unidad de espaciador.

W_w tiene la fórmula:



(VI)

5 donde R²⁰ es isopropilo y R²¹ es (CH₂)₃NHCONH₂

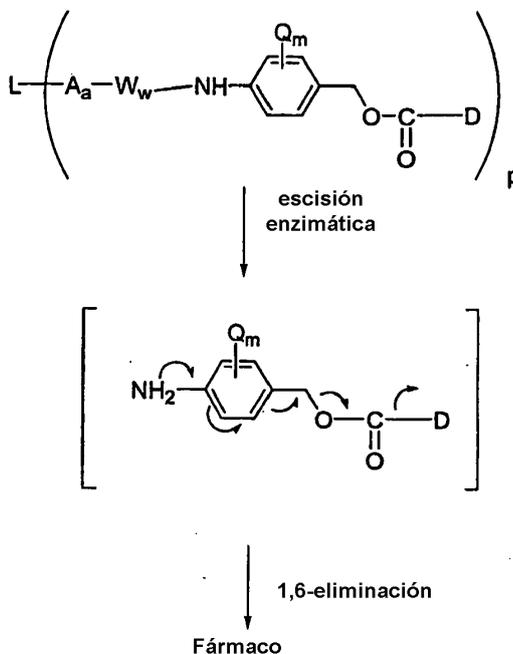
5.4.3 la unidad de espaciador

La unidad de espaciador (-Y-) enlaza una unidad de aminoácido a la unidad de fármaco. La unidad de espaciador es autoinmoladora.

10 -Y_y- es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) (véase Esquema 2), donde Q_m no está presente, es decir, m es 0.

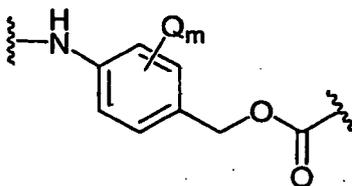
15 Un compuesto de la invención que contenga una unidad de espaciador autoinmoladora puede liberar -D sin necesidad de una etapa de hidrólisis separada. -Y- es un grupo PAB que se enlaza a -W_w- a través del átomo de nitrógeno del grupo amino PAB, y se conecta directamente a -D a través de un grupo carbonato. Sin pretender imponer ninguna teoría, el Esquema 2 muestra un posible mecanismo de liberación de fármaco de un grupo PAB que se une directamente a -D a través de un grupo carbamato.

Esquema 2



donde Q no está presente, es decir, m es 0; y p varía de 1 a alrededor de 20.

La unidad de espaciador (-Y_y-) está representada por la fórmula (X):



(X)

donde Q_m no está presente, es decir, m es 0;

5.5 la unidad de fármaco

- 5 -D es una unidad de fármaco que tiene un átomo de nitrógeno que puede formar una unión con la unidad de espaciador cuando y = 1 ó 2.

5.6 la unidad de ligando

- 10 La unidad de ligando (L-) es un anticuerpo monoclonal que se une inmunoespecíficamente al antígeno CD30. El ligando se une a complejos con o reaccionar con resto de una población de células que se pretende que sea modificada terapéutica o biológicamente de otra forma. La unidad de ligando actúa para suministrar la unidad de fármaco a la población particular de células diana con la que la unidad de ligando reacciona. Estos ligandos incluyen anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos.

- 15 Una unidad de ligando forma una unión a una unidad de extensor de un enlazador. Una unidad de ligando puede formar una unión a una unidad de enlazador a través de un heteroátomo del ligando. Los heteroátomos que pueden estar presentes en una unidad de ligando incluyen azufre (en una forma de realización, de un grupo sulfhidrilo de un ligando), oxígeno (en una forma de realización, de un grupo carbonilo, carboxilo o hidroxilo de un ligando) y nitrógeno (en una forma de realización, de un grupo amino primario o secundario de un ligando). Estos heteroátomos pueden estar presentes en el ligando en el estado natural del ligando, por ejemplo un anticuerpo de origen natural, o pueden ser introducidos en el ligando a través de una modificación química.

- 20 En una forma de realización preferida, un ligando tiene un grupo sulfhidrilo y el ligando se une a la unidad de enlazador a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.

En otra forma de realización, el ligando puede tener uno o más grupos carbohidratos que pueden ser modificados químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilo. La unidad de ligando se une a la unidad de extensor a través del átomo de azufre del grupo sulfhidrilo.

- 25 En otra forma de realización más, el ligando puede tener uno o más grupos carbohidratos que pueden ser oxidados para proporcionar un grupo aldehído (-CHO) (véase Laguzza, et al., J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55). El aldehído correspondiente puede formar una unión con un sitio reactivo en un extensor. Los sitios reactivos en un extensor que pueden reaccionar con un grupo carbonilo en un ligando incluyen, aunque no exclusivamente, hidracina e hidroxilamina.

- 30 También se describen ligandos de proteínas, polipéptidos, o péptidos no inmunorreactivos que incluyen la transferrina, los factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), la bombesina, la gastrina, el péptido liberador de la gastrina, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el IL-2, el IL6, los factores de crecimiento transformante ("TGF"), tales como el TGF-α y el TGF-β, el factor de crecimiento del *vaccinia* ("VGF"), la insulina, y los factores de crecimiento similares a la insulina I y II, las lectinas, y la apoproteína a partir de la lipoproteína de baja densidad.

- 35 Los ligandos de anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos frente al antígeno CD30. Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (mAb) frente al antígeno de interés empleando cualquier técnica conocida en la técnica que prevea la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Éstas incluyen, aunque no exclusivamente, la técnica del hibridoma, descrita originalmente por Kohler y Milstein (1.975 *Nature* 256, 495-497), la técnica del hibridoma celular humano B (Kozbor et al., 1.983, *Immunology Today* 4: 72), y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., 1.985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, incluidas IgG, IgM, IgE, IgA, e IgD, y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce el mAbs empleado en esta invención puede ser cultivado *in vitro* o *in vivo*.
- 40

- Los ligandos de anticuerpos monoclonales útiles incluyen, aunque no exclusivamente, los anticuerpos monoclonales humanos o los anticuerpos monoclonales quiméricos humano-ratón (u otras especies). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden producirse mediante cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, Teng et al., 1.983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7.308-7.312; Kozbor et al., 1.983, *Immunology Today* 4, 72-79; y Olsson et al., 1.982, *Meth. Enzymol.* 92, 3-16).
- El ligando también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los métodos para la producción de anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades. (Milstein et al., 1.983, *Nature* 305:53.7-539). Debido a la selección aleatoria de las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, la cual se lleva a cabo habitualmente utilizándose pasos de cromatografía por afinidad, es más bien compleja, y los rendimientos del producto son bajos. En la publicación internacional nº WO 93/08829, y en Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3.655-3.659 (1.991) se divulgan procedimientos similares.
- Según un enfoque diferente, y más preferido, los dominios variables de los anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión se da preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, comprendiendo, al menos, parte de la bisagra, regiones CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión de cadena ligera, presente en, al menos, una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se introducen en vectores de expresión separados, y se lleva a cabo su transfección conjunta a un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en formas de realización en las que las relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos empleadas en la construcción proporcionen los resultados óptimos. Sin embargo, es posible introducir las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de, al menos, dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales proporcione rendimientos elevados, o cuando las relaciones no sean de especial importancia.
- En una forma de realización preferida de este procedimiento, los anticuerpos biespecíficos tienen una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (que provee una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, al proporcionar la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica un modo sencillo de separación (publicación internacional nº WO 94/04690).
- Para obtener información más detallada acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1.986, 121:210. Mediante la utilización de tales técnicas, los ligandos de anticuerpos biespecíficos pueden ser preparados para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades tal y como se define en la presente memoria.
- Los anticuerpos bifuncionales aparecen también descritos en la publicación de patente europea nº EP A 0 105 360. Tal y como se divulga en esta referencia, los anticuerpos híbridos o bifuncionales pueden derivarse bien biológicamente, esto es, mediante técnicas de fusión celular, bien químicamente, en particular con agentes de entrecruzamiento o reactivos de formación de puentes de disulfuro, y pueden comprender anticuerpos enteros o fragmentos de los mismos. Los métodos para la obtención de tales anticuerpos híbridos se divulgan, por ejemplo, en la publicación internacional WO 83/03679, y la publicación de patente europea nº EP A 0 217 577.
- El ligando puede ser un fragmento, derivado o análogo activo funcionalmente de un anticuerpo que se una de manera inmuno-específica al antígeno CD30. A este respecto, "activo funcionalmente" significa que el fragmento, derivado o análogo puede provocar anticuerpos anti-anti-idiotipos que reconozcan el mismo antígeno que reconoció el anticuerpo del cual esté derivado el fragmento, derivado, o análogo. De manera específica, en una forma de realización preferida, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede aumentarse eliminando la estructura y secuencias de la CDR (región determinante de la complementariedad) que sean terminales C para la secuencia de CDR que reconozca de manera específica el antígeno. Con el fin de determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, se pueden utilizar péptidos sintéticos que contengan las secuencias de CDR en los ensayos de unión con el antígeno por medio de cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica (por ejemplo, el ensayo del núcleo BIA).
- Se pueden producir otros ligandos útiles que incluyan fragmentos de anticuerpos tales como, aunque no exclusivamente, fragmentos F(ab')₂, que contengan la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada, mediante la digestión de la pepsina de la molécula del anticuerpo, y fragmentos Fab, que pueden ser generados reduciendo los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Otros ligandos útiles

son dímeros de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo de los mismos, tales como Fvs o anticuerpos de cadena sencilla (SCA), (por ejemplo, tal y como se describe en la patente US 4.946.778; Bird, 1.988, *Science* 242:423-42; Huston et al., 1.988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5.879-5.883; y Ward et al., 1.989, *Nature* 334: 544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

5 De manera adicional, los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprendan tanto partes humanas como no humanas, los cuales pueden ser producidos utilizando técnicas de ADN recombinante estándares, son ligandos útiles. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes provienen de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de una región constante monoclonal murina y una de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Cabilly et al., patente US 4.816.567; y Boss et al., patente US 4.816.397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las especies no humanas, así como una región estructural de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Queen, patente US 5.585.089). Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden ser producidos mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizándose métodos descritos en la publicación internacional nº WO 87/02671; la publicación de patente europea nº 184.187; la publicación de patente europea nº 171.496; la publicación de patente europea nº 173.494; la publicación de patente internacional nº WO 86/01533; la patente estadounidense nº 4.816.567; la publicación de patente europea nº 125.023; Berter et al., 1.988, *Science* 240:1041-1043; Liu et al., 1.987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3.439-3.443; Liu et al., 1.987, *J. Immunol.* 139:3.521-3.526; Sun et al., 1.987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura et al., 1.987, *Canc. Res.* 47:999-1.005; Wood et al., 1.985, *Nature* 314:446-449; y Shaw et al., 1.988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1.553-1.559; Morrison, 1.985, *Science* 229:1.202-1.207; Oi et al., 1.986, *BioTechniques* 4:214; patente US 5.225.539; Jones et al., 1.986, *Nature* 321: 552-525; Verhoevan et al. (1.988) *Science* 239:1.534; y Beidler et al., 1.988, *J. Immunol.* 141:4.053-4.060.

Los anticuerpos completamente humanos son especialmente preferidos para los ligandos. Tales anticuerpos pueden ser producidos empleándose ratones transgénicos que no puedan expresar genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina endógena, pero que sí puedan expresar genes humanos de cadena pesada y ligera. Los ratones transgénicos son inmunizados del modo normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o parte de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse utilizando tecnología convencional del hibridoma. Los transgenes de inmunoglobulina humana alojados por el ratón transgénico se redisponen durante la diferenciación de células B y, a continuación, son sometidos a un cambio de clase y a una mutación somática. Así, utilizándose tal técnica, es posible producir terapéuticamente anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE útiles. Si se desea realizar una revisión de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1.995, *Int. Rev. Immunol.*, 13:65-93). Si lo que se desea es realizar un análisis detallado de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos, así como de los protocolos para la producción de tales anticuerpos, véase, por ejemplo, la patente US 5.625.126; la patente US 5.633.425; la patente US 5.569.825; la patente US 5.661.016; y la patente US 5.545.806. Otros anticuerpos humanos se pueden obtener comercialmente de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, California) y Genpharm (San José, California).

Los anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado pueden ser generados utilizando una técnica conocida como "selección guiada". En este procedimiento, se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de un ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca el mismo epítipo [Jespers et al. (1.994) *Biotechnology* 12:899-903].

En otras formas de realización, el ligando es una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento activo funcionalmente del mismo, por ejemplo, en el cual el anticuerpo es fusionado a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), bien en el terminal N, bien, en el terminal C, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una parte de la misma, preferiblemente, una parte de, al menos 10, 20 ó 50 aminoácidos de la proteína) que no sea el anticuerpo. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo está unido de manera covalente a la otra proteína en el terminal N del dominio constante.

Los anticuerpos del ligando incluyen análogos y derivados cualquiera de los cuales esté modificado, esto es, mediante el enlace covalente de cualquier tipo de molécula, siempre y cuando tal enlace covalente permita que el anticuerpo retenga su inmunoespecificidad de unión al antígeno. Por ejemplo, sin que deba entenderse como una limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que hayan sido modificados en mayor medida, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización a través de grupos protectores/bloqueadores conocidos, fragmentación proteolítica, unión a una unidad ligando celular o a otra proteína, etc. Cualquiera de numerosas modificaciones químicas puede ser llevada a cabo mediante técnicas conocidas, entre las que se incluye, aunque no exclusivamente, la fragmentación química específica, la acetilación, la formilación, la síntesis metabólica de la tunicamicina, etc. De modo adicional, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Los anticuerpos del ligando incluyen anticuerpos que tengan modificaciones (por ejemplo, sustituciones, eliminaciones o adiciones) en residuos de aminoácidos que interactúen con receptores Fc. En particular, los anticuerpos del ligando incluyen anticuerpos que tengan modificaciones en residuos de aminoácidos identificados como participantes en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 97/34631). Los anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de célula cancerosa pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, de Genentech (San Francisco, California), o producirse mediante cualquier método conocido para un experto en la materia tales como, por ejemplo, las técnicas de expresión recombinante o de síntesis química. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de célula cancerígena puede ser obtenida, por ejemplo, de la base de datos de GenBank, o una base de datos similar, de las publicaciones de la literatura, o por clonación y secuenciación rutinarias.

En una forma de realización específica, se utilizan anticuerpos anti-CD30 para el tratamiento o prevención del cáncer de conformidad con las composiciones y métodos de la invención. Los anticuerpos inmuno-específicos el antígeno CD30 pueden obtenerse comercialmente, o producirse mediante cualquier método conocido para un experto en la materia tales como, por ejemplo, las técnicas de síntesis química o de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos inmuno-específicos para el antígeno CD30 puede obtenerse, por ejemplo, de la base de datos de GenBank, o una base de datos similar, de las publicaciones de la literatura, o por clonación y secuenciación rutinarias.

mAbs contra el antígeno CD30, por ejemplo, el AC10 (Bowen, M. A., Olsen, K. J., Cheng, L., Avila, D., y Podack, E. R. "Functional effects of CD30 on a large granular lymphoma cell line YT" *J. Immunol.*, 151, 5.896-5.906, 1.993) encuentran uso en la invención. Se conocen otros muchos anticuerpos internalizadores que se unan a antígenos asociados a tumores, y han sido reseñados (Franke, A. E., Sievers, E., L., y Scheinberg, D. A., "Cell surface receptor-targeted therapy of acute myeloid leukemia: a review" *Cancer Biother Radiopharm.* 2.000,15, 459-76; Murray, J. L., "Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age" *Semin Oncol.* 2.000, 27, 64-70; Breitling, F., y Dubel, S., *Recombinant Antibodies*, John Wiley, and Sons, New York, 1.998).

Los anticuerpos adecuados para su uso en la invención pueden ser producidos mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en especial, por síntesis química o por expresión recombinante, y son producidos preferiblemente mediante técnicas de expresión recombinante.

5.6.1 producción de anticuerpos recombinantes

Los anticuerpos de ligando de la invención pueden ser producidos utilizando cualquier método que sea conocido en la técnica por su utilidad para la síntesis de anticuerpos, en especial, mediante síntesis química o expresión recombinante, y son producidos preferiblemente mediante técnicas de expresión recombinante.

La expresión recombinante de los anticuerpos de ligando, o un fragmento, derivado o análogo de los mismos, requiere la construcción de un ácido nucleico que codifique el anticuerpo. Si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, un ácido nucleico que codifique el anticuerpo puede ser compuesto a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, tal y como se describe en Kutmeier et al., 1.994, *Bio Techniques* 17:242), lo cual comprende la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contengan partes de la secuencia que codifica el anticuerpo, la hibridación y el ligamiento de tales oligonucleótidos y, entonces, la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

De modo alternativo, una molécula de ácido nucleico que codifique un anticuerpo puede ser generada a partir de una fuente adecuada. Si un clon que contenga el ácido nucleico que codifica el anticuerpo particular no está disponible, pero se conoce la secuencia del anticuerpo, un ácido nucleico que codifique el anticuerpo puede ser obtenido a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de cADN de anticuerpos, o biblioteca de cADN generada a partir de cualquier tejido o células que expresen la inmunoglobulina) mediante amplificación por PCR usándose cebadores sintéticos hibridizables a los extremos 3' y 5' de la secuencia, o mediante clonación usándose una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia de genes concreta.

Anticuerpos específicos para el antígeno CD30 se pueden generar por medio de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo generando anticuerpos monoclonales, por ejemplo, tal y como describen Kohler y Milstein (1.975, *Nature* 256:495-497), o tal y como describen Kozbor et al. (1.983 *Immunology Today* 4:72), o Cole et al. (1.985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96). De manera alternativa, un clon que codifique, al menos, el fragmento Fab del anticuerpo puede ser obtenido examinando las bibliotecas de expresión Fab (por ejemplo, tal y como se describe en Huse et al., 1.989, *Science* 256:1.275-1.281) para clones de fragmentos Fab que se unan al antígeno específico, o examinado bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Clackson et al., 1.991, *Nature* 352: 624; Hane et al., 1.997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:4.937).

Una vez que se haya obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifique, al menos, el dominio variable del anticuerpo, ésta puede ser introducida en un vector que contenga la secuencia de nucleótidos que codifique las regiones constantes del anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 86/05807; la publicación

internacional nº WO 89/01036; y la patente US 5.122.464). Los vectores que contienen la cadena ligera o pesada completa que permiten la expresión de una molécula de anticuerpo completa están disponibles. Entonces, el ácido nucleico que codifique el anticuerpo puede ser utilizado para introducir las sustituciones o eliminación de nucleótidos necesarias con el fin de sustituir (o eliminar) el o los residuos de cisteína de la región variable que participen en un puente de disulfuro dentro de la cadena con un residuo de aminoácidos que no contenga un grupo sulfhidilo. Tales modificaciones pueden ser llevadas a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones o eliminaciones específicas en una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, aunque no exclusivamente, la mutagénesis química y la mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchison et al., 1.978, *J. Biol. Chem.*, 253:6.651).

Asimismo, se pueden emplear las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1.984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-85.5; Neuberger et al., 1.984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1.985, *Nature* 314:452-454) mediante el corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que distintas partes provienen de diferentes especies animales, tales como aquellos que tienen una región variable derivada de una región constante de anticuerpo monoclonal murino y una de inmunoglobulina humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

De modo alternativo, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente US 4.694.778; Bird, 1.988, *Science* 242:423-42; Huston et al., 1.988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5.879-5.883; y Ward et al., 1.989, *Nature* 334:544-54) pueden ser adaptadas para producir anticuerpos de cadena sencilla. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman por la unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla. También se pueden utilizar las técnicas para la composición de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skeria et al., 1.988, *Science* 242:1.038-1.041).

Los fragmentos del anticuerpo que reconocen los epítomos específicos pueden ser generados por medio de técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, aunque no exclusivamente, los fragmentos F(ab')² que puedan ser producidos mediante la digestión de la pepsina de la molécula del anticuerpo, así como los fragmentos Fab que puedan ser generados mediante la reducción de los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')₂.

Una vez que se haya obtenido una secuencia de ácido nucleico que codifique un anticuerpo de ligando, el vector para la producción del anticuerpo puede ser producido mediante tecnología de ADN recombinante utilizándose técnicas muy conocidas en la técnica. Se pueden utilizar métodos muy conocidos para los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contengan las secuencias de codificación del anticuerpo y señales de control de la transcripción y de la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, las técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y la recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (1.990, *Molecular Cloning*, Manual de laboratorio, 2^a edición, Laboratorio Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, Nueva York) y Ausubel et al. (eds., 1.998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

Se puede transferir un vector de expresión que comprenda la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo, o la secuencia de nucleótidos de un anticuerpo a una célula huésped mediante técnicas convencionales (por ejemplo, electroporación, transfección liposomal, y precipitación de fosfato cálcico), y las células transfectadas son entonces cultivadas por medio de técnicas convencionales para producir el anticuerpo. En formas de realización específicas, la expresión del anticuerpo es regulada por un promotor constitutivo, inducible, o tisular específico.

Las células huésped usadas para expresar el anticuerpo de ligando recombinante pueden ser células bacterianas, tales como la *Escherichia coli*, o, de manera preferida, células eucarióticas, en especial para la expresión de la molécula de inmunoglobulina recombinante entera. En especial, las células mamíferas tales como las células ováricas del hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el mayor elemento promotor de genes temprano-intermedio del citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para las inmunoglobulinas (Foecking et al., 198, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1.990, *Bio Technology* 8:2).

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión-huésped para expresar los ligandos de la inmunoglobulina. Tales sistemas de expresión-huésped representan vehículos por medio de los cuales las secuencias de codificación del anticuerpo pueden ser producidas y, a continuación, purificadas, pero también representan a células que puedan, cuando sean transformadas o transfectadas con las secuencias de codificación de nucleótidos adecuadas, expresar una molécula de inmunoglobulina de ligando *in situ*. Éstos incluyen, aunque no exclusivamente, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, ADN plásmido, o vectores de expresión de ADN cósmido que contengan secuencias de codificación de la inmunoglobulina; levadura (por ejemplo, la *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contengan secuencias de codificación de la inmunoglobulina; sistemas celulares de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el baculovirus) que contengan las secuencias de codificación de la inmunoglobulina; sistemas celulares vegetales infectados con

vectores de expresión de virus recombinantes [por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el virus del mosaico del tabaco (TMV)], o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contengan secuencias de codificación de la inmunoglobulina; o sistemas de células mamíferas (por ejemplo, las células COS, CHO, BH, 293, 293T, 3T3) que alojen constructos de expresión recombinantes que contengan promotores derivados del genoma de las células mamíferas (por ejemplo, el promotor de la metalotioneína) o de virus mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío del adenovirus; el promotor 7.5K del virus *vaccinia*).

En los sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión puede ser seleccionado ventajosamente dependiendo del uso pretendido para el anticuerpo que se esté expresando. Por ejemplo, cuando haya que producir una gran cantidad de tal proteína, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de niveles elevados de productos de proteína de fusión que ya estén purificados. Tales vectores incluyen, aunque no exclusivamente, el vector de expresión de *E.coli* pUR278 (Ruther et al., 1.983, EMBO J. 2:1.791), en el que la secuencia de codificación del anticuerpo puede ser ligada individualmente al vector en marco con la región de codificación de lac Z, de modo que se produce una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye & Inouye, 1.985, *Nucleic Acids Res.* 13:3.101-3.109; Van Heeke & Schuster, 1.989, *J. Biol. Chem.* 24:550 5.509); y similares. Los vectores pGEX también pueden emplearse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatona S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden ser purificadas fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatona-agarosa seguida de elución en presencia de glutatona libre. Los vectores pGEX son diseñados para incluir sitios de fragmentación de la proteasa trombina o factor Xa, de modo que el producto del gen objetivo clonado pueda ser liberado de la fracción de GST.

En un sistema de insecto se utiliza el virus de polihedrosis nuclear de la *Autographa californica* (AcNPV) o el virus análogo del *Drosophila Melanogaster* como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia de codificación del anticuerpo puede ser clonada individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y puesta bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En las células huésped mamíferas, se puede utilizar un número de sistemas de expresión de base viral. En casos en los que se utilice un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación del anticuerpo de interés puede ser ligada a un complejo de control de la transcripción/traducción del adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede entonces ser introducido en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) produce un virus recombinante que es viable y que puede expresar la moléculas de la inmunoglobulina en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1.984, *Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU* 81:355-359). Las señales de iniciación específicas también pueden requerirse para la traducción eficiente de secuencias de codificación del anticuerpo insertado. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Asimismo, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada con el fin de asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de traducción exógena y los codones de iniciación pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede ser mejorada por la inclusión de elementos favorecedores de la transcripción adecuados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner et al., 1.987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544).

Asimismo, se puede escoger una cepa de células huésped para modular la expresión de las secuencias introducidas, o modifica y procesa el producto genético de la manera deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, fragmentación) de producto proteínicos puede ser de importancia para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento posterior a la traducción y la modificación de proteínas y productos genéticos. Se pueden escoger líneas celulares o sistemas huésped adecuado para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para tal fin, se pueden usar células huésped eucarióticas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcripto primario, la glicosilación y la fosforilación del producto genético. Tales células huésped mamíferas incluyen, aunque no exclusivamente, CHO, VERY, BH, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresen de manera estable un anticuerpo pueden ser producidas por ingeniería. Más que usar vectores de expresión que contengan orígenes virales de replicación, las células huésped pueden ser transformadas con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, intensificador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. A continuación de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células producidas por ingeniería crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y, después, son trasladadas a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección, y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, pueden ser clonados y expandidos al interior de líneas celulares. Este método puede ser utilizado de manera ventajosa para

producir por ingeniería líneas celulares que expresen el anticuerpo. Tales líneas celulares producidas por ingeniería pueden ser especialmente útiles en el examen y evaluación de antígenos tumorales que interactúen directa o indirectamente con el ligando del anticuerpo.

5 Se puede utilizar un número de sistemas de selección entre los que se incluye, aunque no exclusivamente, aquellos en los que los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977, *Cell* 11:223), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 192, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:202), y la adenina-fosforribosiltransferasa (Lowy et al., 1980, *Cell* 22:817) pueden utilizarse en células tk, hgprt, o aprt. Además, la resistencia a los antimetabolitos puede ser utilizada como base para la selección de los siguientes genes: el dhfr, el cual confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:357; O'Hare et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1.527); el gpt, el cual confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2.072); el neo, el cual confiere resistencia a la aminoglicósido G418 (*Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem* 62: 191-217; May, 1993, *TIB TECH* 11 (5):155-215), e hygro, el cual confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 15 1984, *Genes* 30:147). Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden utilizarse están descritos en in Ausubel et al. (eds., 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, manual de laboratorio*, Stockton Press, Nueva York; y, en los capítulos 12 y 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Nueva York.; Colberre-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1).

20 Los niveles de expresión de un anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación vectorial (si se desea consultar una reseña, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador del sistema vectorial que expresa un anticuerpo es amplificable, un aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que 25 la región amplificada está asociada a la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

La célula huésped puede ser transfectada junto con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector codificando un polipéptido derivado de cadena pesada y, el segundo vector, codificando un polipéptido derivado de 30 cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan la misma expresión de polipéptidos de cadenas ligeras y pesadas. De modo alternativo, un vector sencillo puede ser utilizado para codificar tanto polipéptidos de cadena ligera como pesada. En tales situaciones, la cadena ligera debería estar situada antes de la cadena pesada con el fin de evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2.197). Las secuencias de codificación para las cadenas ligeras y pesadas pueden comprender ADN para ADN genómico.

35 Una vez que el anticuerpo haya sido expresado de manera recombinante, puede ser purificado utilizando cualquier método conocido en la técnica para la purificación de un anticuerpo, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía por intercambio de iones, afinidad, en especial, por afinidad para el antígeno específico tras la proteína A, y por columnas de exclusión molecular), centrifugado, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

40 5.7 síntesis de los compuestos de la invención

Esta sección contiene información general sobre la síntesis de los conjugados de ligando-fármaco e intermedios para ellos. Su descripción es más amplia que el alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones, e incluye información sobre compuestos análogos a compuestos útiles en la presente invención.

45 Tal y como se describe más detalladamente a continuación, los compuestos de la invención son preparados de manera conveniente mediante el uso de un enlazador que tenga dos o más sitios reactivos para la unión al fármaco y al ligando. En un aspecto de la invención, un enlazador tiene un sitio reactivo, el cual tiene un grupo electrofílico que es reactivo a un grupo nucleofílico presente sobre un ligando. Los grupos nucleofílicos útiles sobre un ligando incluyen, aunque no exclusivamente, los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleofílico de un ligando es reactivo a un grupo electrofílico sobre un enlazador, y forma un enlace covalente con una unidad de 50 enlazador. El grupo electrofílico es un grupo maleimida. El grupo electrofílico proporciona un sitio conveniente para la unión al ligando.

También es útil como sitio reactivo un grupo funcional carbonato sobre un enlazador que pueda reaccionar con un grupo amino de un fármaco para formar un enlace de carbamato.

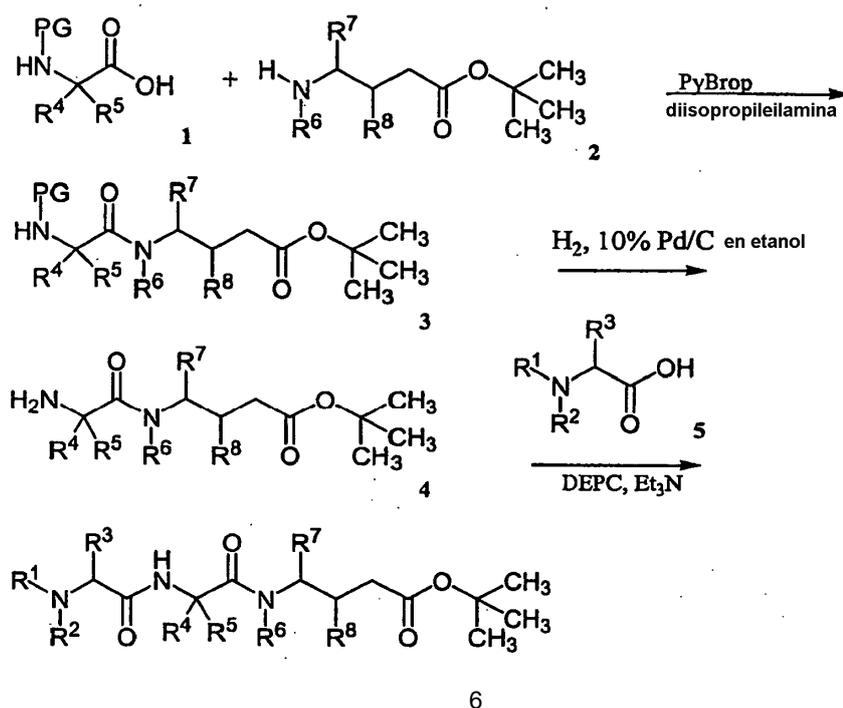
55 Habitualmente, los fármacos basados en péptidos pueden ser preparados mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más fragmentos de aminoácidos y/o péptidos. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de conformidad con el método de la síntesis en fase líquida (véase E. Schroder y K. Lubke, "The

Peptides", volumen 1, pág. 76-136, 1.965, Academic Press), que es muy conocido en el campo de la química de los péptidos.

En una forma de realización, se prepara un fármaco mediante la combinación de aproximadamente un equivalente estequiométrico de un dipéptido y un tripéptido, preferiblemente, en una reacción en un único recipiente bajo condiciones de condensación apropiadas. Este procedimiento aparece ilustrado en los siguientes esquemas 5-7. Así, el tripéptido 6 puede ser preparado tal y como se muestra en el esquema 5, y el dipéptido 9 puede ser preparado tal y como se muestra en el esquema 6. Los dos fragmentos 6 y 9 pueden ser condensados para proveer un fármaco 10 como aparece mostrado en la figura 7.

La síntesis de un extensor ilustrativo con un grupo maleimido electrofílico aparece ilustrada en los esquemas 8-9. Los métodos sintéticos generales útiles para la síntesis de un enlazador se describen en el esquema 10. El esquema 11 muestra la construcción de una unidad de enlazador con un grupo val-cit, un grupo maleimido electrofílico, y un grupo separador autoinmolador PAB. El esquema 12 representa la síntesis de un enlazador con un grupo phe-lys, un grupo maleimido electrofílico, con y sin el grupo espaciador autoinmolador PAB. El esquema 13 presenta una vista general para la síntesis de un compuesto de fármaco-enlazador, mientras que el esquema 14 presenta una vía alternativa para la preparación de un compuesto de fármaco-enlazador. El esquema 15 representa la síntesis de un enlazador ramificado que contiene un grupo BHMS. El esquema 16 ilustra la unión de un ligando a un compuesto de fármaco-enlazador para formar un conjugado de fármaco-enlazador-ligando, y el esquema 17 ilustra la síntesis de los conjugados de fármaco-enlazador-ligando con 2 ó 4 fármacos por ligando.

Esquema 5



Como se ilustra en el Esquema 5, un aminoácido protegido 1 (donde PG representa un grupo amino protector, R^4 se selecciona de hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_3-C_8 carbociclo, $-O-(C_1-C_8)$ alquilo, -arilo, alquil-arilo, alquilo- (C_3-C_8) carbociclo), C_3-C_8 heterociclo, alquil- (C_3-C_8) heterociclo), donde R^5 se selecciona de H y metilo; o R^4 y R^5 juntos tienen la fórmula $-(CR^aR^b)_n$ donde R^a y R^b se seleccionan independientemente de hidrógeno, C_1-C_8 alquilo y C_3-C_8 carbociclo y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de carbono al que están unidos) es acoplado al ester t-butílico 2 (donde R^6 se selecciona de -H y $-C_1-C_8$ alquilo; y R^7 se selecciona de hidrógeno, C_1-C_8 alquilo, C_3-C_8 carbociclo, $-O-(C_1-C_8)$ alquilo, -arilo, alquil-arilo, alquil- (C_3-C_8) carbociclo), C_3-C_8 heterociclo y alquil- (C_3-C_8) heterociclo)) bajo condiciones adecuadas de acoplamiento, por ejemplo, en presencia de PyBrop, y diisopropiletilamina, o utilizando DCC (véase, por ejemplo, Miyazaki, K. et. al. *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43(10), 1706-1718).

Los grupos protectores PG adecuados y los métodos de síntesis adecuados para proteger a un grupo amino con un grupo protector son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Greene, TW y Wuts, P.G.M., *Protective*

5 *Groups in Organic Synthesis*, 2^a edición, 1991, John Wiley & Sons. Los aminoácidos protegidos preferidos **1** son PG-Ile y, en particular, PG-Val, mientras que otros aminoácidos protegidos apropiados incluyen, sin limitación: PG-ciclohexilglicina, PG-ciclohexilalanina, ácido PG-aminociclopropano-1-carboxílico, ácido PG-aminoisobutírico, PG-fenilalanina, PG-fenilglicina y PG-terc-butilglicina. Z es un grupo protector preferido. Fmoc es otro grupo protector preferido. Un éster t-butílico preferido **2** es el éster t-butílico de dolaisoleuina.

10 El dipéptido **3** puede ser purificado, por ejemplo, usando cromatografía, y, posteriormente, se desprotege, por ejemplo, utilizando H₂ y Pd-C al 10% en etanol cuando el PG es benciloxicarbonilo, o utilizando dietilamina para la eliminación de un grupo protector Fmoc. La amina resultante **4** fácilmente forma un enlace peptídico con un aminoácido **5** (donde R¹ se selecciona de -H, -alquilo C₁-C₈ y C₃-C₈ carbociclo, y R² se selecciona de -H y C₁-C₈ alquilo, o R¹ y R² juntos, tienen la fórmula - (CR^aR^b)_n, donde R^a y R^b se seleccionan independientemente de -H, C₁-C₈ alquilo y -C₃-C₈ carbociclo y n se selecciona de 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de nitrógeno al que están unidos, y R³ se selecciona de hidrógeno, C₁-C₈ alquilo, C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, alquil-arilo, alquilo (C₃-C₈ carbociclo), C₃-C₈ y heterociclo-alquilo (C₃-C₈ heterociclo)). Los aminoácidos preferidos **5** son los aminoácidos de *N,N*-dialquilo, como *N,N*-dimetil-valina disponible en el mercado. Otros aminoácidos de *N,N*-dialquilo pueden ser preparados por bis-alquilación reductora utilizando procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Bowman, RE, Stroud, HH *J. Chem. Soc.*, 1950, 1342-1340). Fmoc-Me-L-Val y Fmoc-Me-L-glicina son dos aminoácidos preferidos **5** útiles para la síntesis de derivados *N*-monoalquílicos. La amina **4** y el aminoácido **5** reaccionan para proporcionar el tripéptido **6** utilizando el reactivo de acoplamiento DEPC con trietilamina como base.

20 La metodología ilustrativa de acoplamiento con DEPC y la metodología de acoplamiento con PyBrop mostradas en el Esquema 5 se describen a continuación en el Procedimiento General A y Procedimiento General B, respectivamente. La metodología ilustrativa para la desprotección de una amina protegida en Z a través de hidrogenación catalítica se describe a continuación en el Procedimiento General C.

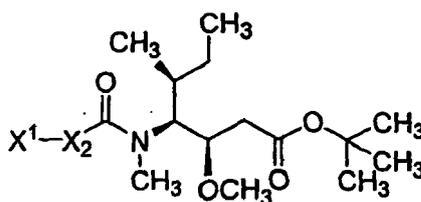
25 Procedimiento General A: Síntesis de péptidos utilizando DEPC. Se disuelven el aminoácido o péptido **4** *N*-protegido o *N,N*-disustituido (1,0 eq.) y una amina **5** (1,1 eq.) con un solvente orgánico aprótico, tal como el diclorometano (0,1 a 0,5 M). Entonces se añade una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina (1,5 eq.) seguido de DEPC (1,1 eq.). La solución resultante se agita, preferiblemente en atmósfera de argón, durante 12 horas mientras se controla por HPLC o TLC. El solvente se elimina al vacío a temperatura ambiente, y el producto crudo se purifica mediante, por ejemplo, HPLC o cromatografía de columna flash (columna de gel de sílice). Las fracciones relevantes se combinan y se concentran al vacío para producir el tripéptido **6**, que se seca al vacío durante la noche.

30 Procedimiento general B: Síntesis de péptidos utilizando PyBrop. El aminoácido **2** (1,0 eq.), que tiene opcionalmente un grupo protector carboxilo, se diluye con un solvente orgánico aprótico tal como diclorometano o DME para proporcionar una solución con una concentración de entre 0,5 y 1,0 mM, luego se añade diisopropiletilamina (1,5 eq.). Se añade el aminoácido **1** protegido en Fmoc o Z (1,1 eq.) como un sólido en una porción, entonces se añade PyBrop (1,2 eq.) a la mezcla resultante. La reacción se controla por TLC o HPLC, seguido de un procedimiento de diagnóstico diferencial similar al descrito en el Procedimiento General A.

40 Procedimiento general C: Eliminación de Z por hidrogenación catalítica. Se diluye el aminoácido protegido en Z o péptido **3** con etanol para proporcionar una solución con una concentración de entre 0,5 y 1,0 mM en un recipiente adecuado, como un frasco de fondo redondo y pared gruesa. Se añade paladio al 10% sobre carbono (5-10 % peso/peso) y la mezcla de reacción se coloca bajo una atmósfera de hidrógeno. El progreso de la reacción se controla mediante HPLC y se completa generalmente en 1-2 h. La mezcla de reacción se filtra a través de una almohadilla de celita prelavada y la celita se lava de nuevo con un solvente orgánico polar, tal como metanol, después de la filtración. La solución eluyente se concentra al vacío para dar un residuo que se diluye con un solvente orgánico, preferiblemente tolueno. El solvente orgánico se elimina al vacío para dar la amina desprotegida **4**.

45 La Tabla 1 enumera los ejemplos representativos de los productos intermedios de tripéptido (compuestos 39-43) que se prepararon según el Esquema 5.

Tabla 1

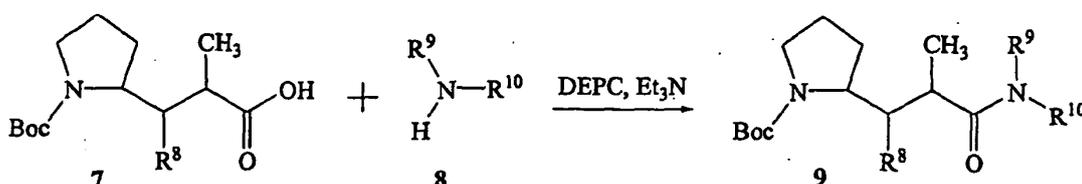


Compuesto	X ¹	X ²
39	Fmoc-N-Me-L-val	L-val
40	Fmoc-N-Me-L-val	L-ile
41	Fmoc-N-Me-Gly	L-ile
42	dov	L-val
43	dov	L-ile

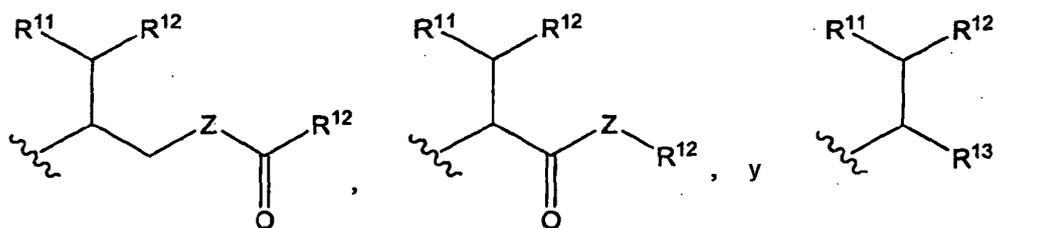
^adov=N,N-dimetil-L-valina

El dipéptido 9 se pueden preparar fácilmente por condensación del aminoácido modificado Boc-Dolaprina 7 (véase, por ejemplo, Pettit, GR, et al. *Synthesis*, 1996, 719-725), con (1S, 2R)-norefedrina, L- o D-fenilalaninol, o con p-acetilfenetilamina 8 sintética (Patente US 3.445.518 a nombre de Shavel et al.) usando agentes de condensación muy conocidos en la química de péptidos, como, por ejemplo, DEPC en presencia de trietilamina, como se muestra en el Esquema 6. El compuesto 7 también se puede condensar con los compuestos disponibles en el mercado de esta manera para formar dipéptidos de la fórmula 9. Ejemplos de compuestos disponibles comercialmente que sirven para este propósito incluyen, aunque no exclusivamente, norefedrina, efedrina, y estereoisómeros de las mismas (Sigma-Sigma-Aldrich), L- o D-fenilalaninol (Sigma-Aldrich), 2-feniletilamina (Sigma-Aldrich), 2-(4-aminofenil)etilamina (Sigma-Aldrich), 1,2-etanodiamina-1,2-difenilo (Sigma-Aldrich), o 4-(2-aminoetil)fenol (Sigma-Aldrich), o preparadas sintéticamente con p-acetilfenetilamina, arilo- y heterociclo-amidas de L-fenilalanina, 1-azidometil-2-feniletilamina (preparado a partir de fenilalaninol según un procedimiento general descrito en *J. Chem. Research* (S), 1992, 391), y 1-(4-hidroxifenil)-2-feniletilamina (publicación de patente europea nº 0356035 A2), entre otros.

Esquema 6



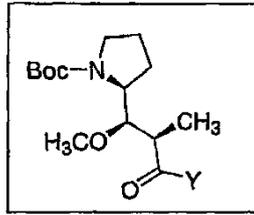
donde R⁸ se selecciona independientemente de -H, -OH, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo y -O-(C₁-C₈ alquilo); R⁹ se selecciona de -H y -C₁-C₈ alquilo; y R¹⁰ se selecciona de:



donde Z es -O-, -S-, -NH- o -N(R¹⁴)-; R¹¹ se selecciona de -H, -OH, -NH₂, -NHR¹⁴, -N(R¹⁴)₂, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo); o R¹¹ es un átomo de oxígeno que forma una unidad de carbonilo (C=O) con el átomo de carbono al cual está unido y un átomo de hidrógeno en este átomo de carbono se sustituye por uno de los enlaces en el enlace doble (C=O); cada R¹² se selecciona independientemente de -arilo y -C₃-C₈ heterociclo; R¹³ se selecciona de -H, -OH, -NH₂, -NHR¹⁴, -N(R¹⁴)₂, -C₁-C₈ alquilo, -C₃-C₈ carbociclo, -O-(C₁-C₈ alquilo), -arilo, -C₁-C₈ alquil-arilo, -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ carbociclo), -C₃-C₈ heterociclo y -C₁-C₈ alquil-(C₃-C₈ heterociclo); y cada R¹⁴ es independientemente -H o -C₁-C₈ alquilo.

La Tabla 2 enumera ejemplos representativos de dipéptidos (compuestos 44-48) que fueron preparados según el Esquema 6.

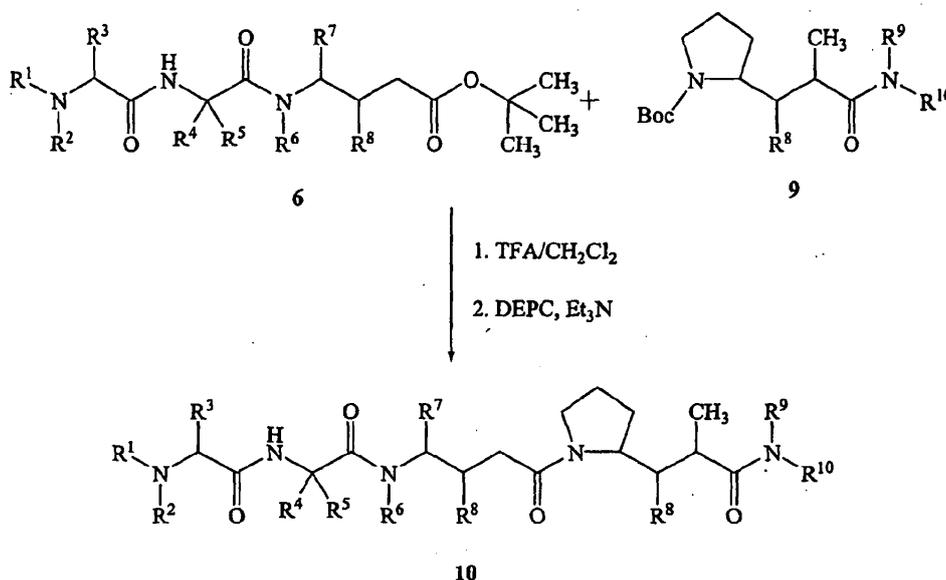
Tabla 2



Compuesto	Y	Compuesto	Y
44		47	
45		48	
46			

5 El Esquema 7 ilustra un procedimiento útil para el acoplamiento del tripéptido 6 y dipéptido 9 para formar un fármaco 10. El acoplamiento de 6 y 9 se puede lograr utilizando un ácido fuerte, por ejemplo, TFA, para facilitar la escisión de Boc y el éster t-butílico, del dipéptido 9 y del tripéptido 6, respectivamente, seguido por las condiciones de condensación, por ejemplo, la utilización de DEPC, o reactivo de acoplamiento similar, en presencia de exceso de base (triethylamina o equivalente) para proporcionar el fármaco 10.

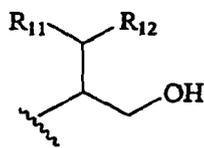
Esquema 7



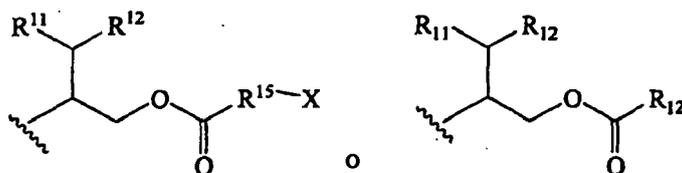
Un procedimiento ilustrativo para la síntesis del fármaco 10 como se representa en el Esquema 7 se detalla a continuación en el Procedimiento General D.

- 5 El grupo R^{10} de un fármaco de la fórmula general 10 se puede modificar, si así se desea, para incluir a un grupo funcional que permite que el fármaco se una a un enlazador. Ejemplos de modificaciones útiles del grupo R^{10} de un fármaco 10, incluyen, aunque no exclusivamente, las transformaciones químicas que se describen a continuación.

Cuando R^{10} es

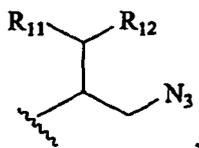


- 10 el grupo hidroxilo de R^{10} puede hacerse reaccionar con ácidos carboxílicos comerciales o derivados sintéticamente o derivados de ácidos carboxílicos, incluyendo, aunque no exclusivamente, ésteres carboxílicos, cloruros ácidos, anhídridos y carbonatos, para proporcionar los ésteres correspondientes de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Los reactivos de acoplamiento, incluyendo, aunque no exclusivamente, DCC/DMAP y EDCI/HOBt, pueden servir en este tipo de reacciones de acoplamiento entre alcoholes y ácidos carboxílicos o derivados de ácidos carboxílicos. En una forma de realización preferida, los ácidos carboxílicos son ácidos aril-carboxílicos sustituidos o no sustituidos, por ejemplo, ácido 4-aminobenzoico. Por lo tanto, la condensación de un grupo hidroxilo del grupo R^{10} mostrada arriba con ácidos carboxílicos proporciona fármacos de la estructura general 10, donde R^{10} es

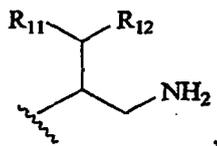


- 20 y donde R^{11} , R^{12} , R^{14} y R^{15} son como se describieron anteriormente en la presente memoria y X se selecciona de -OH, $-NH_2$ y NHR^{14} .

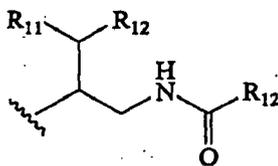
Cuando R^{10} es



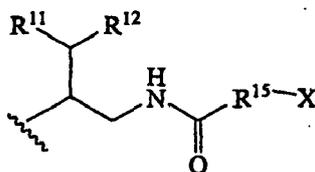
el grupo azido del fármaco puede reducirse (por ejemplo, véase J. Chem. Research (S), 1992, 391) para proporcionar el derivado amino correspondiente donde R^{10} es



- 5 cuyo grupo amino se puede hacer reaccionar con el grupo carboxilo de un ácido carboxílico bajo condiciones de acoplamiento generales del péptido para proporcionar fármacos de la estructura general **10**, donde R^{10} es



o



- 10 y donde R^{11} , R^{12} , R^{14} y R^{15} son como se describieron anteriormente en la presente memoria y X se selecciona de -OH, -NH² y NHR¹⁴.

Los ácidos carboxílicos útiles en el sentido anterior incluyen, aunque no exclusivamente, ácido 4-aminobenzóico, ácido p-acetilbenzóico y 2-amino-4-tiazolcarboxílico (Tyger Scientific, Inc., Ewing, NJ).

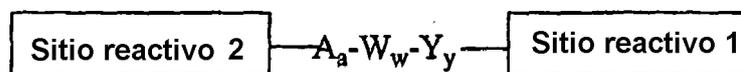
- 15 Un grupo amino protegido en Fmoc puede estar presente en un grupo R^{10} que contenga una amina del fármaco 10 (por ejemplo, como se muestra en la Tabla 2). El grupo Fmoc se puede quitar de la amina protegida con dietilamina (ver Procedimiento General E como un ejemplo ilustrativo que se describe a continuación).

- Procedimiento general D: Síntesis del fármaco. Se diluye una mezcla de dipéptido 9 (1,0 eq.) y tripéptido 6 (1 eq.) con un solvente orgánico aprótico, tal como diclorometano, para formar una solución 0,1 M, a continuación se añade un ácido fuerte, como el ácido trifluoroacético (1/2 v/v) y la mezcla resultante se agita bajo atmósfera de nitrógeno durante dos horas a 0 °C. La reacción se puede controlar con TLC o HPLC, preferentemente. El solvente se elimina al vacío y el residuo resultante se seca azeotrópicamente dos veces, preferiblemente con tolueno. El residuo resultante se seca a alto vacío durante 12 horas y luego se diluye con un solvente orgánico aprótico, tal como el diclorometano. Entonces se añade una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina (1,5 eq.) seguido de PyBrop (1,2 eq.) o DEPC (1,2 eq.) dependiendo de la funcionalidad química de los residuos. La mezcla de reacción se controla por TLC o HPLC, y una vez terminada, la reacción se somete a un procedimiento de tratamiento final similar o idéntico al descrito en el Procedimiento General A.

- Procedimiento general E: Eliminación de Fmoc utilizando dietilamina. Se diluye un fármaco protegido en Fmoc 10 con un solvente orgánico aprótico tal como diclorometano y a la solución resultante se añade dietilamina (1/2 v/v). El progreso de la reacción se controla por TLC o HPLC y se suele completar en 2 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y el residuo resultante se seca azeotrópicamente, preferiblemente utilizando tolueno, luego se seca a alto vacío para proporcionar el fármaco 10 que tiene un grupo amino desprotegido.

Por lo tanto, los métodos anteriores son útiles para hacer fármacos que pueden ser utilizados en la presente invención.

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



5

cuando tanto una unidad de espaciador (-Y) como una unidad de extensor (-A-) están presentes.

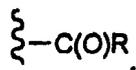
En general, un enlazador adecuado tiene una unidad de aminoácido unida a una unidad de extensor y una unidad de separador. El sitio reactivo 1 está presente en el extremo del sitio del espaciador y el sitio reactivo 2 está presente en el extremo del extensor.

- 10 En una forma de realización de la invención, el sitio reactivo nº 1 reacciona con un átomo de nitrógeno del fármaco, y el sitio reactivo nº 2 reacciona con un grupo sulfhidrilo en el ligando. Los sitios reactivos 1 y 2 pueden reaccionar con los diferentes grupos funcionales.

En un aspecto de la invención, el sitio reactivo nº 1 es

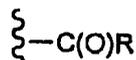


- 15 En otro aspecto de la invención, el sitio reactivo nº 1 es

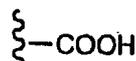


donde R es -Br, -Cl, -O-Su o -O-(4-nitrofenilo).

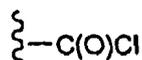
Los enlazadores que tienen



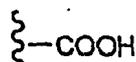
- 20 en el sitio reactivo nº 1, donde R es -Br o -Cl, pueden ser preparados a partir de enlazadores que tienen



en el sitio reactivo nº 1 mediante la reacción del grupo -COOH con PX_3 o PX_5 , donde X es -Br o -Cl. Alternativamente, los enlazadores que tienen

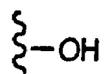


- 25 en el sitio reactivo nº 1 pueden ser preparados a partir de enlazadores que tienen

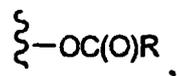


en el sitio reactivo nº 1 mediante la reacción del grupo -COOH con cloruro de tionilo. Para una explicación general de la conversión de los ácidos carboxílicos en haluros de acilo, véase March, *Advanced Organic Chemistry-Reactions, Mechanisms and Structure*, 4ª Ed., 1992, John Wiley and Sons, New York, p. 437-438.

- 30 En otro aspecto de la invención, el sitio reactivo nº 1 es

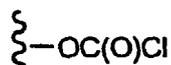


En otro aspecto más de la invención, el sitio reactivo nº 1 es

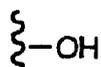


donde R es -Cl, -O-CH(Cl)CCl₃ o -O-(4-nitrofenilo).

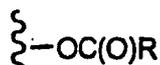
5 Los enlazadores que tienen



en el sitio reactivo nº 1 pueden ser preparados a partir de enlazadores que tienen



10 -OH en el sitio reactivo nº 1 mediante la reacción del grupo -OH con fosgeno o trifosgeno para formar el cloroformato correspondiente. Los enlazadores que tienen



en el sitio reactivo nº 1, donde R es -O-CH(Cl)CCl₃ o -O-(4-nitrofenilo) pueden ser preparados a partir de enlazadores que tienen



15 en el sitio reactivo nº 1 mediante la reacción del grupo -OC(O)Cl con HO-CH(Cl)CCl₃ u HO-(4-nitrofenilo), respectivamente. Para una explicación general de esta química véase March, *Advanced Organic Chemistry - Reaction, Mechanisms and Structure*, 4ª Ed., 1992, John Wiley and Sons, New York, p. 392.

En otro aspecto de la invención, el sitio reactivo nº 1 es



20 donde X es -F, -Cl, -Br, -I, o un grupo saliente, como -O-mesilo, -O-tosilo u -O-triflato.

Los enlazadores que tienen



en el sitio reactivo nº 1, donde X es -O-mesilo, -O-tosilo y O-triflato pueden ser preparados a partir de enlazadores que tienen



25

en el sitio reactivo nº 1 mediante la reacción del grupo -OH con reactivos diferentes, incluyendo HCl, SOCl₂, PCl₅, PCl₃ y POCl₃ (donde X es Cl); HBr, PBr₃, PBr₅ y SOBr₂ (donde X es Br), HI (donde X es I), y CH₃CH₂NSF₃ (DAST), SF₄, SeF₄ y fluoruro de p-toluensulfonilo (donde X es F). Para una explicación general de la conversión de los alcoholes en haluros de alquilo, véase March, *Advanced Organic Chemistry -Reaction, Mechanisms and Structure*, 4ª Ed., 1992, John Wiley and Sons, New York, p. 431-433.

5

Los enlazadores que tienen



en el sitio reactivo nº 1, donde X es -O-mesilo, -O-tosilo y O-triflato pueden ser preparados a partir de enlazadores que tienen

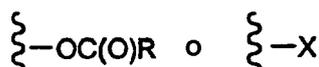


10

en el sitio reactivo nº 1 mediante la reacción del grupo -OH con varios reactivos de mesilación, tosilación y triflación, respectivamente. Estos reactivos y métodos para su uso son muy conocidos para un experto en la técnica de la síntesis orgánica. Para una explicación general sobre el mesilo, tosilo y triflato como grupos salientes, véase March, *Advanced Organic Chemistry -Reaction, Mechanisms and Structure*, 4ª Ed., 1992, John Wiley and Sons, New York, p. 353-354.

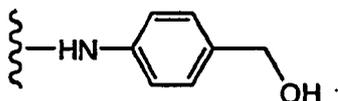
15

En una forma de realización, cuando una unidad de separador (-Y) está presente, el sitio reactivo nº 1 es

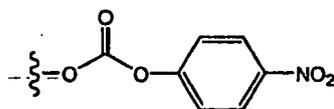


donde R es -Cl, -O-CH(Cl)CCl₃ o -O-(4-nitrofenilo) y X es -F, -Cl, -Br, -I, o un grupo saliente, como -O-mesilo, -O-tosilo u O-triflato.

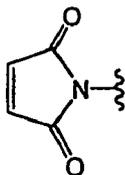
20 En otro aspecto de la invención, el sitio reactivo nº 1 es



En otro aspecto más de la invención, el sitio reactivo nº 1 es un carbonato de p-nitrofenilo que tiene la fórmula

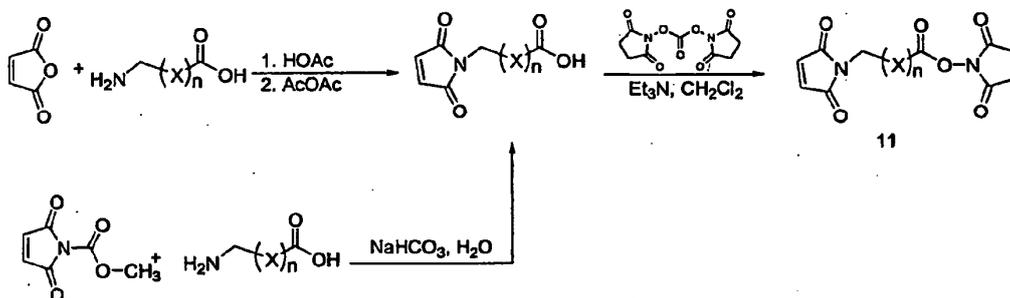


25 En un aspecto de la invención, el sitio reactivo nº 2 es un grupo aceptante de tiol, que es un grupo maleimida que tiene la fórmula



Los enlazadores útiles se pueden obtener a través de fuentes comerciales, tales como de Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o sintetizados de acuerdo con los procedimientos descritos en la Patente US 6.214.345 a nombre de Firestone et al., resumidos en los Esquemas 8-10 que siguen.

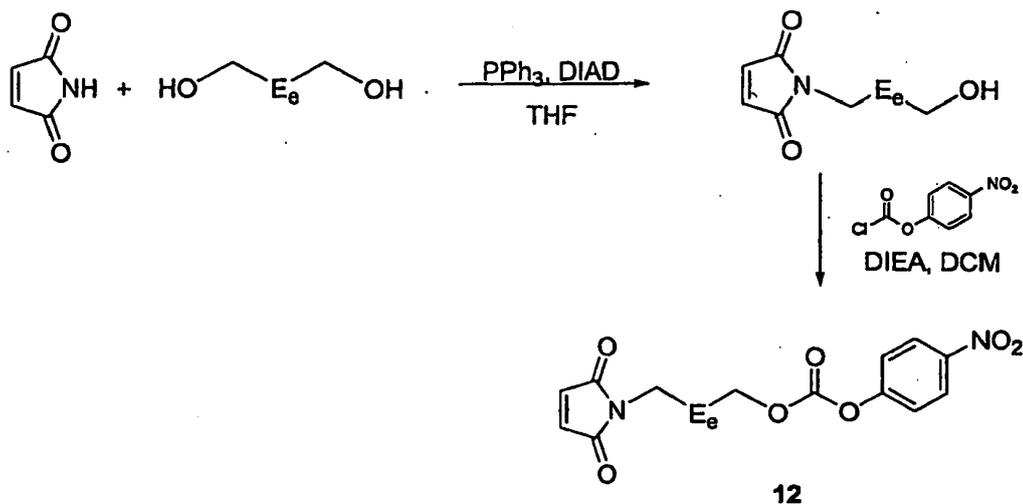
Esquema 8



donde X es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$, y n es un número entero de 0-10 cuando X es $-\text{CH}_2-$, o 1-10 cuando X es $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$.

5 El método que se muestra en el Esquema 9 combina la maleimida con un glicol bajo condiciones de Mitsunobu para hacer un extensor de maleimida y polietilenoglicol (véase, por ejemplo, Walker, M.A. *J. Org. Chem.* 1995, 60, 5352-5), seguido de la instalación de un grupo con sitio reactivo de carbonato de p-nitrofenilo.

Esquema 9

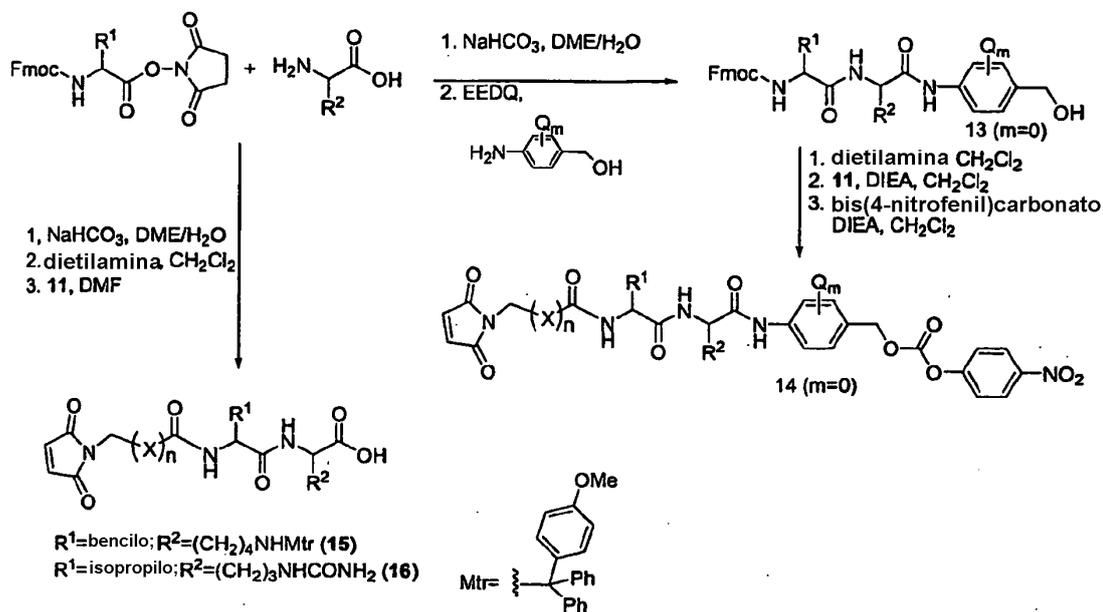


donde E es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$, y e es un número entero que varía de 0-8.

10 Alternativamente, los extensores de PEG-maleimida y PEG-haloacetamida se pueden preparar como han descrito Frisch, et al. *Bioconjugate Chem.* 1996, 7, 180-186.

El Esquema 10 ilustra una síntesis general de una unidad de enlazador ilustrativa que contiene un grupo extensor de maleimida y, un separador autoinmolador de éter p-aminobencílico.

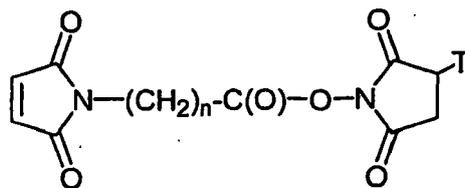
Esquema 10



donde Q es - C_1 - C_8 alquilo, -O-(C_1 - C_8 alquilo), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y n es un número entero que varía de 0-10.

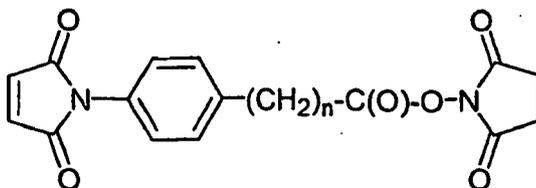
5 Los extensores útiles pueden ser incorporados en un enlazador utilizando productos intermedios disponibles en el mercado de Molecular Biosciences (Boulder, CO) que se describen a continuación utilizando técnicas conocidas de síntesis orgánica.

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

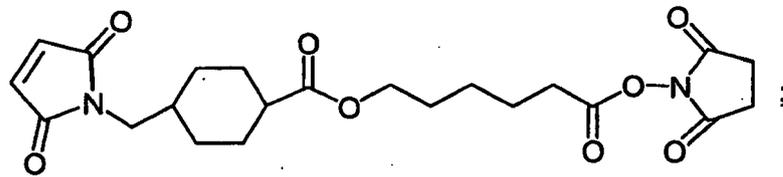
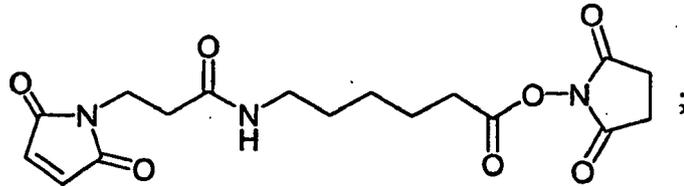
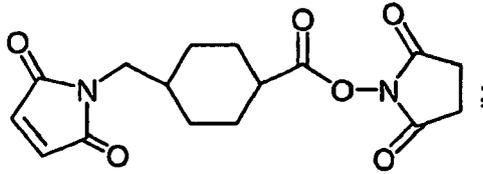


10

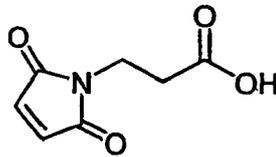
donde n es un número entero que varía de 1-10 y T es -H o - SO_3Na ;



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

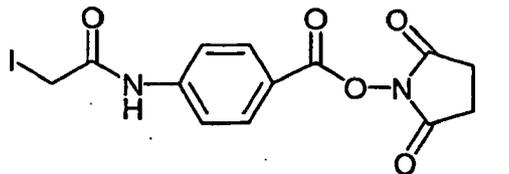
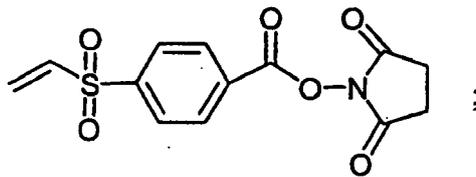


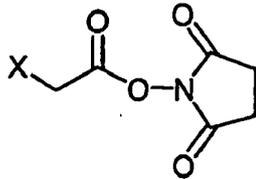
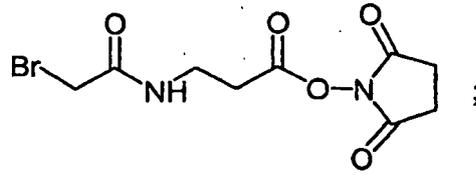
y



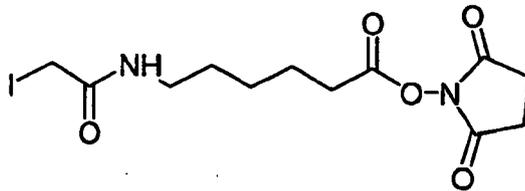
5

Las unidades de extensor de la fórmula (IIIb) pueden ser introducidas en un enlazador haciendo reaccionar los siguientes productos intermedios con el N-terminal de una unidad de aminoácido:

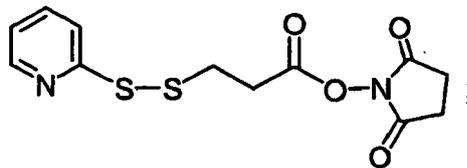




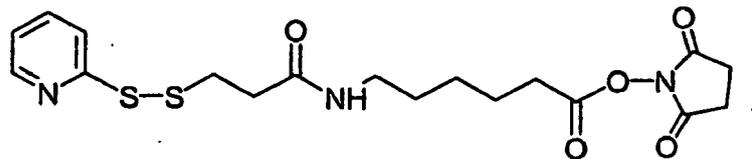
donde X es -Br o I; y



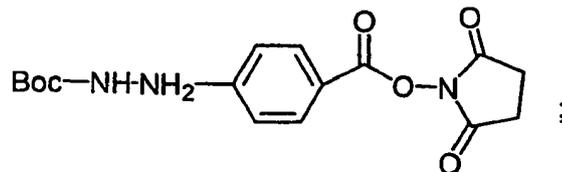
- 5 Las unidades de extensor de la fórmula (IV) pueden ser introducidas en un enlazador haciendo reaccionar los siguientes productos intermedios con el N-terminal de una unidad de aminoácido:



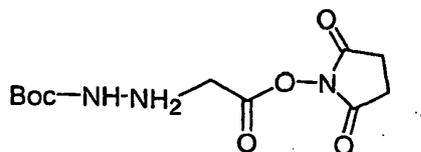
y



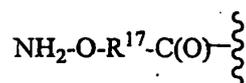
- 10 Las unidades de extensor de la fórmula (Va) pueden ser introducidas en un enlazador haciendo reaccionar los siguientes productos intermedios con el N-terminal de una unidad de aminoácido:



y

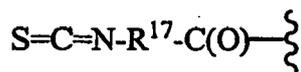


- 5 Se pueden sintetizar otros extensores útiles en la invención según procedimientos conocidos. Los extensores aminooxi de la fórmula que se muestra a continuación se pueden preparar mediante el tratamiento de haluros de alquilo con N-Boc-hidroxilamina de acuerdo con los procedimientos descritos por Jones, DS et al, *Tetrahedron Letters*, 2000, 41 (10), 1531-1533; y Gilon, C. et al., *Tetrahedron*, 1967, 23 (11), 4441-4447.



- 10 donde -R¹⁷- se selecciona de -C₁-C₁₀ alquileo-, -C₃-C₈ carbociclo-, -O-(C₁-C₈ alquilo)-, -arileno-, -C₁-C₁₀ alquileoarileno-, -arileno-C₁-C₁₀ alquileo-, -C₁-C₁₀ alquileo-(C₃-C₈ carbociclo)-, -(C₃-C₈ carbociclo)-C₁-C₁₀ alquileo-, -C₃-C₈ heterociclo-, -C₁-C₁₀ alquileo-(C₃-C₈ heterociclo)-, -(C₃-C₈ heterociclo)-C₁-C₁₀ alquileo-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es un número entero que varía de 1-10;

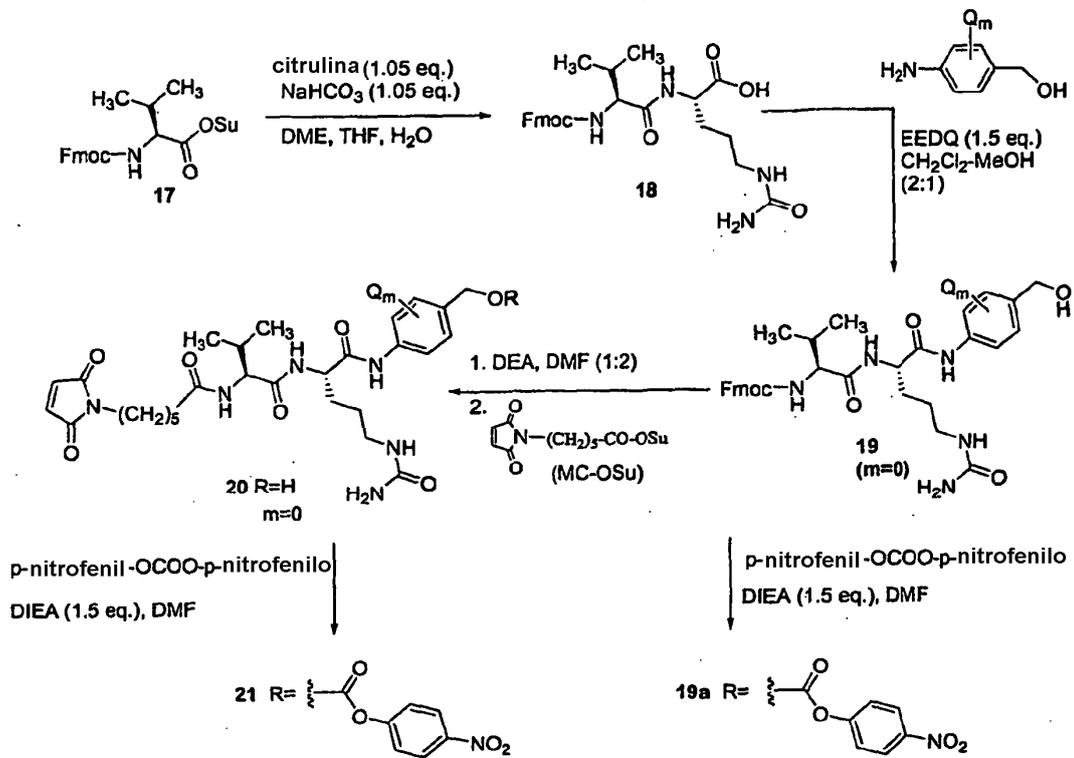
Los extensores de isotiocianato de la fórmula que se muestra a continuación pueden ser preparados a partir de cloruros de ácido isotiocianatocarboxílico como se describe en *Angew. Chem.*, 1975, 87 (14), 517.



donde -R¹⁷-es como se describe en esta memoria.

- 15 El Esquema 11 muestra un método para la obtención de un enlazador dipéptido val-cit que tiene un extensor de maleimida y, opcionalmente, un separador autoinmolador p-aminobencilo.

Esquema 11

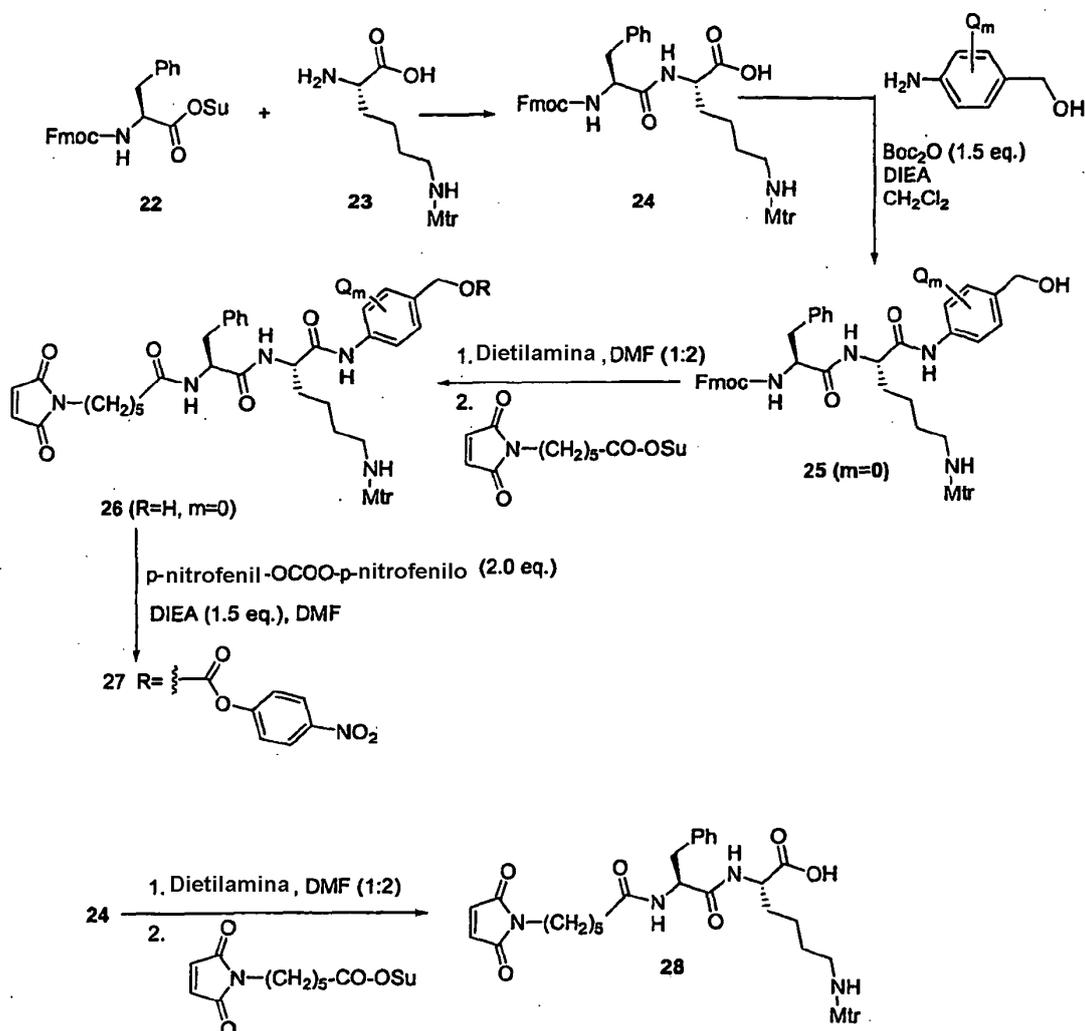


donde Q es $-\text{C}_1\text{-C}_8$ alquilo, $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_8)$ alquilo), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4.

El Esquema 12 ilustra la síntesis de una unidad enlazadora dipéptido phe-lys(Mtr) que tiene una unidad de extensor de maleimida y una unidad de separador autoinmolador p-aminobencilo. El material de partida **23** (Lys(Mtr)) está disponible comercialmente (Bachem, Torrance, CA) o puede prepararse según Dubowchik, et al. *Tetrahedrom Letters* 1997, **38**, 5257-60.

5

Esquema 12



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

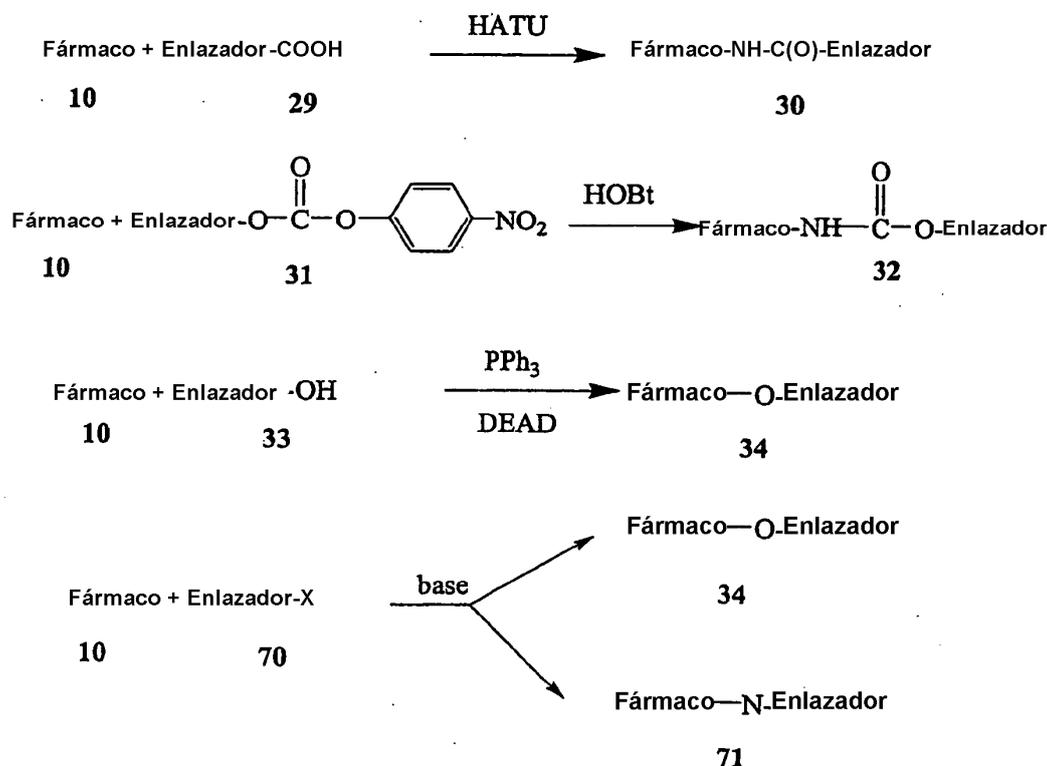
5 Como se muestra en el Esquema 13, se puede hacer reaccionar un enlazador con un grupo amino de un fármaco 10 para formar un compuesto de fármaco-enlazador que contiene un grupo amida o carbamato, que enlaza la unidad de fármaco a la unidad del enlazador. Cuando el sitio reactivo n° 1 es un grupo de ácido carboxílico, como en el enlazador 29, la reacción de acoplamiento se puede realizar utilizando HATU o PyBrop y una base de amina apropiada, lo que produce un compuesto de fármaco-enlazador 30, que contiene una unión amida entre la unidad de fármaco y la unidad enlazadora. Cuando el sitio reactivo n° 1 es un carbonato, como en el enlazador 31, el enlazador puede acoplarse al fármaco utilizando HOBt en una mezcla de DMF/piridina para proporcionar un compuesto de fármaco-enlazador 32, que contiene una unión carbamato entre la unidad de fármaco y la unidad de enlazador.

10 Cuando el sitio reactivo n° 1 es un grupo hidroxilo, como en el enlazador 33, el enlazador puede acoplarse a un grupo fenol de un fármaco utilizando la química Mitsunobu para proporcionar un compuesto de fármaco-enlazador 34 que tiene un enlace éter entre la unidad de fármaco y la unidad de enlazador.

15 Alternativamente, cuando el sitio reactivo n° 1 es un buen grupo saliente, como en el enlazador 70, el enlazador puede acoplarse a un grupo hidróxilo de un fármaco a través de un proceso de sustitución nucleofílica para proporcionar un compuesto de fármaco-enlazador que tiene un enlace éter (34) o un enlace amino (71) entre la unidad de fármaco y la unidad de enlazador.

Los métodos ilustrativos que sirven para enlazar un fármaco a un ligando para formar un compuesto de fármaco-enlazador se representan en el Esquema 13 y se describen en los procedimientos generales G-J.

Esquema 13



Procedimiento general G: Formación de amida utilizando HATU. Se diluyen un fármaco 10 (1,0 eq.) y un enlazador protegido en N conteniendo un sitio reactivo de ácido carboxílico (1,0 eq.) con un solvente orgánico adecuado, tal como el diclorometano, y la solución resultante se trata con HATU (1,5 eq.) y una base orgánica, preferiblemente piridina (1,5 eq.). Se deja agitar la mezcla de reacción bajo atmósfera inerte, preferiblemente argón, durante 6 horas, tiempo durante el cual la mezcla de reacción se controla por HPLC. La mezcla de reacción se concentra y el residuo resultante se purifica utilizando HPLC para obtener la amida 30.

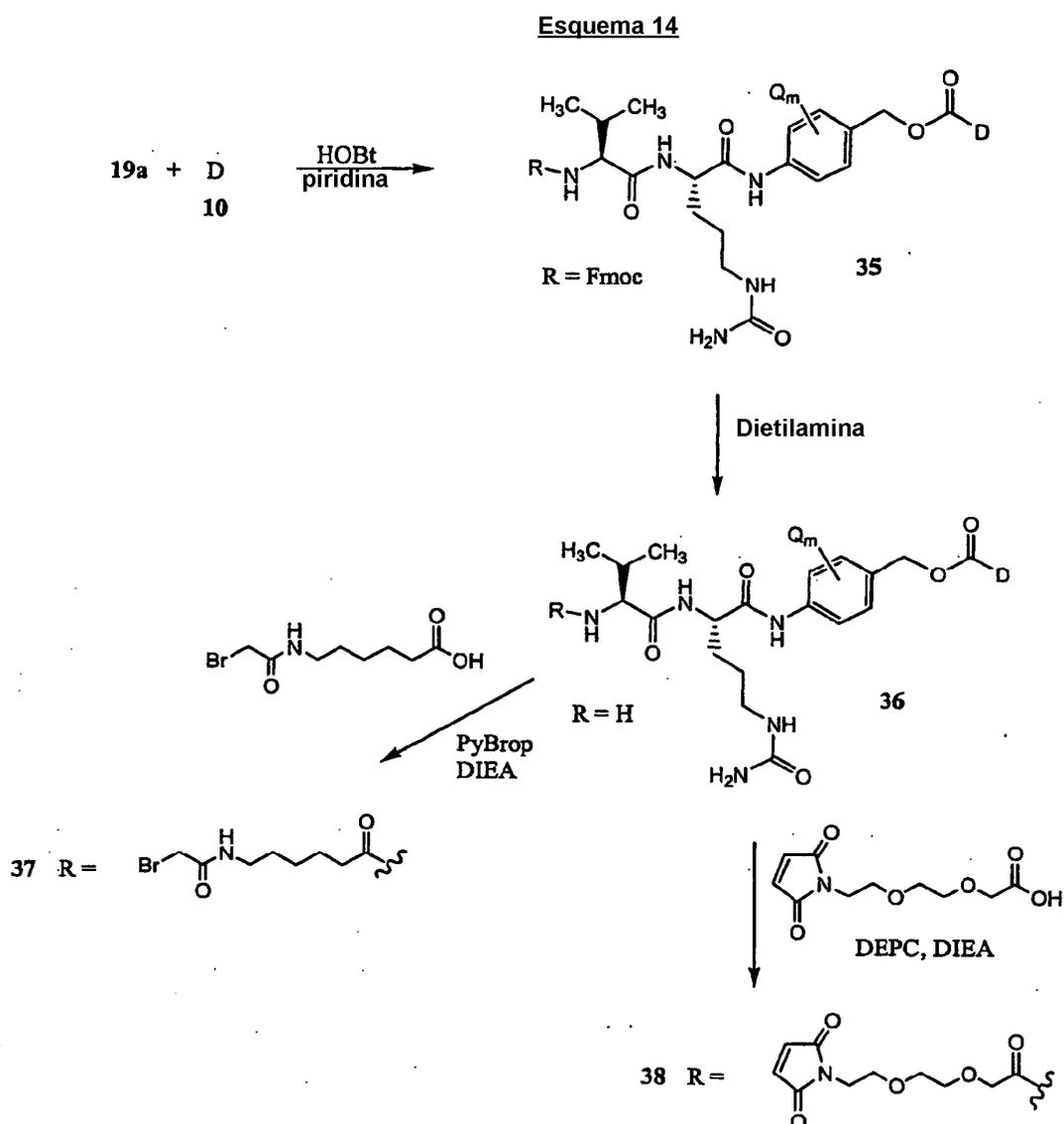
Procedimiento general H: Formación de carbamato utilizando HOBt. Se diluye una mezcla de un enlazador 31 que tiene un sitio reactivo de carbonato de p-nitrofenilo (1,1 eq.) y el fármaco 10 (1,0 eq.) con un solvente orgánico aprótico, tal como DMF, para proporcionar una solución con una concentración de 50-100 mM, y la solución resultante se trata con HOBt (2,0 eq.) y se coloca bajo una atmósfera inerte, preferiblemente argón. Se deja agitar la mezcla de reacción durante 15 min, luego se añade una base orgánica, tal como piridina (1/4 v/v) y el progreso de la reacción se controla por HPLC. El enlazador se consume normalmente a las 16 h. La mezcla de reacción se concentra al vacío y el residuo resultante se purifica utilizando, por ejemplo, HPLC para obtener el carbamato 32.

Procedimiento general I: Formación de éter utilizando química Mitsunobu. Se diluye un fármaco de la fórmula general 10, que contiene un grupo hidroxilo libre, con THF para hacer una solución de 1,0 M y a esta solución se añade un enlazador (1,0 eq.) que contiene un grupo hidroxilo en el sitio reactivo n° 1 (33), seguido de trifetilfosfina (1,5 eq.). La mezcla de reacción se pone bajo una atmósfera de argón y se enfría a 0 °C. Entonces se añade DEAD (1,5 eq.) gota a gota con una jeringa y la reacción se deja en agitación a temperatura ambiente mientras se controla utilizando HPLC. La reacción se completa normalmente a las 0,5-12 h, dependiendo de los sustratos. La mezcla de reacción se diluye con agua (en un volumen igual al del THF) y la mezcla de reacción se extrae en EtOAc. La capa de EtOAc se lava sucesivamente con agua y salmuera, después se seca sobre MgSO₄ y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna flash utilizando un eluyente adecuado para proporcionar éter 34.

Procedimiento general J: Formación de éter/amina por sustitución nucleofílica. Un fármaco de la fórmula general 10, que contiene un grupo hidroxilo libre o un grupo amino libre, se diluye con un solvente aprótico polar, tal como THF, DMF o DMSO, para hacer una solución de 1,0 M y a esta solución se añade una base no nucleofílica (alrededor de 1,5 eq.), tal como piridina, diisopropiletilamina o trietilamina. La mezcla de reacción se deja en agitación durante 1 hora aproximadamente, y a la solución resultante se le añade una solución de aproximadamente 1,0 M de enlazador 70 en un solvente polar aprótico, tal como THF, DMF o DMSO. La reacción resultante se agita en atmósfera inerte, mientras se controla utilizando TLC o HPLC. La reacción se completa normalmente a las 0,5-12 h, dependiendo de los sustratos. La mezcla de reacción se diluye con agua (en un volumen igual al del volumen de reacción) y se

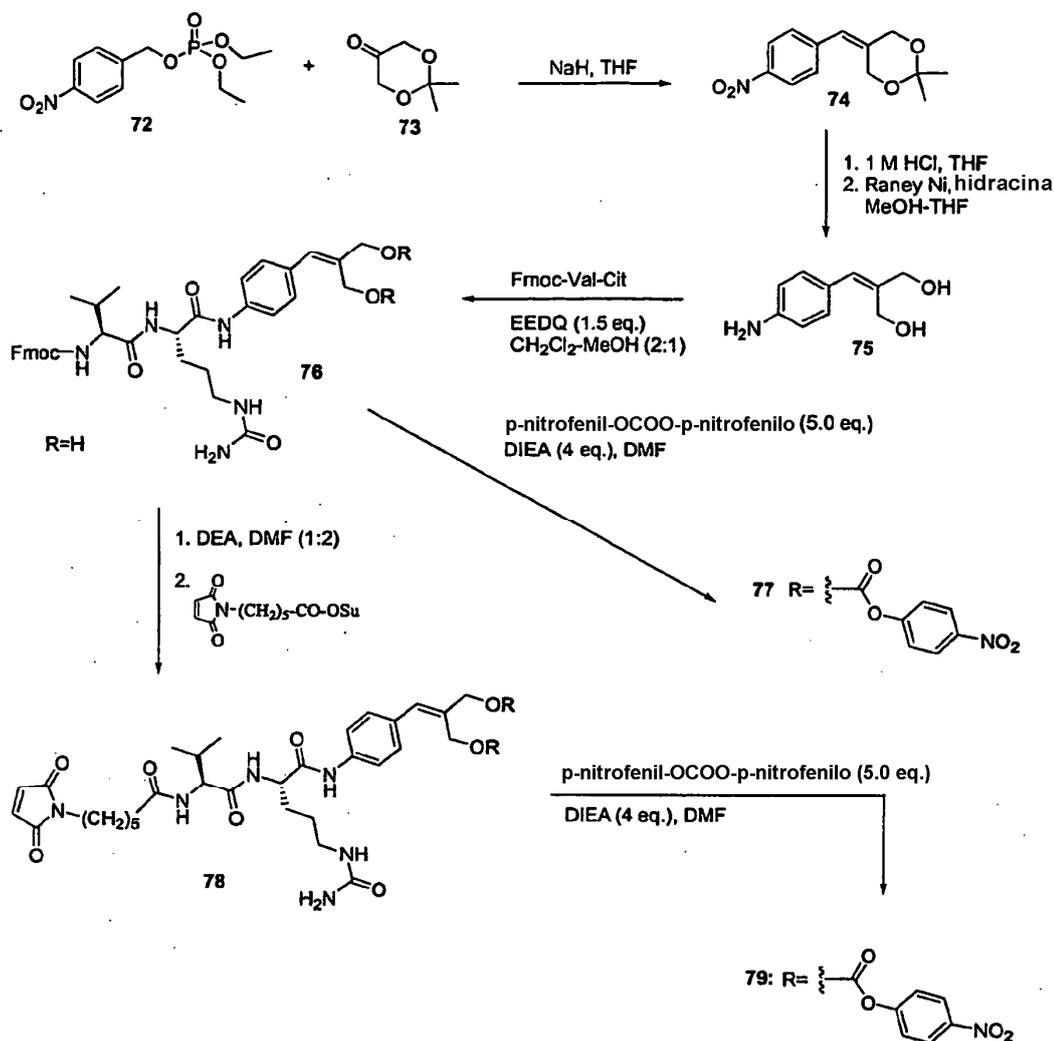
extrae en EtOAc. La capa de EtOAc se lava sucesivamente con agua, 1N de HCl, agua y salmuera, después se seca sobre $MgSO_4$ y se concentra. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna flash utilizando un eluyente adecuado para proporcionar un éter de la fórmula 34 o una amina de la fórmula 71, dependiendo de si el fármaco 10 contiene un grupo hidroxilo libre o un grupo amino libre.

- 5 Un método alternativo para la preparación de compuestos de fármaco-enlazador de la invención se describe en el Esquema 14. Utilizando el método del Esquema 14, el fármaco se une a una unidad parcial de enlazador (19a, por ejemplo), que no tiene una unidad de extensor unida. Esto proporciona el producto intermedio 35, que tiene una unidad de aminoácido que tiene un N-terminal protegido en Fmoc. El grupo Fmoc se elimina y la amina intermediaria resultante 36 se fija a una unidad de extensor a través de una reacción de acoplamiento catalizada con PyBrop o DEPC. La construcción de los compuestos de fármaco-enlazador que contienen o un extensor de bromoacetamida 39 o un extensor de maleimida PEG 38 se ilustra en el Esquema 14.



donde Q es $-C_1-C_8$ alquilo, $-O-(C_1-C_8)$ alquilo), $-\text{halógeno}$, $-\text{nitro}$ o $-\text{ciano}$; y m es un número entero que varía de 0-4.

- 15 La metodología útil para la preparación de una unidad de enlazador conteniendo un separador ramificado se muestra en el Esquema 15.



El Esquema 15 ilustra la síntesis de un enlazador dipéptido val-cit que tiene una unidad de extensor de maleimida y una unidad de bis(4-hidroximetil)estireno (BHMS). La síntesis del producto intermedio BHMS (75) se ha mejorado a partir de los procedimientos de la literatura anterior (véase la Publicación Internacional nº WO 98 13059 de Firestone et al., y Crozet, MP.; Archambault, G.; Vanelle, P.; Nougier, R. *Tetrahedron Lett.* 1985, 26, 5133-5134) y utiliza como materiales de partida, disponibles en el mercado, dietil (4-nitrobenzyl)fosfonato (72) y 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ona (73). Los enlazadores 77 y 79 se pueden preparar a partir del producto intermedio 75 mediante la metodología descrita en el Esquema 11.

5

El esquema 16 ilustra la metodología útil para la hacer conjugados de fármaco-enlazador-ligando de la invención teniendo aproximadamente de 2 a 4 fármacos por anticuerpo.

10

Esquema 16



Procedimiento general K: Preparación de conjugados con aproximadamente 2 a 4 fármacos por anticuerpo.

Reducción parcial del anticuerpo

En general, para preparar conjugados que tienen dos fármacos por anticuerpo, el anticuerpo relevante se reduce con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP) (alrededor de 1,8 equivalentes) en

15

PBS con 1 mM DTPA, ajustado a pH 8 con 50 mM de borato. La solución se incuba a 37 °C durante 1 hora, se purifica utilizando una columna de 50 ml G25 con desalación equilibrada en PBS/1mM DTPA a 4° C. La concentración de tiol se puede determinar según el Procedimiento General M, la concentración de proteínas puede determinarse dividiendo el valor de A280 por el coeficiente de extinción de 1,58 (mg/ml), y la relación de tiol a anticuerpo puede determinarse según el Procedimiento General N.

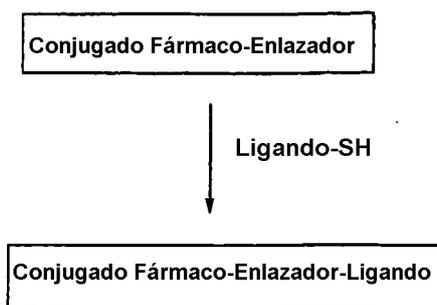
Los conjugados que tienen 4 fármacos por anticuerpo se pueden hacer utilizando la misma metodología, con alrededor de 4,2 equivalentes de un agente reductor adecuado para reducir parcialmente el anticuerpo.

Conjugación del fármaco-enlazador al anticuerpo parcialmente reducido

Las muestras de anticuerpo parcialmente reducido pueden conjugarse con el correspondiente compuesto de fármaco-enlazador con alrededor de 2,4 y alrededor de 4,6 equivalentes molares de compuesto de fármaco-enlazador por anticuerpo para preparar los conjugados de 2 y 4 fármacos por anticuerpo, respectivamente. Las reacciones de conjugación se incuban en hielo durante 1 hora, se extinguen con cerca de 20 veces el exceso de cisteína para el fármaco, y se purifica por elución en una columna de desalación G25 a aproximadamente 4 °C. Los conjugados de fármaco-enlazador-ligando resultantes se concentran a cerca de 3 mg/ml, se pasan por un filtro estéril, se dividen en partes alícuotas y se almacenan congelados.

El esquema 17 muestra la construcción de un conjugado de fármaco-enlazador-ligando mediante la reacción del grupo sulfhidrilo de un ligando con un grupo aceptante tiol en el grupo enlazador de un compuesto de fármaco-enlazador.

Esquema 17



Los métodos ilustrativos para unir un anticuerpo ligando a un compuesto de fármaco-enlazador se describen en los procedimientos generales L-R.

Procedimiento general L: Unión de un ligando de anticuerpo a un compuesto de fármaco-enlazador. Todas las etapas de la reacción se llevan a cabo típicamente a 4 °C. Cuando el ligando es un anticuerpo monoclonal que tiene uno o más puentes disulfuro, las soluciones del anticuerpo monoclonal (5-20 mg/ml) en solución salina tamponada con fosfato pH, 7,2, se reducen con ditiotreitól (10 mM final) a 37 °C durante 30 minutos (véase el Procedimiento General M) y la separación de los agentes de bajo peso molecular se logra mediante cromatografía de exclusión molecular en columnas Sephadex G25 en PBS conteniendo 1 mM de ácido dietilentríaminopentacético.

El contenido de sulfhidrilo en el ligando se puede determinar utilizando ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) como se describe en el Procedimiento General M (véase Riddles, P.W., Blakeley, RL, y Zemer, B. (1979) Anal. Biochem. 94, 75-81). A una solución de PBS de ligando reducido según el Procedimiento General L se añade un compuesto de fármaco-enlazador en MeCN de manera que la solución sea de 20% de MeCN/PBS (vol/vol). La cantidad de compuesto de fármaco-enlazador es aproximadamente un 10% más que el número total de grupos sulfhidrilo en un ligando. Después de 60 min a 4 °C, la cisteína se añade (20 veces el exceso en la concentración del compuesto de fármaco-enlazador), la solución se concentra por ultrafiltración, y todos los agentes de bajo peso molecular se eliminan por filtración en gel. El número de compuestos de fármaco-enlazador por anticuerpo se determina por espectroscopia uv/vis utilizando fórmulas derivadas de los coeficientes de extinción relativa de los ligandos y compuestos de fármaco-enlazador como se describe en el Procedimiento General O. La cantidad de compuesto de fármaco-enlazador extinguido se determina entonces como se describe en el Procedimiento General P utilizando HPLC de fase inversa. El estado de agregación de los anticuerpos del ligando de los conjugados de fármaco-enlazador-ligando se puede determinar utilizando HPLC de exclusión por tamaño como se describe en el Procedimiento General R. Los conjugados de fármaco-enlazador-ligando pueden utilizarse sin purificación adicional.

- Procedimiento general M: Reducción de los puentes disulfuro entre cadenas de un anticuerpo. A una solución de 24 mg de un anticuerpo (2,4 ml de 10 mg/ml de solución) en el tampón adecuado se añade 300 µl de solución tampón de borato (500 mM de borato de sodio/500 mM de cloruro de sodio, pH 8,0), seguido de 300 µl de ditioneitol (DTT, una solución de 100 mM en H₂O). La mezcla de reacción se agita con un instrumento vortex y se incuba a 37 °C durante 30 min. Se equilibran tres columnas PD10 con PBS conteniendo 1 mM de DTPA (en PBS) y el anticuerpo reducido se eluye a través de las tres columnas PD10 y se recoge en 4,2 ml de solución PBS/DTPA (1,4 ml por columna). El anticuerpo reducido se almacena luego en hielo. El número de tioles por anticuerpo y la concentración de anticuerpos se determinan según el Procedimiento General N.
- 5
- Procedimiento general N: Determinación del número de tioles por ligando.
- 10 Una muestra de referencia de un ligando o una muestra de un anticuerpo reducido según el Procedimiento General L se diluye a aproximadamente 1:40 (peso/peso) en PBS, y la absorbancia UV de la solución se mide a 280 nm utilizando métodos espectroscópicos de UV. Preferentemente, la relación de ligando : PBS en la solución es tal que la absorbancia UV oscila entre aproximadamente 0,13-0,2 UA (unidades de absorbancia).
- 15 Una muestra de ensayo de un ligando o una muestra de ensayo de un anticuerpo reducido según el Procedimiento General L se diluye a 1:20 con una solución de PBS conteniendo unos 15 µl de solución madre de DTNB/ml de PBS. Entonces se prepara una muestra en blanco conteniendo DTNB en la misma concentración que la solución de ensayo (es decir, 15 µl de solución madre de DTNB/ml de PBS). El espectrofotómetro se pone como referencia a cero nm con la muestra en blanco, entonces la absorbancia de la muestra se mide a 412 nm.
- 20 La concentración molar del anticuerpo se determina mediante la fórmula: [Ligando] = (OD₂₈₀/2,24e⁵) x factor de dilución.
- La concentración molar de tiol se determina mediante la fórmula: [-SH] = (OD₄₁₂/1,415e⁴) x factor de dilución.
- Entonces se calcula la relación [SH]/[ligando]. Un ligando de anticuerpo monoclonal reducido puede tener de 1 a 20 grupos sulfhidrilo, pero por lo general tiene entre 6 a 9 grupos sulfhidrilo. En una forma de realización preferida, el rango de la relación de [SH]/[ligando] es de aproximadamente 7 a 9.
- 25 Se entiende que la relación de [SH]/[ligando] es el número promedio de unidades de -A_a-W_w-Y_y-D por unidad de ligando.
- Procedimiento general O: Determinación del número de moléculas de fármaco por anticuerpo en un conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo. La relación de fármaco : anticuerpo para un conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo se determina midiendo el número de tioles reducibles con ditioneitol (DTT) que quedan después de la conjugación, utilizando el siguiente método: Se trata una muestra de 200 µl de un conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo con DTT (solución de 100 mM en agua) para llevar la concentración a 10 mM de DTT. La solución resultante se incuba a 37 °C durante 30 minutos, luego se eluye a través de una columna PD10 con PBS/DTPA como eluyente. Entonces se mide el OD₂₈₀ del conjugado reducido y se mide la concentración molar según el Procedimiento General P.
- 30
- 35 La concentración molar de tiol se determina usando DTNB como se describe en el procedimiento general M. Se calcula la relación de la concentración de tiol a la concentración de anticuerpo y la relación de fármaco : ligando es la diferencia entre la relación tiol : anticuerpo (determinado utilizando el procedimiento general N) y la relación fármaco : anticuerpo como se determina en el párrafo anterior.
- Procedimiento General P: Determinación de la cantidad de compuesto de fármaco-enlazador extinguido en un conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo. Este ensayo proporciona una determinación cuantitativa del fármaco-enlazador en el conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo que no se une covalentemente al anticuerpo. Asumiendo que todos los grupos maleimida del fármaco-enlazador en la mezcla de reacción se han extinguido con cisteína, el fármaco no unido es el aducto extinguido de cisteína del compuesto de fármaco-enlazador, es decir, fármaco-enlazador-cys. El conjugado proteínico de fármaco-enlazador-anticuerpo se desnaturaliza, se precipita, y se aísla por centrifugación en las condiciones en las que el fármaco-enlazador-cys es soluble. El fármaco-enlazador-cys no unido se detecta cuantitativamente por HPLC, y el cromatograma resultante se compara con una curva estándar para determinar la concentración fármaco-enlazador-cys no unido en la muestra. Esta concentración se divide por la concentración total del fármaco en el conjugado como se determina utilizando el Procedimiento General O y el Procedimiento General Q.
- 40
- 45
- 50 Específicamente, se preparan 100 µl de "solución de trabajo" de un aducto de 100 µM de fármaco-enlazador-cys añadiendo 1 µl de 100 mM de cisteína en PBS/DTPA y un volumen adecuado de solución madre de un compuesto de fármaco-enlazador a 98 µl de metanol/PBS al 50%. El "volumen apropiado" en litros se calcula utilizando la fórmula: V = 1e-8/[fármaco-enlazador]. Se etiquetan seis tubos como sigue: "0", "0,5", "1", "2", "3", y "5", y se coloca

la cantidad apropiada de solución de trabajo en cada tubo y se diluye con metanol/PBS al 50% para obtener un volumen total de 100 ml en cada tubo. Las etiquetas indican la concentración en μM de los estándares.

5 Se recogen una solución de 50 μl de un conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo y una solución de 50 μl de la mezcla de reacción de cisteína extinguida ("qrm") en tubos de ensayo por separado y cada uno se diluye con 50 μl de metanol que ha sido enfriado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Las muestras se enfrían a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min.

10 Las muestras se centrifugan a 13.000 rpm en una centrifuga de sobremesa durante 10 minutos. Los sobrenadantes se transfieren a viales de HPLC, y se analizan alícuotas de 90 μl de cada muestra por separado por HPLC (columna C12 RP (Phenomenex) y se monitorizan con la máxima absorbancia del compuesto de fármaco-enlazador utilizando un caudal de 1,0 ml / min. El eluyente utilizado es un gradiente lineal de MeCN que varía de 10 a 90% en solución acuosa de fosfato de amonio 5 mM, pH 7,4, durante 10 minutos, luego 90% de MeCN durante 5 min.; luego se vuelve a las condiciones iniciales). El aducto de fármaco-enlazador-cys eluye generalmente entre 7 y 10 minutos.

15 Se prepara una curva estándar trazando el área pico de los estándares frente a su concentración (en μM). Se realiza el análisis de regresión lineal para determinar la ecuación y el coeficiente de correlación de la curva estándar. Los valores de R^2 son típicamente $> 0,99$. A partir de la ecuación de regresión se determina la concentración del aducto de fármaco-enlazador-cys en la muestra de HPLC y en el conjugado, utilizando las fórmulas:

$$[\text{Fármaco-Enlazador-Cys}]_{(\text{muestra HPLC})} = (\text{área Pico} - \text{intercepción})/\text{inclinación}$$

$$[\text{Fármaco-Enlazador-Cys}]_{(\text{conjugado})} = 2 \times [\text{Fármaco-Enlazador-Cys}]_{(\text{muestra HPLC})}$$

El porcentaje del aducto de fármaco-enlazador-cys se puede determinar mediante la fórmula:

$$\% \text{ Fármaco-Enlazador-Cys} = 100 \times [\text{Fármaco-Enlazador-Cys}]_{(\text{conjugado})}/[\text{fármaco}]$$

20 donde [fármaco] = [conjugado] x fármaco/Anticuerpo, [conjugado] se determina utilizando el ensayo de concentración de conjugado, y la relación fármaco : anticuerpo se determina usando el ensayo de relación de fármaco : anticuerpo.

25 Procedimiento General Q: Determinación de la concentración de conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo para enlazadores de fármacos con absorbancia de uv mínima a 280 nm. La concentración de conjugado fármaco-enlazador-anticuerpo se puede determinar de la misma manera que la concentración del anticuerpo de origen, mediante la medición de la absorbancia a 280 nm de una dilución adecuada, utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{Conjugado}] (\text{mg/ml}) = \text{OD}_{280} \times \text{factor de dilución}/1,4) \times 0,9$$

30 Determinación de la concentración de conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo para enlazadores de fármacos con absorbancia de uv substancial a 280 nm (por. ej. compuestos 68 y 69). Debido a que las absorbancias de los compuestos 68 y 69 se solapan con las absorbancias de un anticuerpo, la determinación espectrofotométrica de la concentración del conjugado es más útil cuando la medición se realiza utilizando las absorbancias tanto a 270 nm como a 280 nm. Utilizando estos datos, la concentración molar del conjugado de fármaco-enlazador-ligando viene dada por la siguiente fórmula:

$$[\text{Conjugado}] = (\text{OD}_{280} \times 1,23 \text{ e}^{-5} - \text{OD}_{270} \times 9,35 \text{ e}^{-6}) \times \text{factor de dilución}$$

35 donde los valores $1,23\text{e}^{-5}$ y $9,35\text{e}^{-6}$ se calculan a partir de los coeficientes de extinción molar del fármaco y el anticuerpo, que se estima como:

$$e_{270} \text{ Fármaco} = 2,06\text{e}^4 \quad e_{270} \text{ Anticuerpo} = 1,87\text{e}^5$$

$$e_{280} \text{ Fármaco} = 1,57\text{e}^4 \quad e_{280} \text{ Anticuerpo} = 2,24\text{e}^5$$

40 Procedimiento general R: Determinación del estado de agregación del anticuerpo en un conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo. Una cantidad adecuada ($\sim 10\text{ }\mu\text{g}$) de un conjugado de fármaco-enlazador-anticuerpo se eluye a través de una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), columna (Tosoh Biosep SW3000 4,6 mm x 30 cm eluida a 0,35 ml/min. con PBS) en condiciones normales. Los cromatogramas se obtienen a 220 nm y 280 nm y se calcula la relación $\text{OD}_{280}/\text{OD}_{220}$. El agregado correspondiente por lo general tiene un tiempo de retención de entre unos 5,5 y 7 minutos, y tiene aproximadamente la misma relación de $\text{OD}_{280}/\text{OD}_{220}$ que el conjugado monomérico de fármaco-enlazador-anticuerpo.

45

5.8 composiciones

En otros aspectos, la presente invención proporciona una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, que comprende preferiblemente una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula la y un soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por comodidad, los compuestos de fórmula la útiles en la invención se

pueden llamar simplemente compuestos de la invención. Las composiciones son adecuadas para la administración humana.

5 Las composiciones de la presente invención pueden tener cualquier forma que permita que la composición se administre de forma intravenosa a seres humanos. Por ejemplo, la composición puede ser en forma de un sólido o líquido. Las otras vías de administración descritas aquí incluyen, la oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, intramusculares, intraesternales o técnicas de infusión. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse con el fin de permitir que un compuesto de la invención sea biodisponible tras la administración de la composición a un animal. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación.

10 Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden ser no tóxicos en las cantidades utilizadas. Será evidente para los expertos en la materia que la dosis óptima del o de los ingredientes activos en la composición farmacéutica dependerá de una variedad de factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, humano), la forma particular del compuesto de la invención, la forma de administración, y la composición empleada.

15 El soporte o vehículo farmacéuticamente aceptable puede estar en partículas, de modo que las composiciones estén, por ejemplo, en forma de polvo. El o los soportes pueden ser líquidos, con las composiciones siendo, por ejemplo, un líquido inyectable.

20 La composición puede estar en forma de líquido, por ejemplo, una solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser útil para suministrarlo por inyección. En una composición para administración por inyección, también se pueden incluir uno o más de un surfactante, conservante, agente humectante, dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizador y agente isotónico.

25 Las composiciones líquidas de la invención, ya se trate de soluciones, suspensiones u otra forma similar, también puede incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos, tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio disolvente o de suspensión, polietilenglicol, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros solventes, agentes antibacterianos tales como alcohol bencilico o metilparabeno, antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético, tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición parenteral puede estar encerrada en una ampolla, una jeringa desechable o un frasco de dosis múltiples de vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante preferido. Una composición inyectable es preferiblemente estéril.

30 La cantidad del compuesto de la invención que es eficaz en el tratamiento de una enfermedad o condición en particular dependerá de la naturaleza de la enfermedad o condición, y puede ser determinado por técnicas clínicas estándares. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los rangos óptimos de dosificación. La dosis precisa que hay que emplear en las composiciones dependerá también de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debería decidirse según el juicio del profesional habilitado y las circunstancias de cada paciente.

35 Las composiciones comprenden una cantidad efectiva de un compuesto de la invención de tal manera que se obtenga una dosificación adecuada. Típicamente, esta cantidad es de al menos 0,01% de un compuesto de la invención en peso de la composición. Las composiciones preferidas de la presente invención se preparan de tal manera que una unidad de dosificación parenteral contenga aproximadamente 0,01% a 2% en peso del compuesto de la invención.

40 Para la administración intravenosa, la composición puede comprender desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 250 mg de un compuesto de la invención por kg de peso corporal del animal. Preferiblemente, la cantidad administrada estará en el rango de 4 a 25 mg/kg de peso corporal del compuesto de la invención.

45 En general, la dosificación del compuesto de la invención administrada a un animal es de alrededor de 0,1 mg/kg a 250 mg/kg de peso corporal del animal. Preferiblemente, la dosis administrada a un animal es entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del animal, más preferiblemente de 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del animal.

50 Los compuestos o composiciones de la invención se pueden administrar intravenosamente por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección. Se conocen varios sistemas de suministro, por ejemplo, la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc, y se pueden utilizar para administrar un compuesto o composición de la invención. En algunas formas de realización, se administra más de un compuesto o composición de la invención a un animal. El modo preferido de administración se deja a la discreción del profesional habilitado, y dependerá en parte del sitio de la condición médica (por ejemplo, el sitio del cáncer o enfermedad autoinmune).

55

El término "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el que se administra un compuesto de la invención. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, como agua y aceites, incluyendo los de origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como el aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los soportes pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea, y similares. Además, se pueden utilizar auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y agentes colorantes. En una forma de realización, cuando se administra a un animal, los compuestos o composiciones de la invención y los soportes farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un soporte preferido cuando los compuestos de la invención se administran por vía intravenosa. También se puede emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como soportes líquidos para soluciones inyectables. Si se desea, las presentes composiciones también pueden contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes o agentes reguladores del pH.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, cápsulas, cápsulas que contengan líquidos, polvos, o cualquier otra forma adaptada para su uso intravenoso. Soportes farmacéuticamente aceptables adecuados han sido descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

Los compuestos de la invención se formulan de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a los seres humanos. Por lo general, los soportes o vehículos para la administración intravenosa son soluciones tampón acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones pueden incluir también un agente solubilizante. Las composiciones para la administración por vía intravenosa, opcionalmente pueden incluir un anestésico local como la lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en forma de dosis unitarias, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente cerrado, como una ampolla o sobrecito indicando la cantidad de ingrediente activo. Cuando un compuesto de la invención se administra por infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de grado farmacéutico. Cuando el compuesto de la invención se administra por inyección, se pueden proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes puedan ser mezclados antes de su administración.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar usando metodología bien conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición destinada a ser administrada por inyección puede ser preparada combinando un compuesto de la invención con agua para formar una solución. Se puede añadir un surfactante para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea. Los surfactantes son compuestos que interactúan de forma no covalente con un compuesto de la invención con el fin de facilitar la disolución o suspensión homogénea del compuesto activo en el sistema acuoso de suministro.

5.9 usos terapéuticos de los compuestos de la invención

Los compuestos de la invención son útiles para tratar el cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en un animal.

5.10 tratamiento del cáncer

Los compuestos de la invención son útiles para inhibir la multiplicación de células tumorales o células cancerosas o para tratar el cáncer en un animal. Los compuestos de la invención pueden utilizarse, por lo tanto, en una variedad de opciones para el tratamiento de cánceres en animales. Los conjugados de fármaco-enlazador-ligando pueden utilizarse para administrar un fármaco o unidad de fármaco a una célula tumoral o célula cancerosa. Sin pretender imponer ninguna teoría, en una realización, la unidad de ligando de un compuesto de la invención se une o se asocia al antígeno asociado a la célula cancerosa o célula tumoral, y el compuesto de la invención puede absorberse en el interior de una célula cancerosa o célula tumoral a través de endocitosis mediada por un receptor. El antígeno se puede unir a una célula cancerosa o célula tumoral o puede ser una proteína de matriz extracelular asociada a la célula cancerosa o célula tumoral. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias de péptidos específicas dentro de la unidad de enlazador son escindidas hidrolíticamente por una o más proteasas asociadas a las células tumorales o células cancerosas, generando la liberación de un fármaco o un compuesto de fármaco-enlazador. El fármaco o compuesto de fármaco-enlazador liberado es entonces libre de emigrar en el citosol e inducir las actividades citotóxicas. En una forma de realización alternativa, el fármaco o unidad de fármaco se escinde del compuesto de la invención fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y el fármaco o compuesto de fármaco-enlazador penetra después en la célula.

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

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

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

En una forma de realización, la célula tumoral o la célula cancerosa es del tipo de tumor o cáncer del cual el animal necesita tratamiento o prevención.

- 5 La especificidad de la unidad de ligando de una célula tumoral o célula cancerosa puede ser importante para la determinación de aquellos tumores o cánceres que se tratan con mayor eficacia. Por ejemplo, los compuestos de la invención que tienen una unidad de ligando BR96 pueden ser útiles para el tratamiento de carcinomas de antígeno positivo, incluyendo los de pulmón, mama, colon, ovarios y páncreas. Los compuestos de la invención que tienen una unidad de ligando anti-CD30 o anti-CD40 pueden ser útiles para el tratamiento de neoplasias hematológicas.
- 10 Otros tipos particulares de cánceres que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen, aunque no exclusivamente, los descritos en la Tabla 3.

TABLA 3

Tumores sólidos, incluyendo, aunque no exclusivamente:

	fibrosarcoma
15	mixosarcoma
	liposarcoma
	condrosarcoma
	sarcoma osteogénico
	cordoma
20	angiosarcoma
	endoteliosarcoma
	linfangiosarcoma
	linfangioendoteliosarcoma
	sinovioma
25	mesotelioma
	tumor de Ewing
	leiomiosarcoma
	rabdomiosarcoma
	cáncer de colon
30	(continuación)
	cáncer colorrectal
	cáncer de riñón
	cáncer de páncreas
	cáncer de hueso
35	cáncer de mama
	cáncer de ovario
	cáncer de próstata
	cáncer de esófago

	cáncer de estómago
	cáncer oral
	cáncer nasal
	cáncer de garganta
5	carcinoma de células escamosas
	carcinoma de células basales
	adenocarcinoma
	carcinoma de glándula sudorípara
	carcinoma de glándula sebácea
10	carcinoma papilar
	adenocarcinomas papilares
	cistoadenocarcinoma
	carcinoma medular
	carcinoma broncogénico
15	carcinoma de células renales
	hepatoma
	carcinoma del conducto biliar
	coriocarcinoma
	seminoma
20	carcinoma embrionario
	tumor de Wilms
	cáncer de cuello uterino
	cáncer de útero
	cáncer testicular
25	carcinoma pulmonar de células pequeñas
	carcinoma de vejiga
	cáncer de pulmón
	carcinoma epitelial
	(continuación)
30	glioma
	glioblastoma multiforme
	astrocitoma
	meduloblastoma
	craneofaringioma
35	ependimoma

	pinealoma
	hemangioblastoma
	neuroma acústico
	oligodendroglioma
5	meningioma
	cáncer de piel
	melanoma
	neuroblastoma
	retinoblastoma
10	cánceres de origen sanguíneo incluyendo, aunque no exclusivamente:
	leucemia linfoblástica aguda "LLA"
	leucemia linfoblástica aguda de células B
	leucemia linfoblástica aguda de células T
	leucemia mieloblástica aguda "LMA"
15	leucemia promielocítica aguda "APL"
	leucemia monoblástica aguda
	leucemia eritroleucémica aguda
	leucemia megacarioblástica aguda
	leucemia mielomonocítica aguda
20	leucemia no linfocítica aguda
	leucemia indiferenciada aguda
	leucemia mielocítica crónica "LMC"
	leucemia linfocítica crónica "LLC"
	leucemia de células peludas
25	mieloma múltiple
	leucemias agudas y crónicas:
	linfoblástica
	mielógena
	linfocítica
30	leucemias mielocíticas
	Linfomas:
	Enfermedad de Hodgkin
	Linfoma no Hodgkin
	Mieloma múltiple
35	Macroglobulinemia de Waldenström

Enfermedad de cadena pesada

Policitemia vera

5 Los compuestos de la invención también pueden ser utilizados como quimioterapéuticos en forma no selectiva. Por ejemplo, los propios fármacos o compuestos de fármaco-enlazador son útiles para cánceres y tumores de ovario, sistema nervioso central, riñón, pulmón, colon, melanoma, o hematológicos.

Los compuestos de la invención proporcionan una conjugación específica selectiva del tumor o cáncer, reduciendo así la toxicidad general de estos compuestos. Las unidades de enlazador estabilizan los compuestos de la invención en la sangre, sin embargo, son escindibles por las proteasas específicas del tumor dentro de la célula, liberando un fármaco.

10 5.10.1 terapia multimodal para el cáncer

El cáncer, incluyendo, aunque no exclusivamente, un tumor, metástasis, o cualquier otra enfermedad o trastorno caracterizado por el crecimiento incontrolado de células, puede tratarse o prevenirse con la administración de un compuesto de la invención.

15 En otras formas de realización, la invención proporciona los usos de los compuestos de la invención para el tratamiento o la prevención del cáncer, comprendiendo administrar a un animal que lo necesite una cantidad efectiva de un compuesto de la invención y un agente quimioterapéutico. En una forma de realización, el agente quimioterapéutico es aquel con el cual no se ha constatado que el tratamiento del cáncer sea refractario. En otra forma de realización, el agente quimioterapéutico es aquel con el cual se ha constatado que el tratamiento de cáncer es refractario. Los compuestos de la invención pueden ser administrados a un animal que también haya sido sometido a cirugía como tratamiento para el cáncer.

20 En una forma de realización, el método adicional de tratamiento es la radioterapia.

25 En una forma de realización específica, el compuesto de la invención se administra simultáneamente con el agente quimioterapéutico o con radioterapia. En otra forma de realización específica, el agente quimioterapéutico o la radioterapia se administra antes o después de la administración de un compuesto de la invención, preferiblemente al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, más preferiblemente varios meses (por ejemplo, hasta tres meses), antes o después de la administración de un compuesto de la invención.

30 Un agente quimioterapéutico puede ser administrado en una serie de sesiones, pudiéndose administrar cualquiera o una combinación de los agentes quimioterapéuticos que se relacionan en la Tabla 4. Con respecto a la radiación, se puede utilizar cualquier protocolo de radioterapia en función del tipo de cáncer a tratar. Por ejemplo, aunque no exclusivamente, se puede administrar radiación de rayos X, en particular se puede utilizar con megavoltaje de alta energía (radiación de mayor energía que 1 MeV) para tumores profundos, y se puede utilizar radiación de haz de electrones y de rayos X con ortovoltaje para el cáncer de piel. También se pueden administrar radioisótopos que emitan rayos gamma, tales como isótopos radiactivos o radio, cobalto y otros elementos.

35 Además, la invención proporciona los usos para el tratamiento de cáncer con un compuesto de la invención como una alternativa a la quimioterapia o radioterapia cuando la quimioterapia o la radioterapia hayan demostrado o pudieran demostrar resultados demasiado tóxicos, por ejemplo, den como resultado efectos secundarios inaceptables o intolerables para el sujeto que está siendo tratado. El animal tratado puede, opcionalmente, ser tratado con otro tratamiento para el cáncer, como cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo de que el tratamiento se encuentre aceptable o tolerable.

40 Los compuestos de la invención también pueden ser utilizados in vitro o ex vivo, como para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, incluyendo, aunque no exclusivamente, las leucemias y los linfomas, tales tratamientos implicando trasplantes autólogos de células madre. Esto puede implicar un proceso de múltiples pasos en el que las células madre autólogas hematopoyéticas del animal se cosechan y purgan de todas las células cancerosas, luego se erradica la población restante de células de la médula ósea del paciente a través de la administración de una dosis elevada de un compuesto de la invención con o sin el acompañamiento de una terapia de alta dosis de radiación, y el injerto de células madre se vuelve a inyectar en el animal. Entonces se proporciona cuidado de apoyo mientras se restablece la función de la médula ósea y el animal se recupera.

45 5.10.2 terapia polifarmacológica para el cáncer

50 La presente invención incluye los usos para el tratamiento del cáncer, mediante la administración a un animal que lo necesite de una cantidad efectiva de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico que es un agente contra el cáncer. Los agentes contra el cáncer incluyen, aunque no exclusivamente, metotrexato, taxol, L-asparaginasa, mercaptopurina, tioguanina, hidroxurea, citarabina, ciclofosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbina, topotecan, mostazas de nitrógeno, citoxán, etopósido, 5-

fluorouracilo, BCNU, irinotecán, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorrubicina, dactinomicina, plicamicina, mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel. En una forma de realización preferida, el agente contra el cáncer incluye, aunque no exclusivamente, un fármaco relacionado en la Tabla 4.

5

TABLA 4

Agentes alquilantes	
Mostazas de nitrógeno:	ciclofosfamida
	Ifosfamida
	trofosfamida
	Clorambucilo
Nitrosoureas:	carmustina (BCNU)
	Lomustina (CCNU)
Alquilsulfonatos	busulfán
	Treosulfán
Triacenos:	Dacarbazina
Compuestos que contienen platino:	Cisplatino
	carboplatino
Alcaloides vegetales	
Alcaloides de vinca:	vincristina
	Vinblastina
	Vindesina
	Vinorelbina
Taxoides:	paclitaxel
	Docetaxol
Inhibidores de la topoisomerasa del ADN	
Epipodofilinas:	etopósido
	Tenipósido
	Topotecán
	9-aminocamptotecina
	camptotecina
	crisnatol
mitomicinas:	Mitomicina C
Antimetabolitos	
Antifolatos:	

ES 2 556 641 T3

Inhibidores de la DHFR:	metotrexato Trimetrexato
Inhibidores de la IMP deshidrogenasa:	ácido micofenólico Tiazofurina Ribavirina EICAR
Inhibidores de la ribonucleótido reductasa:	hidroxiurea deferoxamina
Análogos de la pirimidina:	
Análogos de uracilo	5-Fluorouracilo Floxuridina Doxifluridina Ratitrexed
análogos de la citosina:	citarabina (ara-C) Arabinósido de citosina fludarabina
Análogos de la purina:	mercaptopurina Tioguanina
Terapias hormonales:	
Antagonistas de receptores:	
Antiestrógeno	Tamoxifeno Raloxifeno megestrol
Agonistas de la LHRH:	goserelina Acetato de leuprolida
Antiandrógenos:	flutamida bicalutamida
Retinoides/Deltoides	
Análogos de la vitamina D3	EB 1089 CB 1093 KH 1060
Terapias fotodinámicas:	vertoporfina (BPD-MA) Ftalocianina fotosensibilizador Pc4

	Dimetoxi-hipocrelina A (2BA-2-DMHA)
Citocinas:	Interferón α Interferón- γ Factor de necrosis tumoral
Otros:	
Inhibidores de isoprenilación:	Lovastatina
Neurotoxinas dopaminérgicas:	ión 1-metil-4-fenilpiridinio
Inhibidores del ciclo celular:	estaurosporina
Actinomicinas:	Actinomicina D Dactinomicina
Bleomicinas:	Bleomicina A2 Bleomicina B2 Peplomicina
Antraciclinas:	daunorrubicina
Agentes alquilantes	Doxorrubicina (adriamicina) Idarrubicina Epirubicina Pirarrubicina Zorrubicina Mitoxantrona
Inhibidores de la MDR:	verapamilo
Inhibidores de la ATPasa Ca^{2+} :	tapsigargina

5.11 tratamiento de enfermedades autoinmunes

5 Los compuestos de la invención son útiles para eliminar o inhibir la replicación de una célula que produce una enfermedad autoinmune o para tratar una enfermedad autoinmune. Los compuestos de la invención pueden utilizarse, por lo tanto, en una variedad de opciones para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un animal. Los conjugados de fármaco-enlazador-ligando pueden utilizarse para administrar un fármaco a una célula diana. Sin pretender imponer ninguna teoría, en una forma de realización, el conjugado de fármaco-enlazador-ligando se asocia a un antígeno en la superficie de una célula diana, y el compuesto de la invención es llevado hasta el interior de la célula diana mediante endocitosis mediada por un receptor. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias de péptidos específicas dentro de la unidad de enlazador son escindidas enzimática o hidrolíticamente, generando la liberación de un fármaco. El fármaco liberado es entonces libre de emigrar en el citosol e inducir las actividades citotóxicas. En una forma de realización alternativa, el fármaco se escinde del compuesto de la invención fuera de la célula diana, y el fármaco penetra después en la célula.

En otra forma de realización, la unidad de ligando se une al antígeno autoinmune.

15 En otra forma de realización, la unidad de ligando se une a un antígeno autoinmune que se encuentra en la superficie de una célula.

En otra forma de realización, la célula diana es el tipo de célula que produce el antígeno autoinmune que causa la enfermedad en el animal que necesita de su tratamiento o prevención.

En una forma de realización preferida, el ligando se une a linfocitos activos que se asocian con el estado de la enfermedad autoinmune.

5 En otra forma de realización, los compuestos de la invención eliminan o inhiben la multiplicación de las células que producen un anticuerpo autoinmune asociado a una enfermedad autoinmune en particular.

10 Los tipos particulares de enfermedades autoinmunes que pueden ser tratadas con los compuestos de la invención incluyen, aunque no exclusivamente, los trastornos relacionados con los linfocitos Th2, (por ejemplo, dermatitis atópica, asma atópica, rinitis rinoconjuntivitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica y enfermedad injerto contra huésped); los trastornos relacionados con los linfocitos Th1 (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjorgren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, y tuberculosis); los trastornos relacionados con los linfocitos B activados (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes tipo I), y los que se describen en la Tabla 5.

15

TABLA 5

	Hepatitis crónica activa
	Enfermedad de Hodgkin
	Alveolitis alérgica
	Reacción alérgica
20	Rinitis alérgica
	Síndrome de Alport
	Anafilaxia
	Espondilitis anquilosante
	Síndrome antifosfolípido
25	Artritis
	Ascariasis
	Aspergilosis
	Alergia atópica
	Dermatitis atópica
30	Rinitis atópica
	Enfermedad de Behcet
	Neumopatía del avicultor
	Asma bronquial
	Síndrome de Caplan
35	Cardiomiopatía
	Enfermedades celíacas
	Enfermedad de Chagas
	Glomerulonefritis crónica
	Síndrome de Cogan
40	Enfermedad de aglutininas frías

ES 2 556 641 T3

	Infeción de rubéola congénita
	Síndrome de CREST
	Enfermedad de Crohn
	Crioglobulinemia
5	Síndrome de Cushing
	Dermatomiositis
	Lupus discoide
	Síndrome de Dressler
	Síndrome de Eaton-Lambert
10	Infeción por echovirus
	Encefalomielitis
	Oftalmopatía endocrina
	Infeción por el virus de Epstein-Barr
	Obstrucción de las vías aéreas en equinos
15	Eritematosi
	Síndrome de Evan
	Síndrome de Felty
	Fibromialgia.
	Ciclitis de Fuch
20	Atrofia gástrica
	Alergia gastrointestinal
	Arteritis de células gigantes
	Glomerulonefritis
	Síndrome de Goodpasture
25	Enfermedad de injerto contra huésped
	Enfermedad de Graves
	Enfermedad de Guillain-Barre
	Tiroiditis de Hashimoto
	Anemia hemolítica
30	Púrpura de Schönlein-Henoch
	Atrofia suprarrenal idiopática
	Fibriti pulmonar idiopática
	Nefropatía por IgA
	Enfermedades inflamatorias del intestino
35	Diabetes mellitus insulino-dependiente

ES 2 556 641 T3

	Artritis juvenil
	Diabetes mellitus juvenil (Tipo I)
	Síndrome de Lambert-Eaton
	Laminitis
5	Liquen plano
	Hepatitis lupoide
	Lupus
	Linfopenia
	Enfermedad de Meniere
10	Enfermedad mixta del tejido conectivo
	Esclerosis Múltiple
	Miastenia Gravis
	Anemia perniciosa
	Síndromes poliglandulares
15	Demencia presenil
	Agammaglobulinemia primaria
	Cirrosis biliar primaria
	Psoriasis
	Artritis psoriásica
20	Fenómeno de Raynaud
	Aborto recurrente
	Síndrome de Reiter
	Fiebre reumática
	Artritis reumatoide
25	Síndrome de Sampter
	Esquistosomiasis
	Síndrome de Schmidt
	Esclerodermia
	Síndrome de Shulman
30	Síndrome de Sjorgen
	Síndrome de Stiff-Man
	Oftalmía simpática
	Lupus eritematoso sistémico
	Arteritis de Takayasu
35	Arteritis de la temporal

	Tiroiditis
	Trombocitopenia
	Tirotoxicosis
	Necrólisis epidérmica tóxica
5	Resistencia a la Insulina Tipo B
	Diabetes mellitus tipo I
	Colitis ulcerosa
	Uveítis
	Vitiligo
10	Macroglobulemia de Waldenstrom
	Granulomatosis de Wegener

5.11.1 terapia polifarmacológica de enfermedades autoinmunes

La presente invención también incluye el uso para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, mediante la administración a un animal que lo necesite de una cantidad efectiva de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico conocido para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En una forma de realización, el agente contra la enfermedad autoinmune incluye, aunque no exclusivamente, los agentes que enumeran en la Tabla 6.

Tabla 6

	ciclosporina
	ciclosporina A
20	micofenolato mofetilo
	sirolimus
	tacrolimus
	enanercept
	prednisona
25	azatioprina
	metotrexato ciclofosfamida
	prednisona
	ácido aminocaproico
	cloroquina
30	hidroxicloroquina
	hidrocortisona
	dexametasona
	clorambucil
	DHEA
35	danazol
	bromocriptina

meloxicam

infiximab

5.12 tratamiento de enfermedades infecciosas

- 5 Los compuestos de la invención son útiles para eliminar o inhibir la multiplicación de una célula que produce una enfermedad infecciosa o para tratar una enfermedad infecciosa. Los compuestos de la invención pueden utilizarse, por lo tanto, en una variedad de opciones para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un animal. Los conjugados de fármaco-enlazador-ligando pueden utilizarse para administrar un fármaco a una célula diana. Sin pretender imponer ninguna teoría, en una forma de realización, el conjugado de fármaco-enlazador-ligando se asocia a un antígeno en la superficie de una célula diana, y el compuesto de la invención es llevado hasta el interior
- 10 de la célula diana mediante endocitosis mediada por un receptor. Una vez dentro de la célula, una o más secuencias de péptidos específicas dentro de la unidad de enlazador son escindidas enzimática o hidrolíticamente, generando la liberación de un fármaco. El fármaco liberado es entonces libre de emigrar en el citosol e inducir las actividades citotóxicas. En una forma de realización alternativa, el fármaco se escinde del compuesto de la invención fuera de la célula diana, y el fármaco penetra después en la célula.
- 15 En una forma de realización, la unidad de ligando se une a la célula de la enfermedad infecciosa.
- En una forma de realización, la enfermedad infecciosa es del tipo de enfermedad infecciosa de la que el animal necesita tratamiento o prevención.
- En otra forma de realización, los compuestos de la invención eliminan o inhiben las multiplicaciones de las células que producen una enfermedad infecciosa en particular.
- 20 Los tipos particulares de enfermedades infecciosas que pueden tratarse con los compuestos de la invención incluyen, aunque no exclusivamente, los descritos en la Tabla 7.

TABLA 7

Enfermedades bacterianas:

- 25 Difteria
- Tos ferina
- Bacteriemia oculta
- Infección del tracto urinario
- Gastroenteritis
- Celulitis
- 30 Epiglotitis
- Traqueítis
- Hipertrofia de adenoides
- Absceso retrofaríngeo
- Impétigo
- 35 Ectima
- Neumonía
- Endocarditis
- Artritis séptica
- Enfermedad neumocócica
- 40 Peritonitis
- Bactermia

	Meningitis
	Meningitis purulenta aguda
	Uretritis
	Cervicitis
5	Proctitis
	Faringitis
	Salpingitis
	Epididimitis
	Gonorrea
10	Sífilis
	Listeriosis
	Ántrax
	Nocardiosis
	Salmonela
15	Fiebre Tifoidea
	Disentería
	Conjuntivitis
	Sinusitis
	Brucelosis
20	Tularemia
	Cólera
	Peste bubónica
	Tétanos
	Enteritis necrotizante
25	Actinomicosis
	Infecciones por anaerobios mixtos
	Sífilis
	Fiebre recurrente
	Leptospirosis
30	Enfermedad de Lyme
	Fiebre por mordedura de rata
	Tuberculosis
	Linfadenitis
	Lepra
35	Clamidia

	Neumonía por clamidia
	Tracoma
	Conjuntivitis de inclusión
	Enfermedades sistémicas por hongos:
5	Histoplasmosis
	Coccidiodomicosis
	Blastomicosis
	Esporotricosis
	Criptococcosis
10	Candidiasis sistémica
	Aspergilosis
	Mucormicosis
	Micetoma
	Cromomicosis
15	Enfermedades por rickettsias:
	Tifus
	Fiebre de las Montañas Rocosas
	Erliquiosis
	Rickettsiosis transmitidas por garrapatas
20	Rickettsiosis pustulosa
	Fiebre Q
	Bartonelosis
	Enfermedades parasitarias:
	Malaria
25	Babesiosis
	Enfermedad africana del sueño
	Enfermedad de Chagas
	Leishmaniasis
	Fiebre dum-dum
30	Toxoplasmosis
	Meningoencefalitis
	Queratitis
	Entamebiasis
	Giardiasis
35	Criptosporidiasis

	Isosporiasis
	Ciclosporiasis
	Microsporidiosis
	Ascariasis
5	Infección por tricocéfalos
	Infección por uncinarias
	Infección por oxiuros
	Infección por larva migrans ocular
10	Triquinosis
	Enfermedad del gusano de Guinea
	Filariasis linfática
	Loiasis
	Ceguera de los ríos
	Infección del gusano del corazón canino
15	Esquistosomiasis
	Prurito del nadador
	Duela pulmonar oriental
	Duela hepática Oriental
20	Fascioliasis
	Fasciolopsiasis
	Opistorquiasis
	Infecciones por tenia
	Enfermedad hidatídica
	Enfermedad hidatídica alveolar
25	Enfermedades virales:
	Sarampión
	Panencefalitis esclerosante subaguda
	Resfriado Común
	Paperas
30	Rubéola
	Roséola
	Eritema infeccioso
	Varicela
	Infección por virus respiratorio sincicial
35	Crup

ES 2 556 641 T3

	Bronquiolitis
	Mononucleosis infecciosa
	Poliomielitis
	Herpangina
5	Fiebre aftosa
	Enfermedad de Bornholm
	Herpes genital
	Verrugas genitales
10	Meningitis aséptica
	Miocarditis
	Pericarditis
	Gastroenteritis
	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)
	Síndrome de Reye
15	Síndrome de Kawasaki
	Gripe
	Bronquitis
	Neumonía "errante" vírica
	Enfermedad respiratoria febril aguda
20	Fiebre faringoconjuntival aguda
	Queratoconjuntivitis epidémica
	Virus del herpes simple 1 (HSV-1)
	Virus del herpes simple 2 (HSV-2)
	Herpes zóster
25	Enfermedad de inclusión citomegálica
	Rabia
	Leucoencefalopatía multifocal progresiva
	Kuru
	Insomnio familiar fatal
30	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
	Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker
	Paraparesia espástica tropical
	Encefalitis equina occidental
	Encefalitis de California
35	Encefalitis de San Luis

- 5 Fiebre Amarilla
- Dengue
- Coriomeningitis linfocítica
- Fiebre de Lassa
- Fiebre hemorrágica
- Síndrome pulmonar por hantavirus
- Infecciones por virus de Marburg
- Infecciones por virus del Ébola
- Viruela

10 5.12.1 terapia polifarmacológica de enfermedades infecciosas

La presente invención también incluye los usos para el tratamiento de una enfermedad infecciosa, por administración a un animal que lo necesite de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico, que es un agente contra la enfermedad infecciosa. En una forma de realización, el agente contra la enfermedad infecciosa es, aunque no exclusivamente, un agente de los relacionados en la Tabla 8.

15 TABLA 8 Agentes antibacterianos:

Antibióticos β -lactámicos:

- 20 Penicilina G
- Penicilina V
- Cloxacilina
- Dicloxacilina
- Meticilina
- Nafcilina
- Oxacilina
- Ampicilina
- 25 Amoxicilina
- Bacampicilina
- Azlocilina
- Carbenicilina
- Mezlocilina
- 30 Piperacilina
- Ticarcilina

Aminoglucósidos:

- 35 Amicacina
- Gentamicina
- Kanamicina
- Neomicina

		Netilmicina
		Estreptomicina
		Tobramicina
	Macrólidos:	
5		Azitromicina
		Claritromicina
		Eritromicina
		Lincomicina
		Clindamicina
10	Tetraciclinas:	
		Demeclociclina
		Doxiciclina
		Minociclina
		Oxitetraciclina
15		Tetraciclina
	Quinolonas:	
		Cinoxacina
		Ácido nalidíxico
	Fluoroquinolonas:	
20		Ciprofloxacina
		Enoxacina
		Grepafloxacina
		Levofloxacina
		Lomefloxacina
25		Norfloxacina
		Ofloxacina
		Esparfloxacina
		Trovafloxacina
	Polipéptidos:	
30		Bacitracina
		Colistina
		Polimixina B
	Sulfonamidas:	
		Sulfisoxazol
35		Sulfametoxazol

		Sulfadiazina
		Sulfametizol
		Sulfacetamida
	Varios agentes antibacterianos:	
5		Trimetoprim
		Sulfametazol
		Cloranfenicol
		Vancomicina
		Metronidazol
10		Quinupristina
		Dalfopristina
		Rifampicina
		Espectinomicina
		Nitrofurantoína
15	Agentes antivirales:	
	Agentes antivirales generales:	
		Idoxuradina
		Vidarabina
		Trifluridina
20		Aciclovir
		Fanciciclovir
		Penciciclovir
		Valaciclovir
		Ganciciclovir
25	Foscarnet	
		Ribavirina
		Amantadina
		Rimantadina
		Cidofovir
30		Oligonucleótidos antisentido
		Inmunoglobulinas
		Interferones
	Fármacos para la infección por el VIH:	
		Zidovudina
35		Didanosina

Zalcitabina

Estavudina

Lamivudina

Nevirapina

5

Delavirdina

Saquinavir

Ritonavir

Indinavir

Nelfinavir

10 5.13 otros agentes terapéuticos

Los presentes usos pueden comprender además un compuesto de la invención y otro agente terapéutico o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos. El compuesto de la invención y el agente terapéutico pueden actuar de forma acumulativa o, más preferiblemente, en sinergia. En una forma de realización preferida, una composición que comprende un compuesto de la invención se administra simultáneamente con la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales, que pueden ser parte de la misma composición o en una composición diferente de la que comprende el compuesto de la invención. En otra forma de realización, un compuesto de la invención se administra antes o después de la administración de otro u otros agentes terapéuticos.

15

Para el tratamiento del cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa, el agente terapéutico puede ser un agente antiemético. Los agentes antieméticos apropiados incluyen, aunque no exclusivamente, metoclopramida, domperidona, proclorperazina, prometazina, clorpromazina, trimetobenzamida, ondansetrón, granisetron, hidroxizina, acetil-leucina, monoetanolamina, alizaprida, azasetron, benzquinamida, bietanautina, bromoprida, buclizina, cleboprida, ciclicina, dimenhidrinato, difenidol, dolasetron, meclizina, metalatal, metopimazina, nabilona, oxiperndil, pipamazina, escopolamina, sulpirida, tetrahydrocannabinoles, tieliperacina, tioproperacina y tropisetron.

20

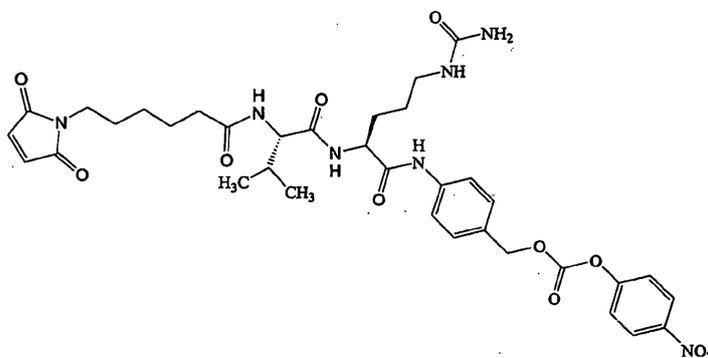
En otra forma de realización, el agente terapéutico puede ser un factor estimulante de colonias hematopoyéticas. Los factores estimulantes de colonias hematopoyéticas adecuados incluyen, aunque no exclusivamente, filgrastim, sargamostim, molgamostim y eritropoyetina alfa.

25

En otra forma de realización, el agente terapéutico puede ser un agente analgésico opioide o no opioide. Los agentes analgésicos opioides incluyen, aunque no exclusivamente, morfina, heroína, hidromorfona, hidrocodona, oximorfona, oxicodona, metopon, apomorfina, normorfina, etorfina, buprenorfina, meperidina, lopermida, anileridina. Los siguientes Ejemplos ilustran conjugados de ligando-fármaco. Su descripción es más amplia que el alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones, e incluyen información sobre compuestos análogos a compuestos útiles en la presente invención.

30

EJEMPLO 1: Preparación del compuesto 21



35

21

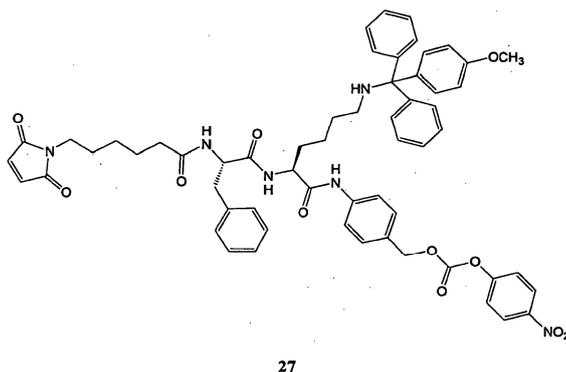
65

Se diluyó Fmoc-(L)-val-(L)-cit-PAB-OH (19) (14,61 g, 24,3 mmol, 1,0 eq., Pat. US 6.214.345 a nombre de Firestone et al.) con DMF (120 ml, 0,2 M) y a esta solución se le añadió una dietilamina (60 ml). La reacción se controló por HPLC y se constató que se completó en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se precipitó con acetato de etilo (aproximadamente 100 ml) bajo sonicación durante 10 minutos. Se añadió éter (200 ml) y el precipitado se sometió de nuevo a sonicación durante 5 min. La solución se dejó reposar durante 30 min. sin agitación y se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar Val-cit-PAB-OH, que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional. Rendimiento: 8,84 g (96 %). Se diluyó Val-cit-PAB-OH (8,0 g, 21 mmol) con DMF (110 ml) y la solución resultante se trató con MC-OSu (Willner et al. *Bioconjugate Chem.* 4, 521,1993, 6,5 g, 21 mmol, 1,0 eq.). La reacción se completó según la HPLC después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el aceite resultante se precipitó con acetato de etilo (50 ml). Después de la sonicación durante 15 min., se añadió éter (400 ml) y la mezcla se sometió de nuevo a sonicación hasta que todas las partículas grandes se rompieron. La solución se filtró y el sólido se secó para proporcionar el compuesto 20 como un sólido blancuzco. Rendimiento: 11,63 g (96 %), ES-MS m/z 757,9 [MH].

El compuesto 20 (8,0 g, 14,0 mmol) se diluyó con DMF (120 ml, 0,12 M) y a la solución resultante se le añadió bis(4-nitrofenil)carbonato (8,5 g, 28,0 mmol, 2,0 eq.) y diisopropiletilamina (3,66 ml, 21,0 mmol, 1,5 eq.). La reacción se completó en 1 h según la HPLC. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite que se precipitó con acetato de etilo, y luego se trituro utilizando ETOAc (aproximadamente 25 ml). El soluto se precipitó aún más con éter (aproximadamente 200 ml) y se trituro durante 15 min. El sólido se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar el compuesto 21, que tuvo una pureza del 93% según la HPLC y se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional. Rendimiento: 9,7 g (94 %).

EJEMPLO 2

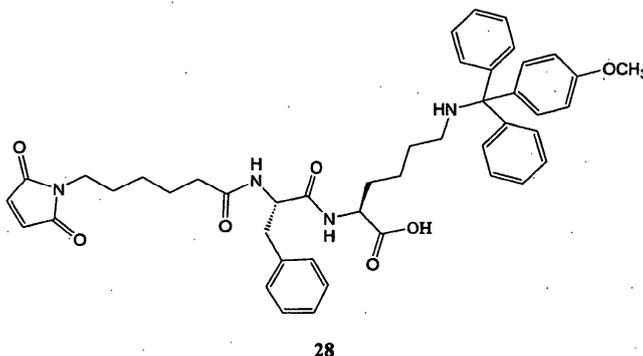
PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 27



El compuesto 26 (2,0 g, 2,31 mmol, 1,0 eq.) se diluyó con diclorometano (30 ml), y a la solución resultante se le añadió bis(4-nitrofenil)carbonato (2,72 g, 8,94 mmol, 3,8 eq.) seguido de diisopropiletilamina (1,04 ml, 5,97 mmol, 2,6 eq.). La reacción se completó en 3 d, según la HPLC. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se trituro con éter, luego se filtró y secó a alto vacío para proporcionar el compuesto 27 como un sólido amarillo (2,37 g, 97%).

EJEMPLO 3

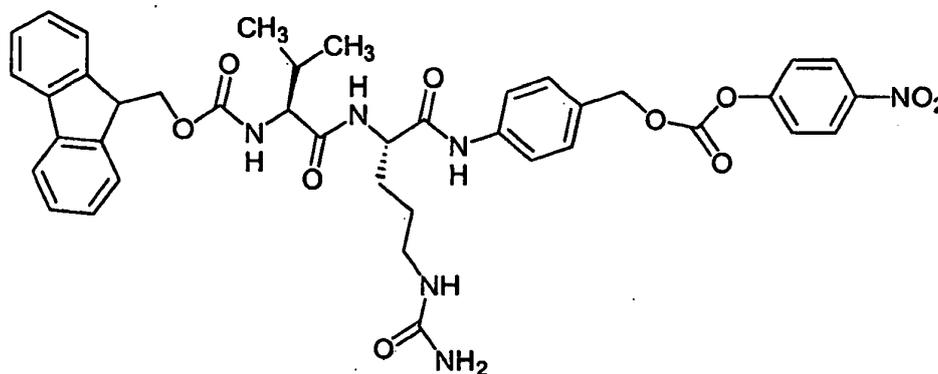
30 PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 28



Se diluyó Fmoc-Phe-Lys (Mtr)-OH (24) (0,5 g, 0,63 mmol, Pat. US 6.214.345 a nombre de Firestone et al.) con diclorometano a una concentración de 0,5 M y a esta solución se le añadió dietilamina en una cantidad que fue de aproximadamente un tercio del volumen del compuesto 24/solución de diclorometano. La reacción se dejó en agitación y se controló utilizando HPLC. Se demostró que se completó por HPLC en 3 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se diluyó con acetato de metilo y luego se reconcentró. El residuo resultante se trituró con éter y se filtró. El sólido residual se diluyó con diclorometano a una concentración de 0,2 M, y a la solución resultante se le añadió MC-OSu (0,20 g, 0,63 mmol, 1,0 eq.) y diisopropiltilamina (0,12 ml, 0,70 mmol, 1,1 eq.). La mezcla de reacción se dejó en agitación bajo atmósfera de nitrógeno durante 16 horas, tras lo cual la HPLC mostró muy poco material de partida. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se trituró con éter para proporcionar el compuesto 28 como un sólido coloreado. Rendimiento: 100 mg (21%), ES-MS m/z 757,9 [MH]⁻.

EJEMPLO 4

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 19A



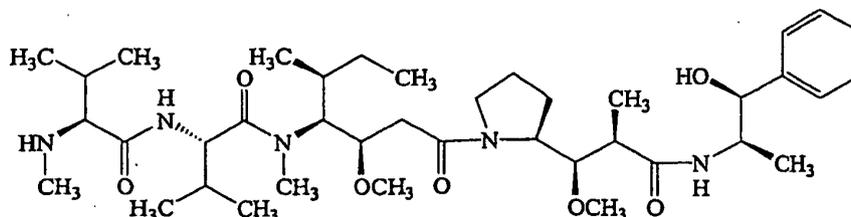
19A

El compuesto 19 (1,0 g, 1,66 mmol) se diluyó con DMF (10 ml) y a la solución resultante se le añadió bis (4-nitrofenil)carbonato (1,0 g, 3,3 mmol, 2,0 eq.).

La mezcla de reacción se trató inmediatamente con diisopropiltilamina (0,43 ml, 2,5 mmol, 1,5 eq.) y la reacción se dejó en agitación bajo atmósfera de argón. La reacción se completó en 2,5 h según la HPLC. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite de color marrón claro que se precipitó con acetato de etilo (5 ml), y luego se precipitó de nuevo con éter (100 ml). El precipitado resultante se dejó reposar durante 30 minutos y se filtró y se secó a alto vacío para proporcionar el compuesto 19a como un polvo blancuzco. Rendimiento: 1,05 g (83 %), ES-MS m/z 767,2 [M+H]⁺; UV λ_{max} 215, 256 nm.

EJEMPLO 5

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 49



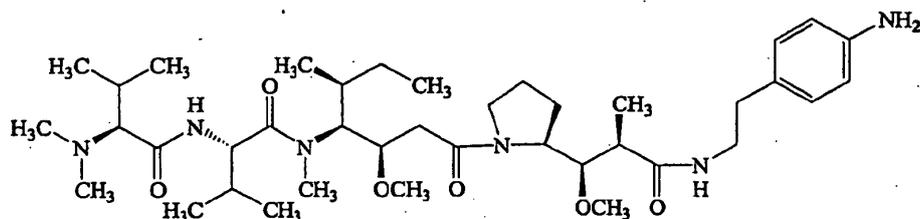
49

El compuesto 49 se hizo según el Procedimiento General D utilizando Fmoc-Me-va-va-dil-O-t-Bu 39 (0,40 g, 0,57 mmol) como el tripéptido y Boc-dap-nor 44 (0,26 g, 0,62 mmol, 1,1 eq.) como el dipéptido. La mezcla de reacción se

- 5 purificó mediante cromatografía en columna flash (columnas de gel de sílice, eluyente EtOAc al 100%). Dos productos contenían Fmoc eluido: el derivado de Fmoc del compuesto 49 (R_f 0,17 en ETOAc al 100%) y lo que se creyó que era el derivado de Fmoc del acetato de TFA del compuesto 49 (R_f 0,37). Los productos se combinaron para proporcionar una espuma blanca que fue sometida al procedimiento general E. La reacción se completó después de 2 h. Los solventes se eliminaron para proporcionar un aceite que se purificó mediante cromatografía en columna flash (eluyente - 09:01 diclorometano-metanol) para proporcionar el compuesto 49.

EJEMPLO 6

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 50



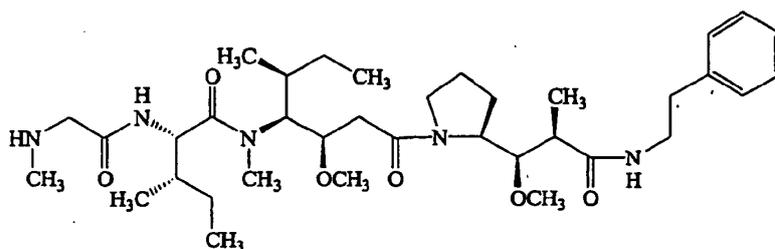
50

- 10 El compuesto 50 se preparó haciendo reaccionar el tripéptido 42 y el dipéptido 48 según el Procedimiento General D usando trietilamina (5,0 eq.) como base. Después de la concentración de la mezcla de reacción, el residuo resultante se inyectó directamente en una fase inversa preparativa en una columna HPLC (columna Varian Dynamax 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y 0,1 M de TEA/CO₂ a 20 ml/min de 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se agruparon y concentraron y el residuo resultante se diluyó con 10 ml de diclorometano-éter (1:1). La solución se enfrió a 0 °C y se añadió 1,0 M de HCl etéreo, gota a gota (aprox. 10 eq.). El precipitado, compuesto 50, se filtró y secó demostrando ser sustancialmente puro por HPLC. Rendimiento: 71 mg (43 %); ES-MS m/z 731,6 [M+H]⁺; UV λ_{max} 215, 238, 290 nm. Anal. Calc. C₄₀H₇₀N₆O₆·4H₂O 2HCl: C, 54,84; H, 9,20; N, 9,59.

Hallado: C, 55,12; H, 9,41; N, 9,82.

20 EJEMPLO 7

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 51



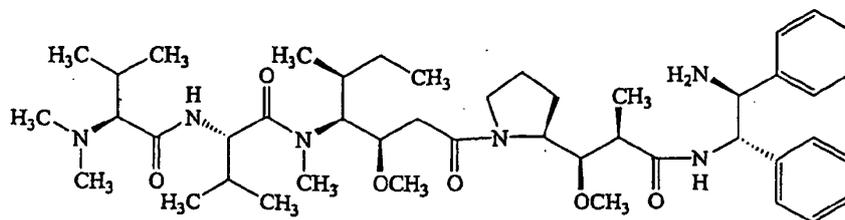
51

- 25 El compuesto 51 se preparó haciendo reaccionar el tripéptido Fmoc 41 y el dipéptido 46 según el Procedimiento General D usando trietilamina como base. Después de la concentración de la mezcla de reacción, el residuo se inyectó directamente en una columna de HPLC de fase inversa preparativa (columna Varian Dynamax 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y 0,1 M de TEA/CO₂ a 20 ml/min de 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar un producto intermedio sólido blanco que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional. ES-MS m/z 882,9 [M+NH₄]⁺, 899,9 [M+Na]⁺; UV λ_{max} 215, 256 nm.

- 30 La desprotección del producto intermedio sólido blanco se realizó según el Procedimiento General E. El producto crudo se purificó mediante HPLC preparativa (columna Varian Dynamax 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y 0,1 M de TEA/CO₂ a 20 ml/min de 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto 51 como un sólido pegajoso. ES-MS m/z 660,1 [M+H]⁺, 682,5 [M+Na]⁺; UV λ_{max} 215 nm.

EJEMPLO 8

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 52



52

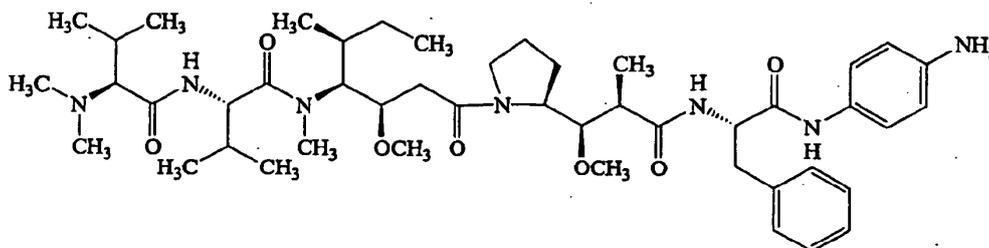
5 Se diluyó Boc-dolaproína (0,33 g, 1,14 mmol) y (1S, 2S)-(-)-1,2-difeniletlenodiamina (0,5 g, 2,28 mmol, 2,0 eq.) con diclorometano (10 ml) y a la solución resultante se le añadió trietilamina (0,32 ml, 2,28 mmol, 2,0 eq.) y luego DEPC (0,39 ml, 2,28 mmol, 2,0 eq.). Después de 4 horas, se añadió más DEPC (0,39 ml) y la reacción se dejó agitando durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se purificó mediante HPLC preparativa (columna Varian Dynamax C₁₈ 21,4 mm x 25 cm, 5 μ, 100 Å, con un gradiente de ejecución de MeCN y agua a 20 ml/min de un 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar un péptido sólido gomoso amarillo que se utilizó sin purificación adicional. R_f 0,15 (EtOAc al 100 %), ES-MS *m/z* 482,4 [M+H]⁺; UVλ_{max} 215, 256 nm.

15 El péptido intermedio gomoso amarillo (0,24 g, 0,50 mmol) se diluyó con diclorometano, y a la solución resultante se le añadió diisopropiletilamina (0,18 ml, 1,0 mmol, 2,0 eq.) y Fmoc-Cl (0,15 g, 0,55 mmol, 1,1 eq.). La reacción se dejó en agitación durante 3 horas, tras lo cual la HPLC mostró una reacción completa. La mezcla de reacción se concentró en un aceite y el aceite se diluyó con EtOAc y se extrajo posteriormente con una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La capa de EtOAc se secó, se filtró y se concentró y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna flash (gel de sílice con malla de 230-400; gradiente eluyente 4:1 hexanos-EtOAc a 1:1 hexanos-EtOAc) para proporcionar el compuesto 45 como un sólido blanco. Rendimiento: 0,37 g (46% total); R_f 0,47 (1:1 hexano-EtOAc), ES-MS *m/z* 704,5 [M+H]⁺, 721,4 [M+NH₄]⁺; UVλ_{max} 215, 256 nm.

25 El compuesto 52 se preparó haciendo reaccionar el compuesto tripéptido 42 (94 mg, 0,13 mmol) y el dipéptido 45 (65 mg, 0,13 mmol) según el Procedimiento General D (con 3,6 eq. de diisopropiletilamina como base). Después de la concentración de la mezcla de reacción, el residuo resultante se diluyó con EtOAc y se lavó posteriormente con ácido cítrico acuoso al 10%, agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó, se filtró y se concentró para proporcionar un residuo sólido blanco que se diluyó con diclorometano y se desprotegió según el Procedimiento General E. Según la HPLC, la reacción se completó después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró en un aceite. El aceite se diluyó con DMSO y la solución resultante se purificó utilizando una columna de HPLC de fase inversa preparativa (columna Varian Dynamax 21,4 mm x 25 cm, 5 μ, 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y TFA al 0,1 % a 20 ml/min de 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Se aislaron dos productos que tenían espectros UV similares. El producto principal, compuesto 52, se proporcionó como un sólido blancuzco. Rendimiento total: 24 mg (23 %); ES-MS *m/z* 793,5 [M+H]⁺; UVλ_{max} 215 nm.

EJEMPLO 9

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 53



53

35

Se añadió Boc-fenilalanina (1,0 g, 3,8 mmol) a una suspensión de 1,4-diaminobenceno-HCl (3,5 g, 19,0 mmol, 5,0 eq.) en trietilamina (10,7 ml, 76,0 mmol, 20 eq.) y diclorometano (50 ml). A la solución resultante se añadió DEPC (3,2 ml, 19,0 mmol, 5,0 eq.) mediante una jeringa. La HPLC no mostró ningún resto de Boc-Phe pasadas 24 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró para proporcionar un sólido oscuro. El residuo sólido oscuro se dividió entre 1:1 EtOAc-agua y la capa de EtOAc se lavó sucesivamente con agua y salmuera. La capa de EtOAc se secó y se concentró para proporcionar un residuo oscuro marrón/rojo que se purificó mediante HPLC (columna Varian Dynamax 41,4mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y agua a 45 ml/min de 10 % a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar un producto intermedio sólido de color rojizo. Rendimiento: 1,4 g (100%); ES-MS m/z 355,9 [M+H]⁺; UV λ_{\max} 215, 265 nm; ¹H RMN (CDCl₃) δ 7,4₈ (1 H, br s), 7,22-7,37 (5 H, m), 7,12 (2 H, d, J=8,7 Hz), 7,61 (2 H, d, J=8,7 Hz), 5,19 (1 H, br s), 4,39-4,48 (1 H, m), 3,49 (2 H, s), 3,13 (2 H, d, J=5,7 Hz), 1,43 (9 H, s).

El producto intermedio sólido de color rojizo (0,5 g, 1,41 mmol) y diisopropiletilamina (0,37 ml, 2,11 mmol, 1,5 eq.) se diluyeron con diclorometano (10 ml), y a la solución resultante se le añadió Fmoc-Cl (0,38 g, 1,41 mmol). La reacción se dejó en agitación y se formó un precipitado sólido blanco después de unos minutos. La reacción se completó según la HPLC después de 1 h. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró para proporcionar un aceite. El aceite se precipitó con EtOAc, proporcionando un producto intermedio blanco rojizo, que fue recogido por filtración y se secó al vacío. Rendimiento: 0,75 g (93 %); ES-MS m/z 578,1 [M+H]⁺, 595,6 [M+NH₄]⁺.

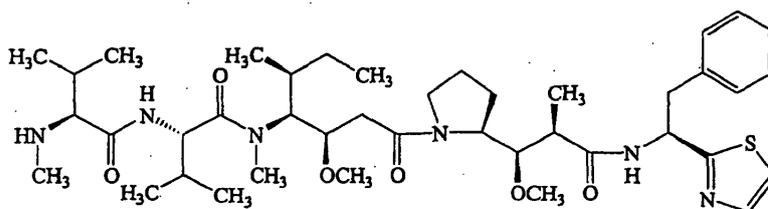
El producto intermedio blanco rojizo (0,49 g, 0,85 mmol) se diluyó con 10 ml de diclorometano, y después se trató con 5 ml de ácido trifluoroacético. La reacción se completó en 30 minutos según la HPLC de fase inversa. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se precipitó con éter para proporcionar un sólido blancuzco. El sólido blancuzco se filtró y secó para proporcionar un polvo amorfo, que se añadió a una solución de Boc-DAP (0,24 g, 0,85 mmol) en diclorometano (10 ml). A esta solución se le añadió trietilamina (0,36 ml, 2,5 mmol, 3,0 eq.) y PyBrop (0,59 g, 1,3 mmol, 1,5 eq.). La mezcla de reacción se controló utilizando HPLC de fase inversa. Una vez completada, la mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se diluyó con EtOAc, y se lavó posteriormente con ácido cítrico acuoso al 10%, agua, bicarbonato sódico acuoso saturado, agua y salmuera. La capa de EtOAc se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía de columna flash (gel de sílice) para proporcionar el compuesto **47** como un polvo blanco. Rendimiento: 0,57 g (88 %); ES-MS m/z 764,7 [M+NH₄]⁺; UV λ_{\max} 215, 265 nm; ¹H RMN (DMSO-d₆) δ 10,0-10,15 (1 H, m), 9,63 (1 H, br s), 8,42 (1/2 H, d, J=8,4 Hz), 8,22 (1/2 H, d, J=8,4 Hz), 7,89 (2 H, d, J=7,2 Hz), 7,73 (2H, d, J=7,6 Hz), 7,11-7,55 (13 H, m), 4,69-4,75 (1H, m), 4,46 (2 H, d, J=6,8 Hz), 4,29 (1H, t, J=6,4 Hz), 3,29 (3 H, s), 2,77-3,47 (7 H, m), 2,48-2,50 (3 H, m), 2,25 (2/3 H, dd, J=9,6, 7,2 Hz), 1,41-1,96 (4 H, m), 1,36 (9 H, s), 1,07 (1 H, d, J=6,4 Hz, isómero rotatorio), 1,00 (1 H, d, J=6,4 Hz, isómero rotatorio).

El compuesto tripéptido **42** (55 mg, 0,11 mmol) y el compuesto dipéptido **47** (85 mg, 0,11 mmol) se hicieron reaccionar según el Procedimiento General D (utilizando 3,0 eq. de diisopropiletilamina). Después de la concentración de la mezcla de reacción, el residuo resultante se diluyó con EtOAc y se lavó posteriormente con ácido cítrico acuoso al 10%, agua, bicarbonato sódico acuoso saturado y salmuera. La capa de EtOAc se secó, se filtró y se concentró para proporcionar un aceite de color amarillo.

El aceite de color amarillo se diluyó con diclorometano (10 ml) y se desprotegió según el Procedimiento General E. Según la HPLC, la reacción se completó después de 2 h. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite. El aceite se diluyó con DMSO y el DMSO se purificó utilizando una columna de HPLC de fase inversa preparativa (columna Varian Dynamax 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y TFA al 0,1 % a 20 ml/min de 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto **53** como un sólido blancuzco. Rendimiento total: 42 mg (44% total); ES-MS m/z 837,8 [M+H]⁺, 858,5 [M+Na]⁺; UV λ_{\max} 215, 248 nm.

EJEMPLO 10

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 54

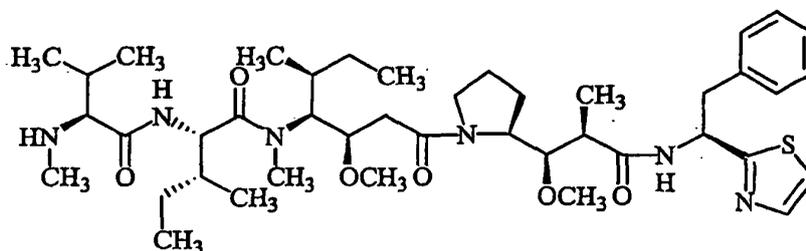


54

El compuesto 54 se preparó según Miyazaki K., et al. *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43(10), 1706-18.

EJEMPLO 11

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 55

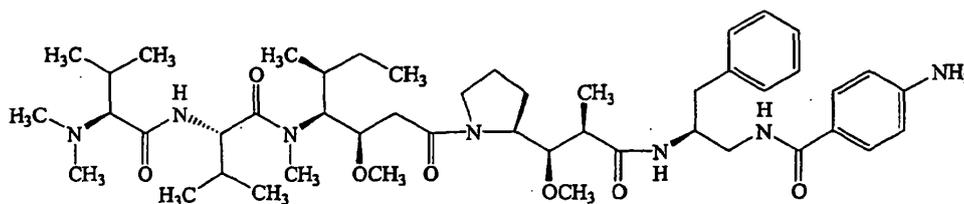


55

- 5 El compuesto 55 se sintetizó de la misma manera que el compuesto 54, pero sustituyendo FmocMeVal-Ile-Dil-tBu (40) por FmocMeVal-Val-Dil-tBu (39) como material de partida.

EJEMPLO 12

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 56



56

- 10 Se diluyó éster [(1S)-1-(azidometil)-2-fenil]-1,1-dimetiletilílico del ácido carbámico (0,56 g, 2 mmol, preparado como se describe en *J. Chem. Research* (S), 1992, 391), se diluyó con una solución de 4 M de HCl en dioxano (10 ml) y la solución resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Entonces se añadió tolueno (10 ml) a la reacción, la mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se secó al vacío azeotrópicamente utilizando tolueno (3 x 15 ml), para proporcionar un producto intermedio sólido blanco. ES-MS m/z 177,1 [M+H]⁺.
- 15 El producto intermedio sólido blanco se diluyó con diclorometano (5 ml) y a la solución resultante se le añadió posteriormente N-Boc-Dolaproína (0,58 g, 1 eq.), trietilamina (780 μ l, 3 eq.) y DEPC (406 μ l, 1,2 eq.), y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se controló utilizando HPLC de fase inversa. Al término de la reacción según lo determinado por HPLC, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (30 ml), la capa de diclorometano se lavó posteriormente con ácido cítrico acuoso al 10% (20 ml), NaHCO₃ acuoso saturado (20 ml) y agua (20 ml). La capa de diclorometano se concentró y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna flash utilizando un gradiente de metanol de 0-5% en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar un producto intermedio sólido 0,78 g (88 %). ES-MS m/z 446,1 [M+H]⁺, 468,3 [M+Na]⁺.
- 20
- 25 El producto intermedio sólido (450 mg, 1 mmol) y el tripéptido 42 (534 mg, 1,1 eq.) se diluyeron con una solución al 50% de TFA en diclorometano. (10 ml), y la reacción resultante se dejó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió tolueno (10 ml) a la reacción y la mezcla de reacción se concentró. La amina intermedia resultante se secó azeotrópicamente utilizando tolueno (3 x 20 ml) y se secó al vacío durante la noche.
- 30 La amina intermedia resultante se diluyó con diclorometano (2 ml) y a la solución resultante se le añadió trietilamina (557 μ l, 4 eq.), Seguido de DEPC (203 μ l, 1,4 eq.). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 4 h a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se controló por HPLC. Al término de la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (30 ml) y la capa de diclorometano se lavó posteriormente utilizando NaHCO₃ acuoso saturado (20 ml) y NaCl acuoso saturado (20 ml). La capa de diclorometano se concentró y el residuo resultante se purificó utilizando cromatografía en columna flash en un gradiente de metanol de 0-5% en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron y el residuo resultante se secó utilizando

un diclorometano:hexano (1:1) para proporcionar un producto intermedio sólido blanco, 0,64 g (84 %). ES-MS m/z 757,5 $[M+H]^+$.

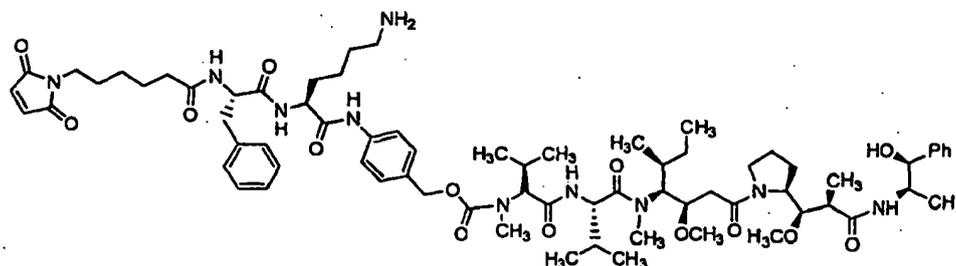
El producto intermedio sólido blanco (536 mg, 0,73 mmol) se diluyó con metanol y a la solución resultante se le añadió Pd/C al 10% (100 mg). La reacción se colocó en una atmósfera de hidrógeno y se dejó en agitación a presión atmosférica y a temperatura ambiente durante 2 h. El progreso de la reacción se siguió por HPLC y se completó en 2 h. El frasco de reacción se purgó con argón y la mezcla de reacción se filtró a través de una capa de celita. La almohadilla de celita se lavó posteriormente con metanol (30 ml) y los filtrados combinados se concentraron para producir un producto intermedio sólido gris que se utilizó sin purificación adicional. Rendimiento = 490 mg (91 %). ES-MS m/z 731,6 $[M+H]^+$, 366,6 $[M+2H]^{2+}/2$.

Se diluyó el producto intermedio sólido gris (100 mg, 1,136 mmol), ácido N-Boc-aminobenzóico (39 mg, 1,2 eq.) y trietilamina (90 μ l, 4 eq.) con diclorometano (10 ml), y a la solución resultante se le añadió DEPC (28 μ g, 1,2 eq.). La mezcla de reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 2 h, a continuación, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (30 ml). La capa de diclorometano se lavó posteriormente con NaHCO₃ acuoso saturado (20 ml) y NaCl acuoso saturado (20 ml). La capa de diclorometano se concentró y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna flash utilizando un gradiente de 0-5% en diclorometano. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron y el residuo resultante se secó utilizando diclorometano:hexano (1:1) para proporcionar un producto intermedio sólido blanco. ES-MS m/z 950,7 $[M+H]^+$.

El producto intermedio sólido blanco se diluyó con una solución al 50% de TFA en diclorometano y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadió tolueno (10 ml) a la reacción y la mezcla de reacción se concentró. El residuo resultante se secó azeotrópicamente utilizando tolueno (3 x 15 ml), para proporcionar un aceite amarillo que se purificó mediante HPLC preparativa (columna Varian Dynamax C₁₈-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN 10 a 95% en 0,05 M de tampón carbonato de trietilamonio, pH 7,0, en 30 minutos a un caudal de 10 ml/min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron y el residuo resultante se secó utilizando MeCN (3 x 20 ml) para proporcionar el compuesto **56** como un sólido blanco: 101 mg (87 % en 2 pasos). ES-MS m/z 850,6 $[M+H]^+$, 872,6 $[M+Na]^+$.

EJEMPLO 13

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 57



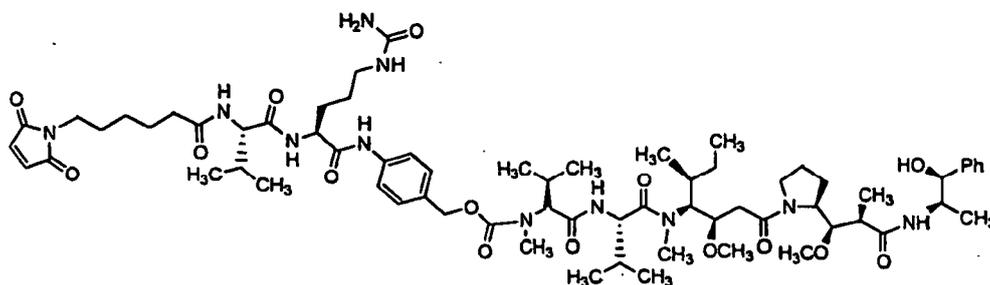
57

El compuesto 49 (100 mg, 0,14 mmol), el compuesto 27 (160 mg, 0,15 mmol, 1,1 eq.) y HOBt (19 mg, 0,14 mmol, 1,0 eq.) se diluyeron con DMF (2 ml). Después de 2 minutos se añadió piridina (0,5 ml) y la mezcla de reacción se controló utilizando HPLC de fase inversa. Ni el compuesto 49 ni el compuesto 27 se detectó después de 24 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se purificó utilizando HPLC de fase inversa preparativa (columna Varian Dynamax de 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y Et₃N-CO₂ (pH 7) a 20 ml/min de 10% a 100% más de 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min.). Las fracciones relevantes se agruparon y se concentraron para proporcionar un producto intermedio sólido blancuzco. ES-MS m/z 1608,7 $[M+H]^+$.

El producto intermedio sólido blancuzco se diluyó con MeCN/agua/TFA en una relación de 85:5:10, respectivamente. La mezcla de reacción fue controlada por HPLC y se completó en 3 h. La mezcla de reacción se concentró directamente y el residuo resultante se purificó utilizando una columna de HPLC de fase inversa preparativa (columna Varian Dynamax 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y TFA al 0,1 % a 20 ml/min de 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto **57** como un polvo blancuzco. Rendimiento: 46 mg (32 % total), ES-MS m/z 1334,8 $[M+H]^+$; UV λ_{max} 215, 256 nm.

EJEMPLO 14

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 58

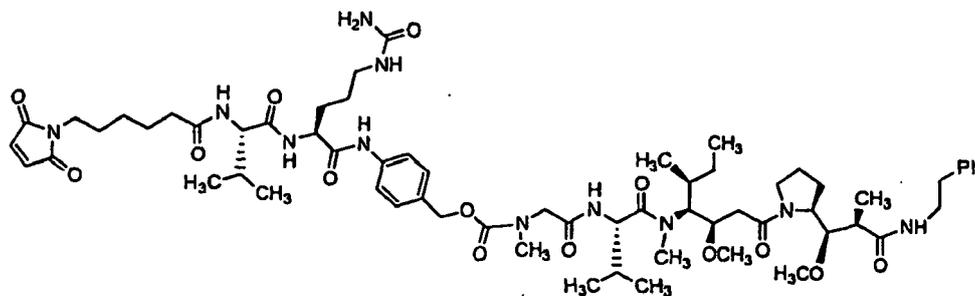


58

El compuesto 49 (1,69 mg, 2,35 mmol), el compuesto 21 (2,6 g, 3,52 mmol, 1,5 eq.) y HOBt (64 mg, 0,45 mmol, 0,2 eq.) se diluyeron con DMF (25 ml). Después de 2 minutos se añadió piridina (5 ml) y la reacción se controló utilizando HPLC de fase inversa. La reacción demostró completarse en 24 h. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite oscuro, que se diluyó con 3 ml de DMF. La solución de DMF se purificó mediante cromatografía en columna flash (gel de sílice, gradiente eluyente: 100% de diclorometano para 4:1 de diclorometano-metanol). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar un aceite que se solidificó a alto vacío para proporcionar una mezcla del compuesto 58, y que no reaccionó con el compuesto 49, como un sólido de color amarillo sucio (R_f 0,40 en 9:1 de diclorometano-metanol). El sólido amarillo sucio se diluyó con DMF y se purificó utilizando HPLC de fase inversa preparativa (columna Varian Dynamax C₁₈ de 41,4 mm x 25 cm, 8 m, 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y TFA acuoso al 0,1 % a 45 ml/min del 10% al 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100 % durante 20 minutos) para proporcionar el compuesto 58 como un polvo blanco amorfo (R_f 0,40 en 9:1 de diclorometano-metanol), que tuvo una pureza > 95 % por HPLC y que contenía menos del 1% del compuesto 49. Rendimiento: 1,78 g (57 %); ES-MS m/z 1316,7 $[M+H]^+$; UV λ_{max} 215, 248 nm.

EJEMPLO 15

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 59

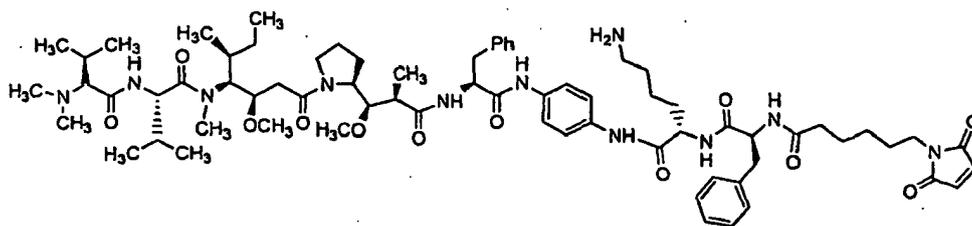


59

La sal clorhidrato del compuesto 51 (11 mg, 15,2 mmol) y el compuesto 21 (11 mg, 15,2 mmol) se diluyeron con 1-metil-2-pirolidiona (1 ml) y a la solución resultante se le añadió diisopropiletilamina (5,3 ml, 30,3 mmol, 2.0 eq.). La mezcla se dejó en agitación bajo atmósfera de argón durante 3 días mientras se controlaba utilizando HPLC. Después de este tiempo, aún quedaba mucho material de partida sin reaccionar, se añadió HOBt (1,0 eq.) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 24 h, después de lo cual no quedó ningún material de partida según la HPLC. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se purificó mediante HPLC preparativa (columna Varian Dynamax C₁₈ de 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, con un gradiente de ejecución de MeCN y agua a 20 ml/min de un 10% a 100% durante 30 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto 59 como un sólido blanco. Rendimiento: 13 mg (67 %); ES-MS m/z 1287,2 $[M+H]^+$, 1304,3 $[M+NH_4]^+$; UV λ_{max} 215, 248 nm.

EJEMPLO 16

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 60



60

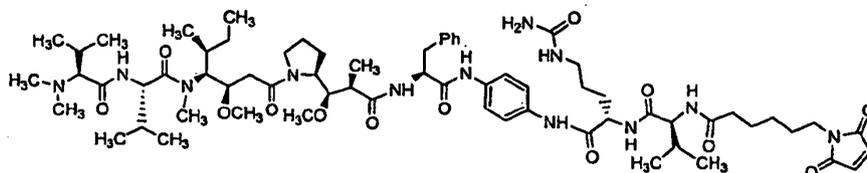
El compuesto 53 (9 mg, 10,8 μmol) y el compuesto 28 (5,2 mg, 10,8 μmol) se diluyó con diclorometano (1 ml) y a la solución resultante se le añadió HATU (6,3 mg, 16,1 μmol , 1,5 eq.), seguido de piridina (1,3 μl , 16,1 μmol , 1,5 eq.). La mezcla de reacción se dejó en agitación bajo atmósfera de argón, mientras se controlaba utilizando HPLC. La reacción se completó después de 6 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se diluyó con DMSO. La solución de DMSO se purificó utilizando HPLC de fase inversa preparativa (columna Varian Dynamax de 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y TFA al 0,1% a 20 ml/min de 10% a 100% durante 40 min seguido de MeCN al 100% durante 20 min) y las fracciones relevantes se combinaron y concentraron para proporcionar un producto intermedio sólido blancuzco que tuvo una pureza > 95% según la HPLC.

El producto intermedio sólido blancuzco se diluyó con diclorometano (2 ml) y la solución resultante se trató con TFA (0,5 ml). La reacción se controló por HPLC, y se completó en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se diluyó con DMSO y se purificó en las mismas condiciones que las descritas en el Ejemplo 13. Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto 60 como un polvo blancuzco.

Rendimiento: 14,9 mg (90 %); ES-MS m/z 1304,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$; $\text{UV}\lambda_{\text{max}}$ 215, 275 nm.

EJEMPLO 17

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 61



61

La sal trifluoroacetato del compuesto 53 (0,37 g, 0,39 mmol, 1,0 eq.) y el compuesto 18 (0,30 g, 0,58 mmol, 1,5 eq.) se diluyeron con DMF (5 ml, 0,1 M), y a la solución resultante se le añadió piridina (95 μl , 1,2 mmol, 3,0 eq.). HATU (0,23 g, 0,58 mmol, 1,5 eq.) se añadió entonces como un sólido y la mezcla de reacción se dejó en agitación bajo atmósfera de argón, mientras que se controlaba utilizando HPLC. La reacción progresó lentamente y 4 horas más tarde se añadió 1,0 eq. de diisopropiletilamina. La reacción se completó en 1 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo resultante se purificó mediante HPLC preparativa (columna Varian Dynamax C_{18} de 41,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y TFA acuoso al 0,1 % a 45 ml/min de 10% a 100% durante 20 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min) para proporcionar un producto intermedio sólido rosa claro.

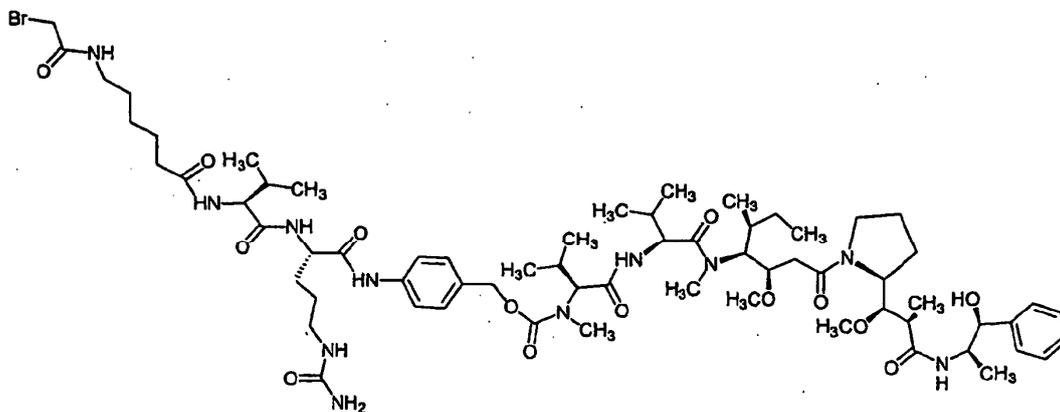
El producto intermedio sólido rosa se diluyó con DMF (30 ml) y a la solución resultante se le añadió dietilamina (15 ml). La reacción se completó por HPLC en 2 h. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se lavó dos veces con éter. El producto intermedio sólido se secó a alto vacío y luego se usó directamente en el siguiente paso.

El producto intermedio sólido se diluyó con DMF (20 ml) y a la solución resultante se le añadió MC-OSu (0,12 g, 0,39 mmol, 1,0 eq.). Después de 4 d., la mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite que se purificó mediante HPLC preparativa (columna Varian Dynamax C_{18} de 41,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, con un gradiente de ejecución de MeCN y TFA acuoso al 0,1 % a 45 ml/min de 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al

100% durante 20 min). El compuesto 61 se aisló como un sólido escamoso blanco. Rendimiento: 0,21 g (38 % total); ES-MS m/z 1285,9 $[M+H]^+$, 13.07.8 $[M+Na]^+$; $UV\lambda_{max}$ 215, 266 nm.

EJEMPLO 18

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 62



62

5

Se diluyó Fmoc-Val-cit-PAB-OCO-Pnp (19a) (0,65 g, 0,85 mmol, 1,1 eq.), el compuesto 49 (0,55 g, 0,77 mmol, 1,0 eq.) y HOBt (21 mg, 0,15 mmol, 2,0 eq.) con DMF (2,0 ml) y se disolvieron utilizando sonicación. A la solución resultante se añadió piridina (0,5 ml) y la reacción se controló utilizando HPLC. Después de 24 h, se añadió diisopropiletilamina (1,0 eq.) y la reacción se dejó en reposo, sin agitación durante 24 h. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un residuo de aceite. El residuo de aceite se purificó utilizando HPLC de fase inversa preparativa (columna Varian Dynamax 41,4 mm x 25 cm, 5 μ , 100 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y TFA al 0,1 % a 45 ml/min de 10% a 100% durante 40 min seguido de MeCN al 100% durante 20 min.) Las fracciones deseadas se agruparon y se concentraron para dar un aceite que se precipitó con éter para proporcionar un producto intermedio sólido blancuzco. Rendimiento: 0,77 g (74 %), ES-MS m/z 1345,7 $[M+H]^+$; $UV\lambda_{max}$ 215, 254 nm.

10

15

El producto intermedio sólido blancuzco (aproximadamente 85 mg) se desprotegió con dietilamina (1 ml) en DMF (3 ml). Después de 1 h, la reacción se completó. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se precipitó en 1 ml de EtOAc seguido por la adición de éter abundante (aproximadamente 20 ml). La amina intermedia se filtró y se secó a alto vacío y se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

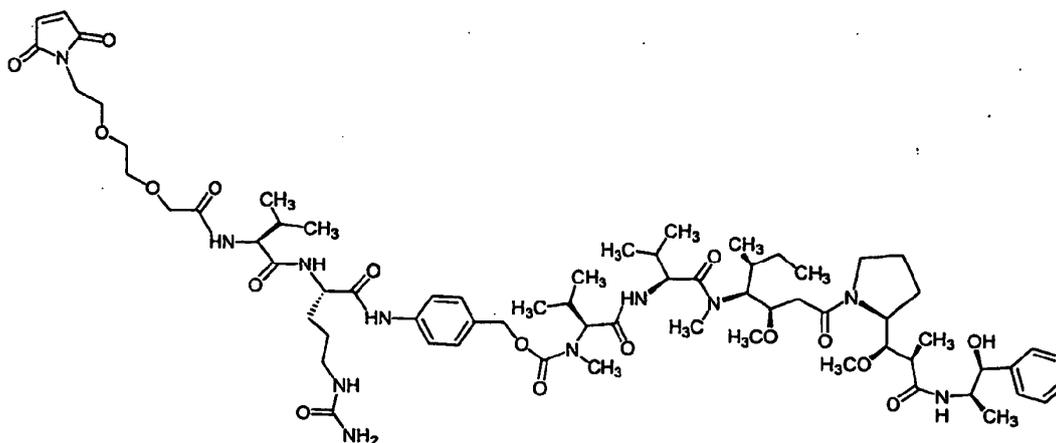
20

25

La amina intermedia (70 mg, 61 μ mol, 1,0 eq.) se recogió en DMF (10 ml), y a la solución resultante se le añadió posteriormente ácido bromoacetamidocaprílico (17 mg, 67 μ mol, 1,1 eq.), PyBrop (32 mg, 67 μ mol, 1,1 eq.) y diisopropiletilamina (16 μ l, 92 μ mol, 1,5 eq.). Después de 24 h, se añadió 1,0 eq. adicional de ácido bromoacetamidocaprílico. La reacción se paró después de 30 h. La mezcla de reacción se concentró en un aceite que se purificó utilizando HPLC preparativa de fase inversa (columna Synergi MaxRP C₁₂ de 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 80 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y TFA acuoso al 0,1 % a 20 ml/min de 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto 62 como un sólido blanco. Rendimiento: 23 mg (27 %), ES-MS m/z 1356,7 $[M+H]^+$; $UV\lambda_{max}$ 215, 247 nm.

EJEMPLO 19

30 PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 63



63

Se sometió Fmoc-Val-cit-PAB-OC(O)-Me-val-val-dil-dap-nor (aproximadamente 48 mg, obtenido según el Ejemplo 18) a eliminación de Fmoc mediante el tratamiento con dietilamina (1 ml) en DMF (3 ml). Después de 1 h, la reacción se completó. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se precipitó utilizando 1 ml de EtOAc seguido por la adición de éter abundante (aproximadamente 20 ml). La amina intermedia se filtró y se secó a alto vacío y se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

La amina intermedia (35 μmol , 1,1 eq.) se diluyó con DMF (2 ml), y a la solución resultante se le añadió posteriormente maleimido-ácido PEG (Frisch, B.; Boeckler, C.; Schuber, F. *Bioconjugate Chem.* 1996, 7, 180-6; 7,8 mg, 32 μmol , 1,0 eq), DEPC (10,7 μl , 64 μmol , 2,0 eq), y diisopropiletilamina (11,3 μl , 64 μmol , 2,0 eq.). La reacción se completó en 15 min según la HPLC. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un aceite. El aceite se diluyó con 1 ml de DMSO y se purificó utilizando HPLC de fase inversa preparativa (columna Synergi MaxRP C₁₂ de 21,4 mm x 25 cm, 5 μ , 80 Å, utilizando un gradiente de ejecución de MeCN y TFA al 0,1% a 20 ml/min de 10% a 100% durante 40 minutos seguido de MeCN al 100% durante 20 min). Las fracciones relevantes se combinaron y se concentraron para proporcionar el compuesto 63 como un sólido blanco.

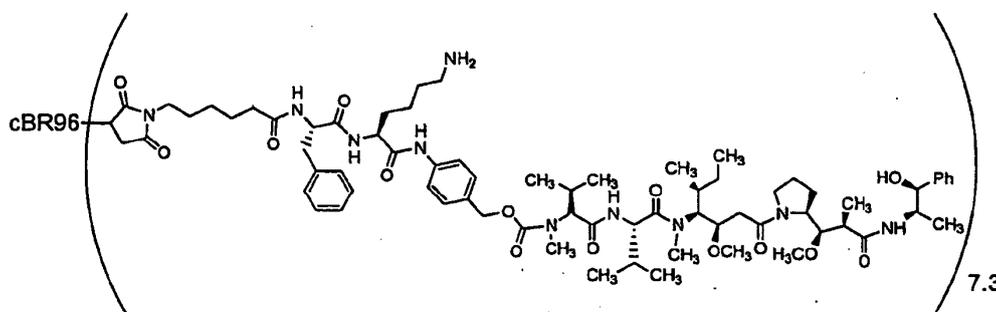
Rendimiento: 16,2 mg (34 %), ES-MS m/z 1348,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$; UV λ_{max} 215, 247 nm.

Los ejemplos 20-25 describen la conjugación de los anticuerpos monoclonales cBR96 y cAC10 para un compuesto de fármaco-enlazador. Estos anticuerpos se obtuvieron como se describe en Bowen, et al., *J. Immunol.* 1993, 151, 5896, y Trail, et al, *Science* 1993, 261, 212, respectivamente.

El número de fracciones de fármaco-enlazador por ligando en un conjugado de fármaco-enlazador-ligando varía de reacción de conjugación a reacción de conjugación, pero por lo general oscila aproximadamente de 7 a 9, en particular cuando el ligando es cBR96 o cAC10.

EJEMPLO 20

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 64



64

El anticuerpo cBR96 (24 mg) se redujo utilizando DTT como se describe en el Procedimiento General L, entonces se determinaron el número de tioles por anticuerpo y la concentración de anticuerpo como se describe en el Procedimiento General M y en el Procedimiento General N, respectivamente.

5 Resultados: [Ab] = 4,7 mg/ml = 29,4 μ M; [tiol] = 265 μ M, SH/Ab = 9,0 (el rango típico de SH/Ab es de aproximadamente 7,8 a 9,5.).

Conjugación:

10 Se añadió una solución de PBS/DTPA (2,2 ml), como se definió anteriormente en esta memoria, a 4,2 ml de anticuerpo reducido y la solución resultante se enfrió a 0 °C utilizando un baño de hielo. En un frasco separado se diluyó una solución madre de 130,5 ml del compuesto 57 (8,4 mM en DMSO, 8,5 mol de compuesto 57 por mol de anticuerpo reducido) con MeCN (1,48 ml, previamente enfriado a 0 °C en un baño de hielo). La solución de MeCN del compuesto 57 se añadió rápidamente a la solución de anticuerpo y la mezcla de reacción se agitó con un aparato de vórtice durante 5-10 seg., se devolvió al baño de hielo y se agitó a 0 °C durante 1 h., tras lo cual se añadió 218 μ l de una solución de cisteína (100 mM en PBS/ DTPA), para detener la reacción. Se reservaron 60 μ l de la mezcla de reacción extinguida como una muestra "qrm".

15 Mientras la reacción procedía, se colocaron tres columnas PD10 (Sephadex G25, ofrecida por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en un espacio frío y se equilibró con PBS (que había sido previamente enfriado a 0 °C utilizando un baño de hielo).

20 La mezcla de reacción extinguida, que contenía el compuesto 64, se concentró a \leq 3 ml por ultracentrifugación utilizando dos dispositivos de filtración con centrifuga Ultrafree 4 (membrana de separación de 30K de peso molecular, Millipore Corp., Bedford, MA; utilizada según las instrucciones del fabricante), que se enfriaron previamente a 4 °C en un refrigerador y la mezcla de reacción concentrada se eluyó a través de las tres columnas PD10 previamente enfriadas utilizando PBS como eluyente (1 ml por cada columna). El conjugado eluido se recogió en un volumen de 1,4 ml por columna, para un volumen total de 4,2 ml de eluido. La solución del conjugado eluido se filtró utilizando un filtro final con jeringa de 0,2 micras, se apartaron 250 μ l de solución de conjugado para su análisis, y el resto de la solución del conjugado fue congelada en viales estériles.

Se determinaron la concentración del compuesto 64, el número de moléculas de fármaco por anticuerpo, la cantidad de fármaco-enlazador extinguida y el porcentaje de agregados utilizando los Procedimientos Generales P, N, O y Q, respectivamente.

Resultados del ensayo:

30 [Compuesto 64] = 3,8 mg/mlg

% Agregado= traza

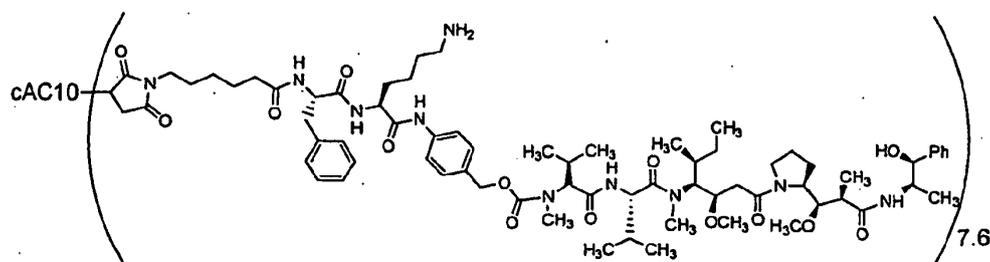
Titulación de tiol residual: Tioles residuales = 1,7/Ab Fármaco/Ab \sim 9,0 - 1,7 = 7,3

Fármaco-enlazador extinguido: indetectable

Rendimiento: 4,2 ml, 16 mg, 66 %.

35 EJEMPLO 21

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 65



65

El anticuerpo cAC10 (24 mg) se redujo utilizando DTT como se describe en el Procedimiento General L, entonces se determinaron el número de tioles por anticuerpo y la concentración de anticuerpo como se describe en el Procedimiento General M y en el Procedimiento General N, respectivamente.

Resultados: [Ab] = 4,9 mg/ml = 30,7 mM;

5 [Tio] = 283 μ M, 9,2 SH/Ab

Conjugación:

10 Una solución de PBS/DTPA (2,2 ml) como se definió anteriormente en esta memoria, se añadió a 4,2 ml de anticuerpo reducido y la solución resultante se enfrió a 0 °C utilizando un baño de hielo. En un frasco separado se diluyó una solución madre de 125 μ l del compuesto 57 (8,4mM en DMSO, 8,5 mol de compuesto 57 por mol de anticuerpo reducido) con MeCN (1,48 ml, previamente enfriado a 0 °C en un baño de hielo). La solución de MeCN del compuesto 57 se añadió rápidamente a la solución de anticuerpo y la mezcla de reacción se agitó con un aparato de vórtice durante 5-10 seg., luego se devolvió al baño de hielo y se agitó a 0 °C durante 1 hora, tras lo cual se añadió 218 μ l de una solución de cisteína (100 mM en PBS/ DTPA), para detener la reacción. Se reservaron 60 μ l de la mezcla de reacción extinguida como una muestra "qrm".

15 Mientras la reacción procedía, se colocaron cuatro columnas PD10 (Sephadex G25, ofrecida por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en un espacio frío y se equilibraron con PBS (que había sido previamente enfriado a 0 °C utilizando un baño de hielo).

20 La mezcla de reacción extinguida, que contenía el compuesto 65, se concentró a \leq 3 ml por ultracentrifugación utilizando dos dispositivos de filtración con centrifuga Ultrafree 4 (membrana de separación de 30K de peso molecular, Millipore Corp., Bedford, MA; utilizada según las instrucciones del fabricante), que se enfriaron previamente a 4 °C en un refrigerador y la mezcla de reacción concentrada se eluyó a través de las tres columnas PD10 previamente enfriadas utilizando PBS como eluyente (1 ml por cada columna). El conjugado eluido se recogió en un volumen de 1,4 ml por columna, para un volumen total de 5,6 ml de eluido. La solución del conjugado eluido se filtró utilizando un filtro final con jeringa de 0,2 micras, se apartaron 250 μ l de solución de conjugado para su análisis, y el resto de la solución del conjugado fue congelada en viales estériles.

Se determinaron la concentración del compuesto 65, el número de moléculas de fármaco por anticuerpo, la cantidad de fármaco-enlazador extinguida y el porcentaje de agregados utilizando los Procedimientos Generales P, N, O y Q, respectivamente.

Resultados del ensayo:

30 [Compuesto 65] = 2,8 mg/ml

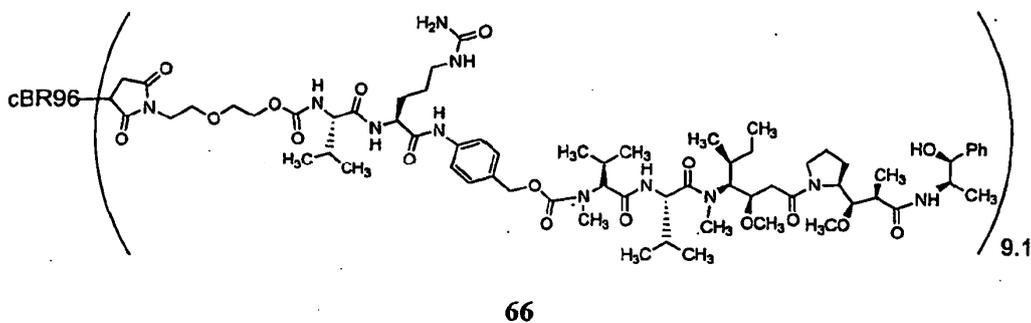
% Agregado= traza

Titulación de tioles residuales: Tioles residuales = 1,6/Ab. Fármaco/Ab \sim 9,2 - 1,6 = 7,6

Fármaco-enlazador no unido covalentemente: Rendimiento indetectable: 5,6 ml, 15,7 mg, 65 %.

EJEMPLO 22

35 PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 66



Se redujo el anticuerpo cBR96 (24 mg) utilizando DTT como se describe en el Procedimiento General L, entonces se determinaron el número de tioles por anticuerpo y la concentración de anticuerpo como se describe en el Procedimiento General M y en el Procedimiento General N, respectivamente.

Resultados: [Ab] = 3,7 mg/ml = 23,1 μ M; [tiol] = 218 μ M; 9,4 SH/Ab.

Conjugación:

Una solución de PBS/DTPA (2,2 ml) como se definió anteriormente en esta memoria, se añadió a 4,2 ml de anticuerpo reducido y la solución resultante se enfrió a 0 °C utilizando un baño de hielo. En un frasco separado se diluyó una solución madre de 145,5 μ l del compuesto 58 (8,3 mM en DMSO, 9,0 mol de compuesto 58 por mol de anticuerpo reducido) con MeCN (1,48 ml, previamente enfriado a 0 °C en un baño de hielo). La solución de MeCN del compuesto 58 se añadió rápidamente a la solución de anticuerpo y la mezcla de reacción se agitó con un aparato de vórtice durante 5-10 seg., entonces se devolvió al baño de hielo y se agitó a 0 °C durante 1 hora, tras lo cual se añadió 249 μ l de una solución de cisteína (100 mM en PBS/DTPA), para detener la reacción. Se reservaron 60 μ l de la mezcla de reacción extinguida como una muestra "qrm".

Mientras la reacción procedía, se colocaron tres columnas PD10 (Sephadex G25, ofrecida por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en un espacio frío y se equilibraron con PBS (que había sido previamente enfriado a 0 °C utilizando un baño de hielo).

La mezcla de reacción extinguida, que contenía el compuesto 66, se concentró a \leq 3 ml por ultracentrifugación utilizando dos dispositivos de filtración con centrifuga Ultrafree 4 (membrana de separación de 30K de peso molecular, Millipore Corp., Bedford, MA; utilizada según las instrucciones del fabricante), que se enfriaron previamente a 4 °C en un refrigerador y la mezcla de reacción concentrada se eluyó a través de las tres columnas PD10 previamente enfriadas utilizando PBS como eluyente (1 ml por cada columna). El conjugado eluido se recogió en un volumen de 1,4 ml por columna, para un volumen total de 4,2 ml de eluido. La solución del conjugado eluido se filtró utilizando un filtro final con jeringa de 0,2 micras, se apartaron 250 μ l de solución de conjugado para su análisis, y el resto de la solución del conjugado fue congelada en viales estériles.

Se determinaron la concentración del compuesto 66, el número de moléculas de fármaco por anticuerpo, la cantidad de fármaco-enlazador extinguida y el porcentaje de agregados utilizando los Procedimientos Generales P, N, O y Q, respectivamente.

Resultados del ensayo:

[Compuesto 66] = 3,0 mg/ml

% Agregado= traza

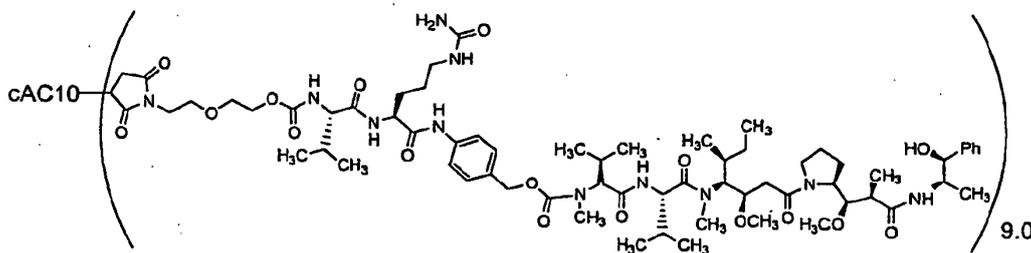
Titulación de tioles residuales: Tioles residuales = 0,4/Ab. Fármaco/Ab \sim 9,5 - 0,4 = 9,1

Fármaco-enlazador no unido covalentemente: 0,3% de aducto de 57-cys

Rendimiento: 5,3 ml, 15,9 mg, 66 %.

EJEMPLO 23

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 67



67

El anticuerpo cAC10 (24 mg) se redujo utilizando DTT como se describe en el Procedimiento General L, entonces se determinaron el número de tioles por anticuerpo y la concentración de anticuerpo como se describe en el Procedimiento General M y en el Procedimiento General N, respectivamente.

Resultados: [Ab] = 3,9 mg/ml = 24,5 μ M; [tiol] = 227 μ M; 9,3 SH/Ab

Conjugación:

Una solución de PBS/DTPA (2,2 ml) como se definió anteriormente en esta memoria, se añadió a 4,2 ml de anticuerpo reducido y la solución resultante se enfrió a 0 °C utilizando un baño de hielo. En un frasco separado se diluyó una solución madre de 154,4 µl del compuesto 58 (8,3 mM en DMSO, 9,0 mol de compuesto 58 por mol de anticuerpo reducido) con MeCN (1,46 ml, previamente enfriado a 0 °C en un baño de hielo). La solución de MeCN del compuesto 58 se añadió rápidamente a la solución de anticuerpo y la mezcla de reacción se agitó con un aparato de vórtice durante 5-10 seg., entonces se devolvió al baño de hielo y se agitó a 0 °C durante 1 hora, tras lo cual se añadió 249 µl de una solución de cisteína (100 mM en PBS/ DTPA), para detener la reacción. Se reservaron 60 µl de la mezcla de reacción extinguida como una muestra "qrm".

Mientras la reacción procedía, se colocaron cuatro columnas PD10 (Sephadex G25, ofrecida por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en un espacio frío y se equilibraron con PBS (que había sido previamente enfriado a 0 °C utilizando un baño de hielo).

La mezcla de reacción extinguida, que contenía el compuesto 67, se concentró a ≤ 3 ml por ultracentrifugación utilizando dos dispositivos de filtración con centrífuga Ultrafree 4 (membrana de separación de 30K de peso molecular, Millipore Corp.; Bedford, MA; utilizada según las instrucciones del fabricante), que se enfriaron previamente a 4 °C en un refrigerador y la mezcla de reacción concentrada se eluyó a través de las tres columnas PD10 previamente enfriadas utilizando PBS como eluyente (1 ml por cada columna). El conjugado eluido se recogió en un volumen de 1,4 ml por columna, para un volumen total de 5,6 ml de eluido. La solución del conjugado eluido se filtró utilizando un filtro final con jeringa de 0,2 micras, se apartaron 250 µl de solución de conjugado para su análisis, y el resto de la solución del conjugado fue congelada en viales estériles.

Se determinaron la concentración del compuesto 67, el número de moléculas de fármaco por anticuerpo, la cantidad de fármaco-enlazador extinguida y el porcentaje de agregados utilizando los Procedimientos Generales P, N, O y Q, respectivamente.

Resultados del ensayo:

[Compuesto 67] = 3,0 mg/ml

% Agregado= traza

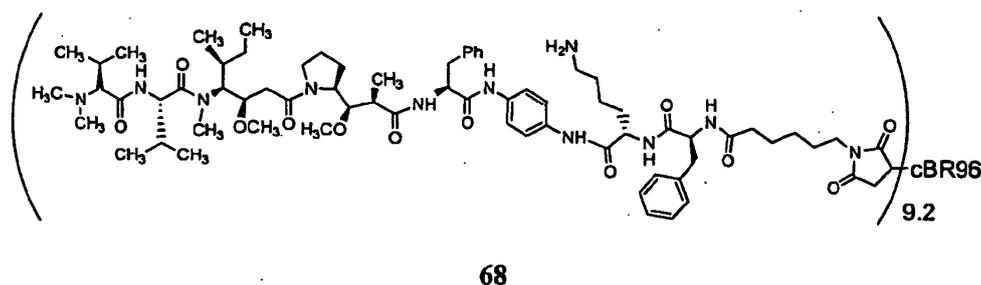
Titulación de tioles residuales: Tioles residuales = 0,5/Ab. Fármaco/Ab ~ 9,5 - 0,5 = 9,0

Fármaco-enlazador extinguido: 1,1% de aducto de 58-Cys

Rendimiento: 5,3 ml, 15,9 mg, 66 %.

EJEMPLO 24

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 68



[510] El anticuerpo cBR96 (24 mg) se redujo utilizando DTT como se describe en el Procedimiento General L, entonces se determinaron el número de tioles por anticuerpo y la concentración de anticuerpo como se describe en el Procedimiento General M y en el Procedimiento General N, respectivamente.

Resultados: [Ab] = 4,4 mg / ml = 27,2 µM; [tiol] = 277 µM; 10,2 SH/Ab

Conjugación:

El anticuerpo reducido se diluyó con DMSO (1,47 ml, previamente enfriado a 0 °C en un baño de hielo) para que la solución resultante fuera de DMSO al 20 %. La solución se dejó en agitación durante 10 min. a 0 °C, y luego se

añadieron rápidamente 127,8 µl de una solución madre del compuesto 60 (7,6 mM de solución en DMSO, 9 mol de Compuesto 60 por mol de anticuerpo). La mezcla de reacción se agitó inmediatamente utilizando un aparato de vórtice y se devolvió al baño de hielo y se agitó a 0 °C durante 1 hora, tras lo cual se añadieron 213 µl de una solución de cisteína (100 mM en PBS/DTPA), para extinguir la reacción. Se reservaron 60 µl de la mezcla de reacción extinguida como una muestra "qrm".

Mientras la reacción procedía, se colocaron cuatro columnas PD10 (Sephadex G25, ofrecida por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en un espacio frío y se equilibraron con PBS (que había sido previamente enfriado a 0 °C utilizando un baño de hielo).

La mezcla de reacción extinguida, que contenía el compuesto 68, se concentró a ≤ 3 ml por ultracentrifugación utilizando dos dispositivos de filtración con centrifuga Ultrafree 4 (membrana de separación de 30K de peso molecular, Millipore Corp., Bedford, MA; utilizada según las instrucciones del fabricante), que se enfriaron previamente a 4 °C en un refrigerador y la mezcla de reacción concentrada se eluyó a través de las cuatro columnas PD10 previamente enfriadas utilizando PBS como eluyente (1 ml por cada columna). El conjugado eluido se recogió en un volumen de 1,4 ml por columna, para un volumen total de 5,6 ml de eluido. La solución del conjugado eluido se filtró utilizando un filtro final con jeringa de 0,2 micras, se apartaron 250 µl de solución de conjugado para su análisis, y el resto de la solución del conjugado fue congelada en viales estériles.

[515] Se determinaron la concentración del compuesto 68, el número de moléculas de fármaco por anticuerpo, la cantidad de fármaco-enlazador extinguida y el porcentaje de agregados utilizando los Procedimientos Generales P, N, O y Q, respectivamente.

Debido a que las absorbancias del compuesto 60 y del anticuerpo se superponen en gran medida, la determinación espectrofotométrica de la concentración de conjugado requiere la medición de la absorbancia a 270 y 280 nm. La concentración molar de conjugado viene dada por la siguiente fórmula:

$$[\text{Conjugado}] = (\text{OD}_{280} \times 1,08e^{-5} - \text{OD}_{270} \times 8,20e^{-6}) \times \text{factor de dilución}$$

donde los valores $1,08e^{-5}$ y $8,20e^{-6}$ se calculan a partir de los coeficientes de extinción molar del fármaco y el anticuerpo, que se estiman como:

$$\epsilon_{270} \text{ Compuesto 60} = 2,06e4$$

$$\epsilon_{270} \text{ cBR96} = 1,87e5$$

$$\epsilon_{280} \text{ Compuesto 60} = 1,57e4$$

$$\epsilon_{280} \text{ cBR96} = 2,24e5$$

Resultados del ensayo:

[Compuesto 68] = 3,2 mg/ml

% Agregado = traza

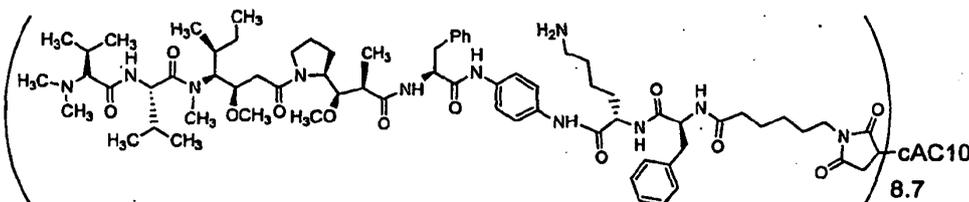
Titulación de tioles residuales: Tioles residuales = $1,0/\text{Ab. Fármaco}/\text{Ab} \sim 10,2 - 1,0 = 9,2$

Fármaco-enlazador extinguido: traza

Rendimiento: 5,6 ml, 17,9 mg, 75%.

EJEMPLO 25

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 69



69

El anticuerpo cAC10 (24 mg) se redujo utilizando DTT como se describe en el Procedimiento General L, entonces se determinaron el número de tioles por anticuerpo y la concentración de anticuerpo como se describe en el Procedimiento General M y en el Procedimiento General N, respectivamente.

Resultados: [Ab] = 4,8 mg/ml = 29,8 μ M; [tiol] = 281 μ M; 9,4 SH/Ab

Conjugación:

5 El anticuerpo reducido se diluyó con DMSO (1,47 ml, previamente enfriado a 0 °C en un baño de hielo) para que la solución resultante fuera de DMSO al 20 %. La solución se dejó en agitación durante 10 min. a 0 °C, y luego se añadieron rápidamente 140 μ l de una solución madre del compuesto 60 (7,6 mM de solución en DMSO, 8,5 mol de Compuesto 60 por mol de anticuerpo). La mezcla de reacción se agitó inmediatamente utilizando un aparato de vórtice y se devolvió al baño de hielo y se dejó agitar durante 1 h a 0 °C, tras lo cual se añadieron 213 μ l de una solución de cisteína (100 mM en PBS/ DTPA), para extinguir la reacción. Se reservaron 60 μ l de la mezcla de reacción extinguida como una muestra "qrm".

10 Mientras la reacción procedía, se colocaron cuatro columnas PD10 (Sephadex G25, ofrecida por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en un espacio frío y se equilibraron con PBS (que había sido previamente enfriado a 0 °C utilizando un baño de hielo).

15 La mezcla de reacción extinguida, que contenía el compuesto 69, se concentró a \leq 3 ml por ultracentrifugación utilizando dos dispositivos de filtración con centrifuga Ultrafree 4 (membrana de separación de 30K de peso molecular, Millipore Corp., Bedford, MA; utilizada según las instrucciones del fabricante), que se enfriaron previamente a 4 °C en un refrigerador y la mezcla de reacción concentrada se eluyó a través de las cuatro columnas PD10 previamente enfriadas utilizando PBS como eluyente (1 ml por cada columna). El conjugado eluido se recogió en un volumen de 1,4 ml por columna, para un volumen total de 5,6 ml de eluido. La solución del conjugado eluido se filtró utilizando un filtro final con jeringa de 0,2 micras, se apartaron 250 μ l de solución de conjugado para su análisis, y el resto de la solución del conjugado fue congelada en viales estériles.

20 Se determinaron la concentración del compuesto 69, el número de moléculas de fármaco por anticuerpo, la cantidad de fármaco-enlazador extinguida y el porcentaje de agregados utilizando los Procedimientos Generales P, N, O y Q, respectivamente.

25 Debido a que las absorbancias del compuesto 60 y del anticuerpo se superponen en gran medida, la determinación espectrofotométrica de la concentración de conjugado requiere la medición de la absorbancia a 270 y 280 nm. La concentración molar de conjugado viene dada por la siguiente fórmula:

$$[\text{Conjugado}] = (\text{OD}_{280} \times 1,08e^{-5} - \text{OD}_{270} \times 8,20e^{-6}) \times \text{factor de dilución},$$

donde los valores $1,08e^{-5}$ y $8,20e^{-6}$ se calculan a partir de los coeficientes de extinción molar del fármaco y el anticuerpo, que se estiman como:

30

ϵ_{270} Compuesto 60 = $2,06e^4$	ϵ_{270} cAC10 = $2,10e^5$
ϵ_{280} Compuesto 60 = $1,57e^4$	ϵ_{280} cAC10 = $2,53e^5$

Resultados del ensayo:

[Compuesto 69] = 3,0 mg/ml

% Agregado= traza

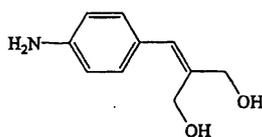
35 Titulación de tioles residuales: Tioles residuales = 0,7/Ab. Fármaco/Ab \sim 9,4 - 0,7 = 8,7

Fármaco-enlazador extinguido: traza

Rendimiento: 5,6 ml, 16,8 mg, 70 %.

EJEMPLO 26

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 75



75

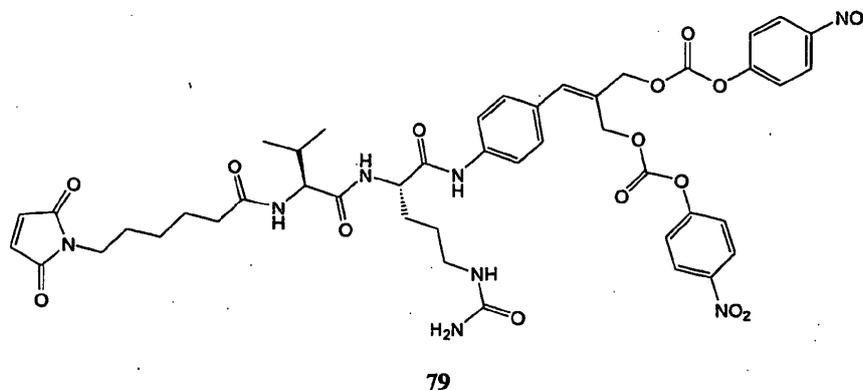
Se diluyó dietil-(4-nitrobencilo)fosfonato (1,1 g, 4,02 mmol) en THF anhidro (4 ml) y la mezcla resultante se enfrió a 0 °C. Se añadió hidruro de sodio (0,17 g, 4,22 mmol, 1,05 eq., dispersión al 60% en aceite mineral) y la reacción resultante se dejó en agitación durante 5 min. En este momento la evolución de gas de la mezcla de reacción había cesado. Entonces se añadió 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ona (0,52 g, 4,02 mmol) en 1 ml de THF anhidro a la mezcla de reacción a través de una jeringa y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente con agitación. Se añadió más THF (1 ml) después de 30 minutos para ayudar a diluir el precipitado resultante y la mezcla resultante se agitó durante otros 30 min. y se transfirió a un embudo de separación que contenía EtOAc (10 ml) y agua (10 ml). La fase orgánica se recogió, se lavó con salmuera, y los extractos acuosos combinados se lavaron con acetato de etilo (2x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y concentraron para proporcionar un aceite crudo rojo oscuro que se purificó mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice (300 x 25 mm) y eluyendo con hexanos-EtOAc 9:1 para proporcionar un producto intermedio sólido amarillo pálido.

Rendimiento: 0,57 g (57 %); R_f 0,24 (9:1 hexanos-EtOAc); UVλ_{max} 225, 320 nm. ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,19 (2H, d, J = 8,4 Hz), 7,24 (2H, d, J = 8,4 Hz), 6,33 (1H, s), 4,62 (2 H, s), 4,42 (2H, s), 1,45 (6 H, s). ¹³C RMN (CDCl₃) δ 146,6, 142,7, 141,3, 129,4, 123,9, 121,1, 99,9, 64,4, 60,8, 24,1.

El producto intermedio sólido amarillo pálido (0,25 g, 1,0 mmol) se diluyó con THF (20 ml), la mezcla resultante se trató con 1 N de HCl (10 ml) y se dejó agitar durante 5 min. A la mezcla de reacción se le añadió éter dietílico (150 ml) y agua y la mezcla resultante se transfirió a un embudo de separación. La capa orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró para dar un aceite. El diol resultante se recogió en THF-metanol (1:1, 4 ml cada uno, 0,3 M), seguido de la adición de níquel Raney (100 µl, 100 µl/mmol grupo nitro, suspensión en agua al 50%) e hidracina (74 µl, 1,5 eq.) La evolución de gas se produjo mientras la mezcla de reacción se calentaba a 50-60 °C. Después de 30 minutos y 1 hora se agregó 1,5 eq. de hidracina cada vez. La mezcla amarilla se filtró a través de celita y se lavó con metanol. El filtrado se concentró para proporcionar el compuesto 75 como un aceite que cristalizó después en un sólido amarillo. Rendimiento: 0,14 g (78 %); UVλ_{max} 215, 260 nm. ¹H RMN (DMSO) δ 7,00 (2H, d, J = 8,4 Hz), 6,51 (2H, d, J = 8,4 Hz), 6,33 (1H, s), 5,20 (2H, bs), 4,64 (2H, bd), 4,04 (2H, s). ¹³C RMN (DMSO) δ 147,2, 38,1, 129,6, 126,1, 124,6, 113,7, 63,6, 57,5.

EJEMPLO 27

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 79



A una mezcla del compuesto 75 (BHMS, 0,12 g, 0,67 mmol) en metanol-diclorometano (1:2, 4,5 ml en total) se añadió Fmoc-Val-Cit (0,33 g, 0,67 mmol), seguido de EEDQ (0,25 g, 1,0 mmol, 1,5 eq.) y la reacción resultante se dejó en agitación durante 15 horas bajo atmósfera inerte. Entonces se añadió más EEDQ (1,5 eq.) y Fmoc-Val-Cit (1,0 eq.) debido a la presencia de BHMS sin reaccionar y la reacción resultante se dejó en agitación durante 2 días y se concentró. El residuo resultante se trituró utilizando éter para proporcionar un producto intermedio sólido marrón. ES-MS *m/z* 659 [M+H]⁺, 681 [M+Na]⁺; UVλ_{max} 215, 270 nm. ¹H RMN (DMSO) δ 10,04 (1 H, s), 8,10 (1 H, d, J = 7,2 Hz), 7,87 (2 H, d, J = 7,6 Hz), 7,72 (2 H, t, J = 7,6 Hz), 7,55 (2 H, d, J = 8,4 Hz), 7,37-7,43 (3 H, m), 7,30 (2 H, t, J = 7,2 Hz), 7,24 (2 H, d, J = 8,4 Hz), 6,47 (1 H, s), 5,96 (1 H, t, J = 5,2 Hz), 5,39 (1 H, s), 4,83 (1 H, t, J = 5,2 Hz), 4,78 (1 H, t, J = 5,2 Hz), 4,40 (1 H, dd, J = 5,2, 8,0 Hz), 4,20-4,30 (3 H, m), 4,11 (2 H, d, J = 4,4 Hz), 4,04 (2 H, d, J = 5,2 Hz), 3,91 (1 H, t, J = 7,2 Hz), 2,84-3,06 (2 H, m), 1,91-2,03 (1 H, m), 1,29-1,74 (4 H, m), 0,86 (3 H, d, J = 6,8 Hz), 0,84 (3 H, d, J = 6,8 Hz).

El producto intermedio sólido marrón se diluyó con DMF (10 ml) y la mezcla resultante se trató con dietilamina (5 ml), se dejó agitar durante 1 hora y se concentró para proporcionar un sólido marrón que se secó a alto vacío durante 3 días. El sólido marrón se trituró utilizando EtOAc (10 ml) y se precipitó adicionalmente con éter (80 ml) para

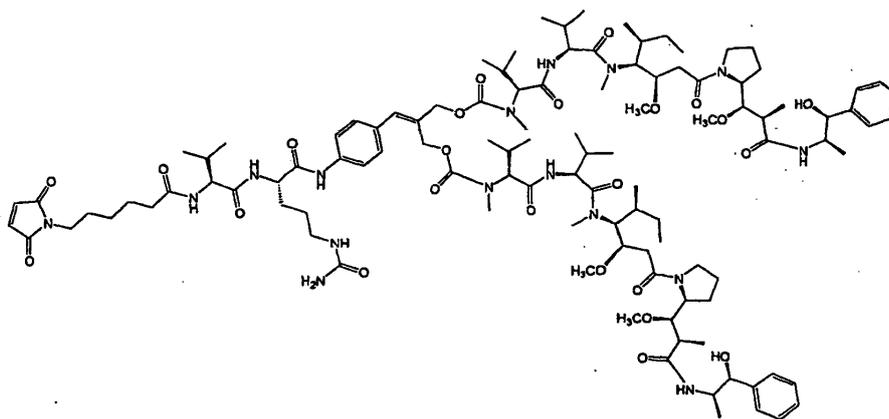
proporcionar un residuo crudo que se filtró a través de un embudo de cristal sinterizado y se secó al vacío para dar un producto intermedio marrón claro. ES-MS m/z 436 $[M+H]^+$, 458 $[M+Na]^+$; $UV\lambda_{max}$ 215, 270 nm.

5 El producto intermedio marrón claro se diluyó con DMF (10 ml) y se trató con éster hidroxisuccinimídico del ácido 6-maleimidocapróico (0,16 g, 0,53 mmol, 1 eq.). La reacción se dejó en agitación durante 18 h, se añadió más diisopropiletilamina (1,0 eq) seguido de más éster hidroxisuccinimídico del ácido 6-maleimidocapróico (0,5 eq.). La reacción resultante se dejó en agitación durante 4 horas, después de lo cual la HPLC indicó que el material de partida se había consumido. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un residuo crudo que se trituró utilizando EtOAc (10 ml) y luego se precipitó adicionalmente con éter (75 ml). El precipitado se secó durante la noche para proporcionar un producto intermedio marrón/naranja en polvo. Rendimiento total: 0,42 g (cuant.). ES-MS m/z 629 $[M+H]^+$, 651 $[M+Na]^+$; $UV\lambda_{max}$ 215, 270 nm.

10 El producto intermedio en polvo marrón/naranja (0,40 g, 0,64 mmol) se disolvió parcialmente en DMF (20 ml) y a la mezcla resultante se le añadió bis(4-nitrofenil)carbonato (0,98 g, 3,2 mmol, 5,0 eq.) y diisopropiletilamina (0,45 ml, 2,5 mmol, 4,0 eq.). La reacción resultante se dejó en agitación durante unas 4 horas, tras lo cual, el control por HPLC indicó que no quedó material de partida y que la mezcla de reacción contenía 2 productos en una relación de 3:2 (el bis-carbonato deseado y la 1,3-dioxan-2-ona, respectivamente). La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se trituró utilizando EtOAc (10 ml), y luego se precipitó adicionalmente con éter (80 ml) en un solo proceso. La mezcla de EtOAc-éter se filtró y el sólido se secó para proporcionar el compuesto 79 como un polvo marrón que se utilizó sin purificación adicional.

EJEMPLO 28

20 PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 80

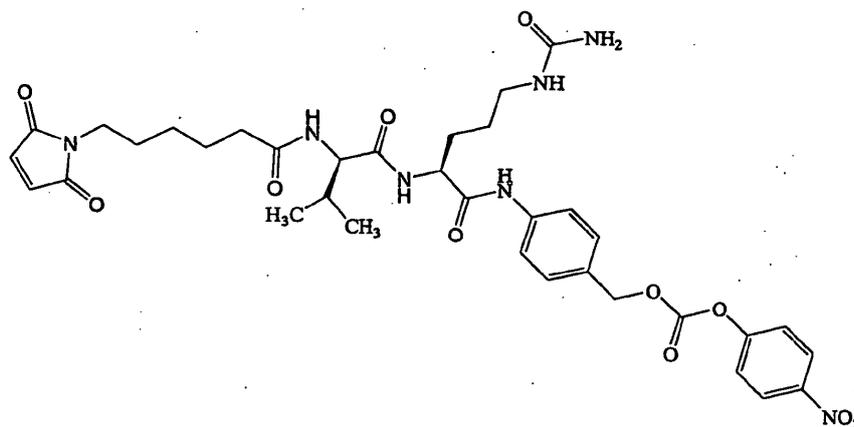


80

25 El compuesto **49** (202 mg, 0,22 μ mol, 2,0 eq., 80% de pureza) y el compuesto **79** (180 mg, 0,11 mmol, 1,0 eq., 60% de pureza) se suspendieron en DMF seco (2 ml, 0,1 M) y a la mezcla resultante se le añadió HOBt (3 mg, 22 μ mol, 0,2 eq.) seguido de piridina (400 μ l, $\frac{1}{4}$ v/v DMF). La reacción resultante se dejó en agitación durante 16 h, se diluyó con DMSO (2 ml) y la mezcla resultante se purificó mediante HPLC preparativa (columna C_{18} -RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua de 10 a 100 % en 40 min seguido de 20 minutos a 100%, con un caudal de 50 ml/min) para proporcionar el compuesto 80 como un sólido blanco. Rendimiento: 70 mg (18 %). MALDI-TOF MS m/z 2138,9 $[M+Na]^+$, 2154,9 $[M+K]^+$.

EJEMPLO 29

30 PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 81

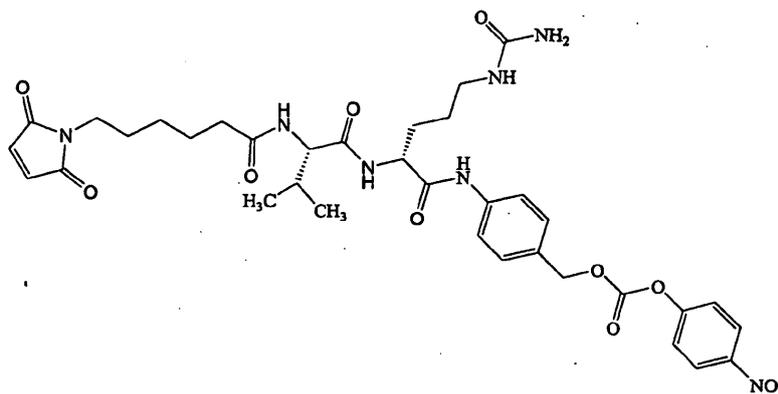


81

El compuesto 81 se realizó utilizando el método descrito en el Ejemplo 1 y sustituyendo Fmoc-(D)-val-(L)-cit-PABOH por el Compuesto 19.

EJEMPLO 30

5 PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 82

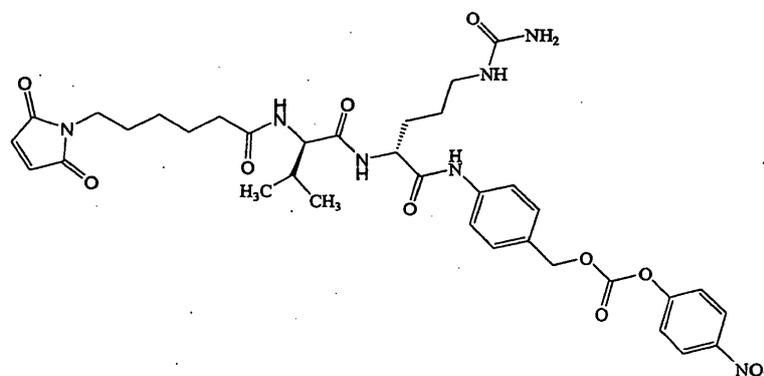


82

El compuesto 82 se realizó utilizando el método descrito en el Ejemplo 1 y sustituyendo Fmoc-(L)-val-(D)-cit-PABOH por el Compuesto 19.

EJEMPLO 31

10 PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 83

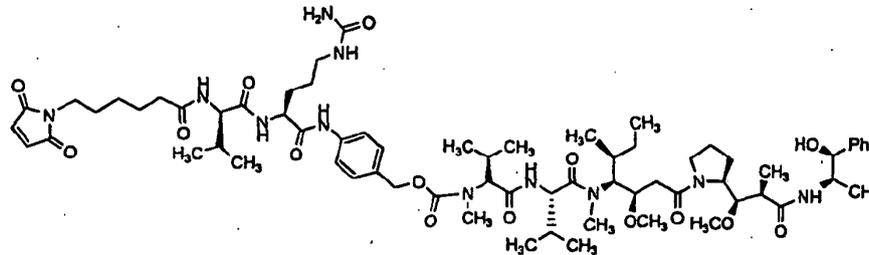


83

El compuesto 83 se realizó utilizando el método descrito en el Ejemplo 1 y sustituyendo Fmoc-(D)-val-(D)-cit-PABOH por el Compuesto 19.

EJEMPLO 32

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 84



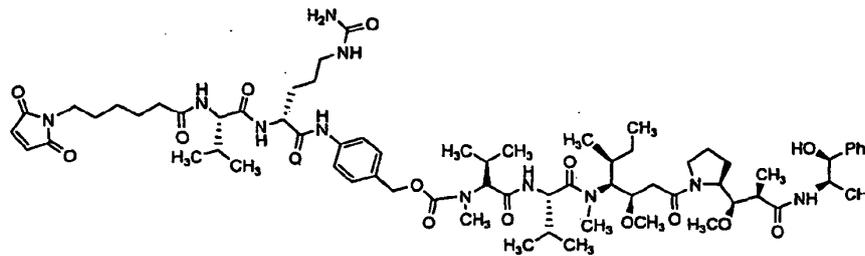
84

5

El compuesto 84 se realizó utilizando el método descrito en el Ejemplo 14 y sustituyendo el compuesto 81 por el compuesto 21.

EJEMPLO 33

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 85



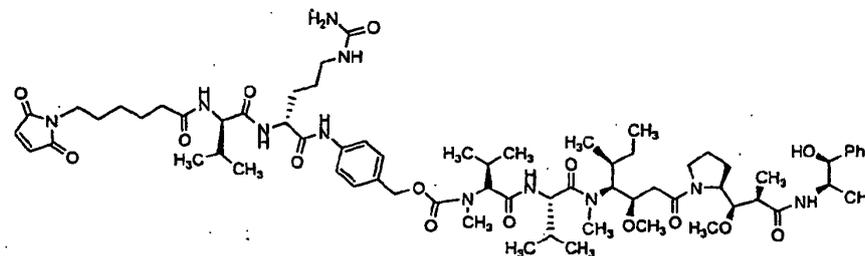
85

10

El compuesto 85 se realizó utilizando el método descrito en el Ejemplo 14 y sustituyendo el compuesto 82 por el compuesto 21.

EJEMPLO 34

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 86



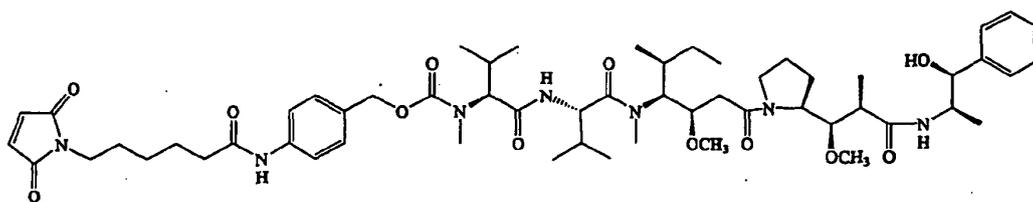
86

15

El compuesto 86 se realizó utilizando el método descrito en el Ejemplo 14 y sustituyendo el compuesto 83 por el compuesto 21.

EJEMPLO 35

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 87

**87**

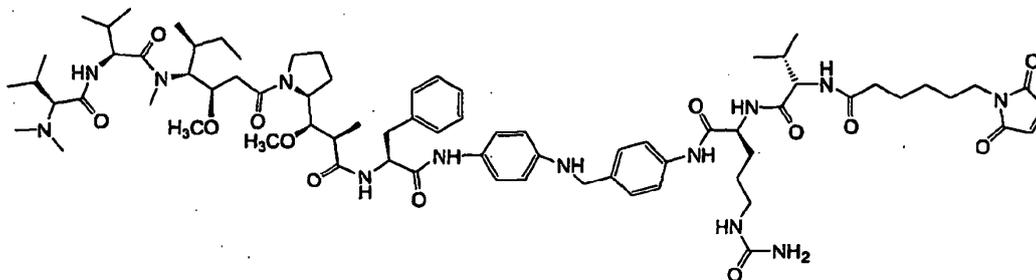
Se diluyó una mezcla de ácido 6-maleimidocapróico (1,00 g, 4,52 mmol, 1,0 eq.), alcohol p-aminobenílico (1,11 g, 9,04 mmol, 2,0 eq.) y EEDQ (2,24 g, 9,04 mmol, 2,0 eq.) en diclorometano (13 ml). La reacción resultante se agitó durante aproximadamente 16 h., luego se concentró y se purificó utilizando cromatografía en columna flash de un gradiente de EtOAc de 25-100% en hexano para proporcionar un producto intermedio sólido. Rendimiento: 1,38 g (96 %); ES-MS m/z 317,22 $[M+H]^+$, 339,13 $[M+Na]^+$; $UV\lambda_{max}$ 215, 246 nm.

Se diluyó el producto intermedio sólido (0,85 g, 2,69 mmol, 1,0 eq.) y bis(4-nitrofenil)carbonato (2,45 g, 8,06 mmol, 3,0 eq.) en DMF (10 ml), y a la mezcla resultante se le añadió diisopropiletilamina (0,94 ml, 5,37 mmol, 2,0 eq.). La reacción resultante se agitó durante aproximadamente 1 h., tras lo cual la RP-HPLC indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo crudo resultante se trituró con éter dietílico (unos 250 ml) para proporcionar un producto intermedio sólido blanco tras la filtración. Rendimiento: 1,25 g (96 %); $UV\lambda_{max}$ 215, 252 nm.

Se diluyó el producto intermedio sólido blanco (259 mg, 0,0538 mmol, 1,0 eq.), MMAE (464 mg, 0,646 mmol, 1,2 eq.) y HOBt (14,5 mg, 0,108 mmol, 0,2 eq.) en piridina/DMF (1:5, 6 ml), y la reacción resultante se agitó durante 10 h, tras lo cual la RP-HPLC indicó una reacción incompleta. La mezcla de reacción se concentró, el residuo crudo resultante se diluyó utilizando DMF (3 ml), y a la mezcla resultante se le añadió diisopropiletilamina (0,469 ml, 0,538 mmol, 1,0 eq.) y la reacción resultante se dejó en agitación durante unas 16 h. La mezcla de reacción se purificó directamente utilizando Chromatotron® (cromatografía radial en capa fina) con un gradiente (0-5% de metanol en diclorometano), para proporcionar el compuesto **87** como un sólido blanco. Rendimiento: 217 mg (38 %); ES-MS m/z 1082,64 $[M+Na]^+$; $UV\lambda_{max}$ 215, 248 nm.

EJEMPLO 36

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 88

**88**

Se suspendió Fmoc-Val-cit (Patente US 6.214.345 a nombre de Firestone et al.) en diclorometano (50 ml) y la mezcla resultante se trató con HBr al 33% en HOAc (20 ml), que se añadió a través de una pipeta durante unos 5 minutos. Después de agitar durante unos 10 minutos, se demostró que la mezcla de reacción se había completado utilizando HPLC. La mezcla de reacción se diluyó con hielo (unos 500 ml) y se añadió bicarbonato sódico acuoso saturado lentamente mientras se agitaba hasta que la evolución de gas cesó. La masa gelatinosa resultante se filtró y lavó con agua destilada para proporcionar un sólido que se secó a alto vacío, en presencia de P_2O_5 durante 24 h. El producto intermedio en polvo marrón (Fmoc-val-cit-PAB-Br) tuvo una pureza de aproximadamente 70 % por HPLC y se utilizó sin purificación adicional.

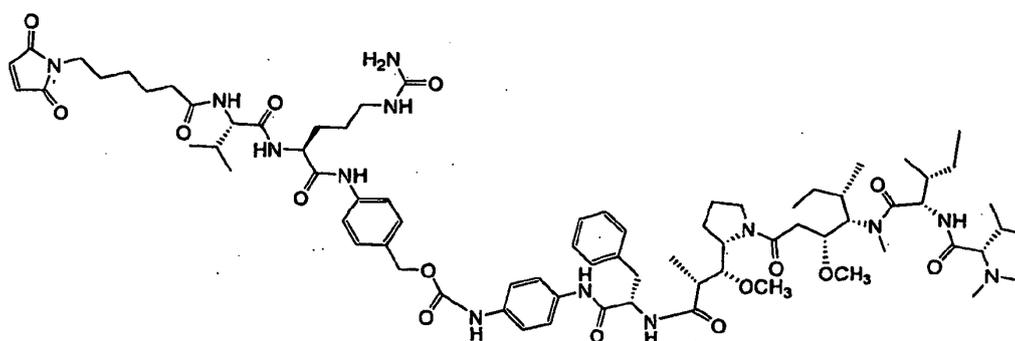
El producto intermedio en polvo marrón (30 mg, 40,6 μ mol) y el compuesto **53** (34 mg, 40,6 μ mol) se disolvieron en DMF (1 ml), y a la mezcla resultante se le añadió diisopropiletilamina (21 μ l, 0,12 mmol, 3,0 eq.). La reacción resultante se dejó en agitación durante 6 h., se diluyó en DMSO (1 ml) y se purificó inmediatamente usando HPLC preparativa (columna C_{12} -RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (conteniendo ácido fórmico al 0,1%) de

10 a 100% en 40 min seguido de 20 minutos a 100%, con un caudal de 25 ml/min) para proporcionar un producto intermedio en polvo marrón claro. Rendimiento: 5 mg (8 %); ES-MS m/z 14207,2 $[M+H]^+$, 1443 $[M+Na]^+$; $UV\lambda_{max}$ 205, 258 nm.

- 5 El producto intermedio en polvo marrón claro (4 mg, 9,5 μ mol) se diluyó con DMF (1 ml) y la mezcla resultante se trató con dietilamina (0,5 ml). La reacción resultante se completó en 1 h según la HPLC. La mezcla de reacción se concentró para proporcionar un residuo sólido oleoso que se trituró con éter (3x) para proporcionar un residuo crudo. El residuo bruto se diluyó con DMF (1 ml) y a la mezcla resultante se le añadió éster hidroxisuccinimídico del ácido 6-maleimidocaprílico (3 mg, 9,5 μ mol). La reacción resultante se dejó agitar la reacción a temperatura ambiente durante unas 16 h. La mezcla de reacción se purificó directamente utilizando HPLC preparativa (columna C₁₂-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (conteniendo ácido fórmico al 0,1 %) de 10 a 100% en 40 min seguido de 20 minutos a 100%, con un caudal de 25 ml/min) para proporcionar el compuesto **88** como un sólido ligeramente marrón. Rendimiento: 3,9 mg (cuant); ES-MS m/z 1391 $[M+H]^+$; $UV\lambda_{max}$ 205, 250 nm.

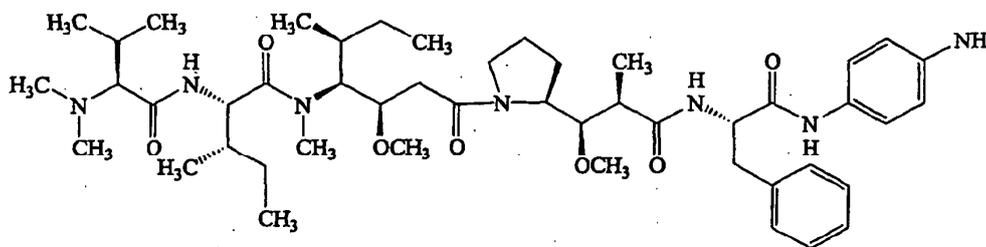
EJEMPLO 37

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 89

**89**

15

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 89 A

**89A**

El compuesto 89A se preparó utilizando el método descrito en el Ejemplo 9 y sustituyendo el tripéptido del compuesto 43 por el producto intermedio tripéptido del compuesto 42.

20 *Preparación del Compuesto 89*

- El compuesto 89a (0,13 g, 0,15 μ mol, 1,0 mmol), el compuesto 21 (0,12 g, 0,17 mmol, 1,1 eq.) y HOBt (4 mg, 31 μ mol, 0,2 eq.) se suspendieron en DMF/piridina (2 ml/0,5 ml, respectivamente). La reacción resultante se dejó en agitación durante unas 4 h., luego se le añadió diisopropiletilamina (27 μ l, 0,15 mmol, 1,0 eq.) y la reacción resultante se dejó en agitación durante unas 54 h, y se concentró a vacío. El crudo resultante se diluyó con DMSO y se purificó utilizando HPLC preparativa (columna C₁₂-RP, 5 μ , 100 Å, gradiente lineal de MeCN en agua (conteniendo TFA al 0,1%) de 10 a 100% en 40 min seguido de 20 minutos a 100%, con un caudal de 25 ml/min) para proporcionar un aceite de color amarillo que se recogió en una cantidad mínima de diclorometano y se precipitó con abundante éter para producir el compuesto 89 como un polvo marrón.

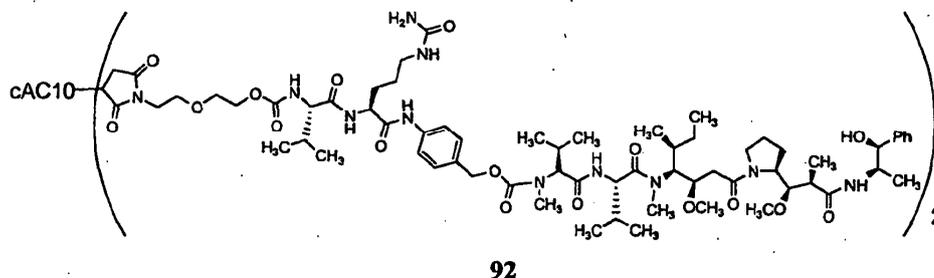
Rendimiento: 0,15 mg (68 %). ES-MS m/z 1449,14 $[M+H]^+$; $UV\lambda_{max}$ 215, 258 nm.

30

cambió por PBS, pH 7,4. Después de la diafiltración, el conjugado se pasó por un filtro estéril utilizando un filtro de 0,22 micras para proporcionar el compuesto 91 en una solución clara e incolora.

EJEMPLO 40

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO 92



5

El compuesto 92 se preparó utilizando el método descrito en el Ejemplo 39 utilizando una cantidad de DTT (de una solución madre de 10 mM), que proporcionó una relación molar final de DTT-cAC10 de aproximadamente 1,5 en la reacción de reducción.

6.2 EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

- 10 Las líneas celulares utilizadas fueron carcinoma de mama humano H3396 (antígeno positivo cBR96, antígeno negativo cAC10), carcinoma colorrectal humano HCT-116 (antígeno negativo cBR96 y cAC10) y linfoma anaplásico de células grandes humano Karpas (LACG) (antígeno negativo cBR96, antígeno positivo cAC10). Estas líneas celulares son suministradas por el ATCC. La línea celular L540 de la enfermedad de Hodgkin (HD) de CD30 positiva y la línea celular Karpas 299 se obtuvieron de la Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania). L540cy, un derivado de la L540 HD adaptado al crecimiento de aloinjertos, fue proporcionado por el Dr. Phil Thorpe (Universidad de Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX). Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD), complementadas con suero fetal bovino al 10%. Se sembraron las células H3396 en RPMI con suero fetal bovino al 10% (al que se llamará medio) en placas de 96 pocillos en aproximadamente 3.000-10.000 células/pocillo y se dejó que se adhirieran durante toda la noche. La línea celular Karpas no adherente se sembró en aproximadamente 10.000 células/pocillo al inicio del ensayo. Se añadieron varias concentraciones de los compuestos ilustrativos de la invención en el medio por triplicado, y después de los tiempos indicados en las figuras 1-7, se retiró el medio y las células se lavaron con medio fresco tres veces. Después de un período de 96 horas de incubación a 37 °C, se añadió azul Alamar y se determinó la viabilidad celular 4 horas más tarde según lo descrito por Ahmed SA, Gogal RM Jr, Walsh JE., J. Immunol. Methods, 170, 211-224, 1994.

Se utilizaron ratones C.B.-17 SCID (Harlan, Indianapolis, IN) para los experimentos in vivo.

EJEMPLO 41

DATOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

- 30 Los efectos citotóxicos del compuesto 49 y el compuesto 53 en las células de carcinoma de mama humano H3396 se muestran en la figura 1. Los datos muestran que después de la exposición durante 1 hora, el compuesto 53 es más citotóxico que el compuesto 49 en concentraciones de hasta 0,01 mM. Los compuestos muestran sustancialmente la misma citotoxicidad a concentraciones entre 0,01 mM y 1,0 mM.

EJEMPLO 42

DATOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

- 35 La figura 2 muestra los efectos citotóxicos de los compuestos 64, 65, 68 y 69 en células de carcinoma de mama humano H3396 (antígeno positivo cBR96, antígeno negativo cAC10). Los datos muestran que los compuestos 64 y 68 demuestran una citotoxicidad similar y significativa, mientras que los compuestos 65 y 69 son menos eficaces, pero citotóxicos contra las células H3396 en este ensayo en particular.

EJEMPLO 43

- 40 DATOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

La figura 3 muestra los efectos citotóxicos de los compuestos 64, 65, 68 y 69 en células de carcinoma colorrectal humano HCT-116 (antígeno negativo cBR96, antígeno negativo cAC10). Los datos ilustran que ninguno de los compuestos 64, 65, 68 y 69 es citotóxico hacia las células HCT-116 con el antígeno negativo en este ensayo.

EJEMPLO 44

5 *DATOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO*

La figura 4 ilustra los efectos citotóxicos de los compuestos 66 y 68 en células de carcinoma de mama humano H3396 (antígeno positivo cBR96). Los datos muestran que ambos compuestos son altamente citotóxicos a concentraciones superiores a 0,1 mM y que el Compuesto 68 muestra una mayor citotoxicidad que el compuesto 66 en concentraciones entre 0,01 mg/ml y 0,4 mg/ml.

10 EJEMPLO 45

DATOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

La figura 5 ilustra la citotoxicidad de los compuestos 66, 68 y 69 en el linfoma anaplásico de células grandes humano Karpas (antígeno negativo cBR96, antígeno positivo cAC10). Los datos muestran que el compuesto 69 era más citotóxico hacia las células Karpas en comparación con los compuestos 68 y 66 en este ensayo. El compuesto 69 demostró una citotoxicidad significativa con concentraciones superiores a 0.001 mM, mientras que el compuesto 66 y el compuesto 68 no fueron citotóxicos a concentraciones inferiores a 1,0 mg/ml.

EJEMPLO 46

DATOS DE CITOTOXICIDAD IN VITRO

La figura 6 ilustra la citotoxicidad de los compuestos 66 y 67 a las 2 h. y 96 h. en células de carcinoma de mama humano H3396 (antígeno positivo cBR96, antígeno negativo cAC10). Los datos muestran que el compuesto 66 es altamente citotóxico a concentraciones superiores a 100 mg/ml en una exposición a corto plazo (2 h) mg/ml, y en concentraciones superiores a 100 mg/ml durante la exposición a largo plazo (96 h). El compuesto 67 no demostró citotoxicidad contra las células H3396 en este ensayo en concentraciones de hasta 1000 mg/ml.

Procedimiento general S: Prueba in vivo de una selección de conjugados de fármaco-enlazador-anticuerpo. Para la línea celular de adenocarcinoma humano L2987, a unos ratones calvos atímicos (de 8-10 semanas de edad) se les implantaron tumores o células tumorales de aloinjerto. Para el modelo de linfoma anaplásico de células grandes humano Karpas, se implantaron a ratones CB-17 SCID subcutáneamente con 5×10^6 células. En los dos modelos tumorales, la terapia se inició una vez que los tumores alcanzaron un volumen medio de 100 mm^3 . Los grupos de ratones fueron inyectados con uno de los compuestos 66-69 en solución salina tamponada con fosfato por vía intravenosa cada cuatro días para un total de 6 inyecciones para los animales con L2987 y dos inyecciones para los animales con Karpas. El volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula: $0,5$ (dimensión mayor \times dimensión² perpendicular). Los ratones se retiraron del estudio cuando los tumores fueron de aproximadamente 1.000 mm^3 , momento en el que el tamaño medio del tumor en el grupo en particular dejó de representarse en el gráfico.

EJEMPLO 47

35 *EFICACIA TERAPÉUTICA IN VIVO EN TUMORES L2987*

La figura 7 muestra los efectos terapéuticos de los compuestos 66-69 en tumores de aloinjertos de adenocarcinoma pulmonar humano L2987 (antígeno positivo cBR96, antígeno negativo cAC10) implantados en ratones calvos atímicos. Se siguió el Procedimiento general S utilizando tumores pulmonares humanos L2987 subcutáneos (para su transferencia in vivo). A los ratones se les administró por inyección uno de los compuestos 66, 67, 68 o 69 a intervalos de cuatro días para un total de 6 inyecciones. La primera inyección fue a los 15 días posteriores al implante del tumor. Los datos ilustran que la administración del compuesto 66 y el compuesto 68 reduce notablemente el volumen del tumor sin que se observara ningún crecimiento adicional en los ratones tratados durante aproximadamente 25 días después de la última inyección. El compuesto 67 y el compuesto 69 fueron menos eficaces, pero inhibieron la multiplicación de las células tumorales en los ratones tratados. La prueba se detuvo en los animales que recibieron los compuestos 67 y 69 cuando el volumen del tumor superó 1.000 mm^3 .

EJEMPLO 48

EFICACIA TERAPÉUTICA IN VIVO EN TUMORES KARPAS

La figura 8 muestra los efectos terapéuticos de los compuestos 66-69 en tumores de aloinjertos de linfoma anaplásico de células grandes humano Karpas (antígeno positivo cAC10, antígeno negativo cBR96) implantados en ratones calvos. Se siguió el Procedimiento General S utilizando el modelo de linfoma anaplásico de células grandes

humano Karpas, implantando a ratones CB-17 SCID subcutáneamente con 5×10^6 células. A los ratones se les administró por vía intravenosa uno de los compuestos 66, 67, 68 o 69 a intervalos de cuatro días para un total de 2 inyecciones empezando en el día 8. Los datos ilustran que los compuestos 67 y 69 indujeron regresiones completas y que los tumores progresaron en los animales que recibieron cantidades sustancialmente equivalentes de los compuestos 66 y 68.

EJEMPLO 49

DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE UNA SELECCIÓN DE COMPUESTOS EN CÉLULAS CD30- Y CD30+

Después de su caracterización física, se evaluó la citotoxicidad in vitro de los compuestos 67, 91 y 92 en células CD30⁺ Karpas 299 y CD30⁻ Raji utilizando el ensayo con azul Alamar como se describió anteriormente. El porcentaje de células viables se representó en un gráfico frente a la concentración de cada molécula para determinar la IC₅₀ (definida como la concentración de mAb que dio una eliminación del 50% de las células).

El compuesto 67 demostró actividad contra de las células Karpas 299 con un IC₅₀ de 4 ng/ml. El IC₅₀ fue inversamente proporcional a la carga del fármaco, ya que aumentó de 4 ng/ml para el compuesto 67 a 7 ng/ml para el Compuesto 91 y a 40 ng/ml para el compuesto 92. La selectividad de los compuestos probados se evaluó utilizando la línea celular Raji con el antígeno negativo, que fue imperceptible para todos los compuestos que contenían cAC10 con valores de IC₅₀ > 1000 ng/ml para los compuestos 67, 91 y 92.

EJEMPLO 50

CITOTOXICIDAD EN UNA SELECCIÓN DE COMPUESTOS EN MODELOS DE ALOINJERTOS DE HD Y ALCL

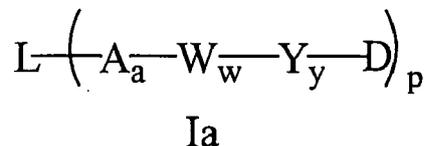
Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos 67, 91 y 92 en modelos de aloinjertos de enfermedad de Hodgkin L540c2 y de linfoma de células grandes anaplásico humano Karpas 99 en ratones C.B.-17 SCID. Las evaluaciones se iniciaron cuando el volumen de los tumores alcanzó un promedio de 50 a 100 mm³. Las cohortes de ratones portadores de Karpas-299 se inyectaron 4 veces durante 4 días con el compuesto 92, el compuesto 91 o el compuesto 67 con 0,25 mg/kg o 0,5 mg/kg. Ninguno de los animales tratados con 0,25 mg/kg tuvo una regresión, aunque se produjo un retraso en el crecimiento tumoral, en comparación con los controles no tratados, de los animales tratados con el compuesto 91 y el compuesto 67. El tratamiento de los tumores Karpas con el compuesto 91 y el compuesto 67 con 0,5 mg/kg 4 veces al día durante 4 día consiguió 5/5 regresiones completas y 4/5 regresiones completas, respectivamente. Se observó un retraso en el crecimiento del tumor, en comparación con los animales no tratados para el Compuesto 92 con 0,5 mg/kg 4 veces al día durante 4 días, pero no se obtuvieron regresiones completas.

También se probó la eficacia en un modelo de Karpas subcutáneo con una selección de compuestos administrados como una dosis única. El compuesto 91 y el compuesto 67 fueron inyectados con dosis única de 0,25, 0,5 y 2,0 mg/kg. En la dosis de 0,25 mg/kg no hubo actividad antitumoral en ninguno de los grupos y el volumen del tumor no se desvió de los controles no tratados. Se demostró un retraso en el crecimiento del tumor por las dos moléculas de 0,5 mg/kg, pero no se obtuvieron regresiones completas. El tratamiento de los ratones con el compuesto 91 y el compuesto 67 con 2 mg/kg alcanzó el 100% de las regresiones completas en ambos grupos.

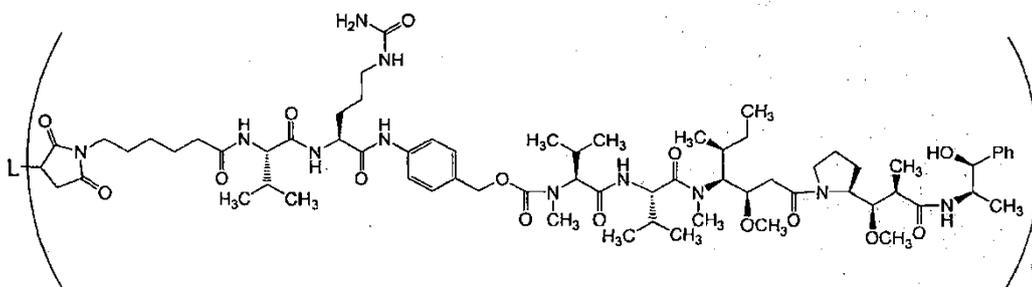
El compuesto 91 y el compuesto 67 se compararon también en ratones portadores de tumores HD humanos L540cy subcutáneos tratados con el compuesto 4 veces al día durante 4 días con el compuesto 91 y el compuesto 67 con 1 y 3 mg/kg. En los ratones tratados con el compuesto 91 y el compuesto 67 con 1 mg/kg se produjeron retrasos significativos en el crecimiento del tumor en comparación con los animales no tratados. Se observaron regresiones completas en los ratones administrados con ambos, el compuestos 91 y el compuesto 67 con 3 mg/kg.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos, que comprende un compuesto de la fórmula Ia:



- 5 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos en los que,
 L- es un anticuerpo monoclonal que se une inmunoespecíficamente al antígeno CD30;
 -A- es una unidad de extensor;
 a es 1;
 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;
 10 w es un número entero que varía de 2 a 12;
 - Y- es una unidad de espaciador que se autoinmola;
 y es 1 ó 2;
 p varía de 1 a alrededor de 20, y es el número promedio de unidades -A_a-W_w-Y_y-D por anticuerpo en la composición;
 y
 15 - D es una unidad de fármaco,
 en el que los compuestos de fórmula Ia tienen la estructura



o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico AC 10.
 20 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que p varía de 1 a alrededor de 5.
 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que p varía de alrededor de 3 a alrededor de 5.
 5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición farmacéutica es un polvo liofilizado seco.
 25 6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición farmacéutica está en forma de un líquido.
 7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de cáncer.
 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que es para uso en el tratamiento de un cáncer hematológico.
 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que el cáncer hematológico es linfoma de Hodgkin.

**Citotoxicidad en células H3396
ensayo de 1 hora de exposición**

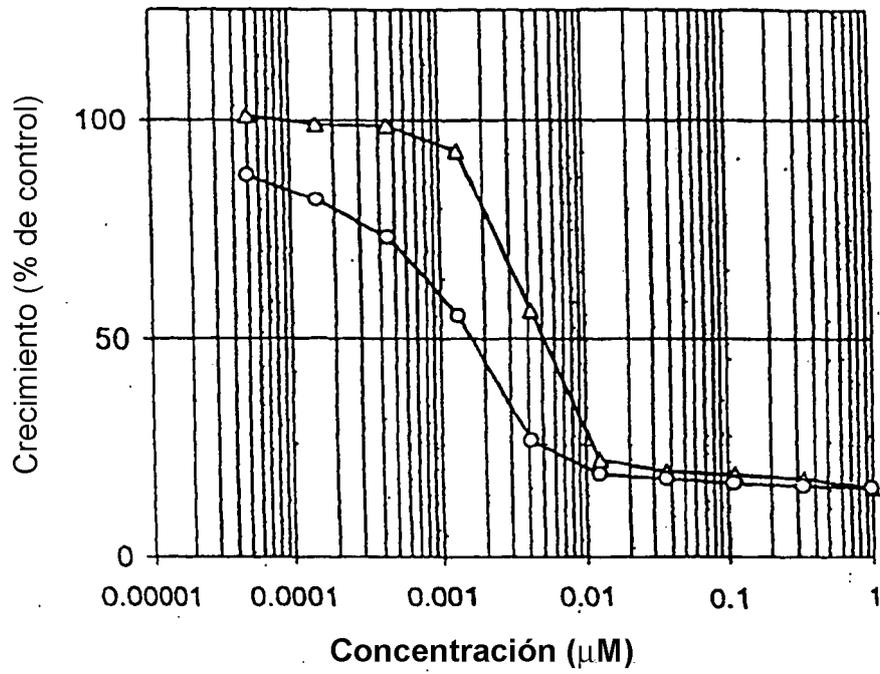


Fig. 1

Citotoxicidad in vitro en células H3396
exposición de 2 horas del conjugado
(cBR96 Ag +, cAC10 Ag -)

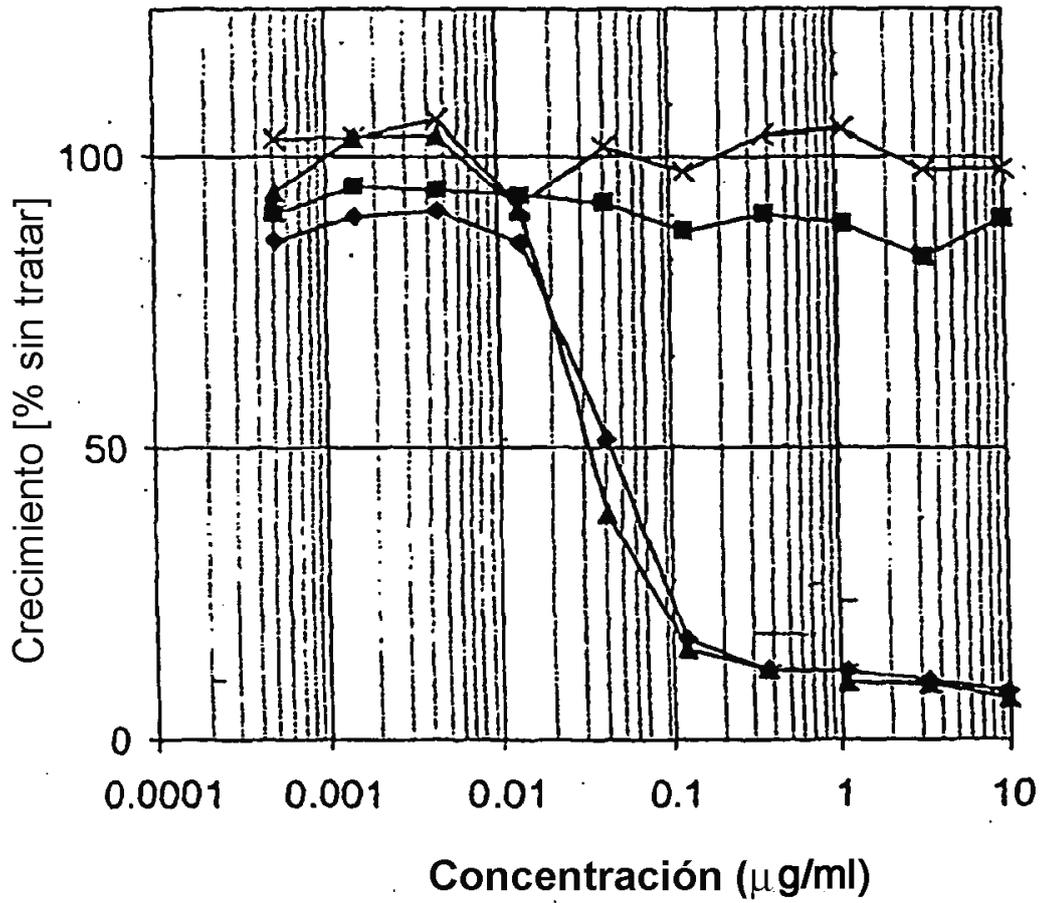


Fig. 2

Citotoxicidad in vitro en células HCT-116
 exposición de 2 horas del conjugado

(cBR96 Ag⁻, cAC10 Ag⁻)

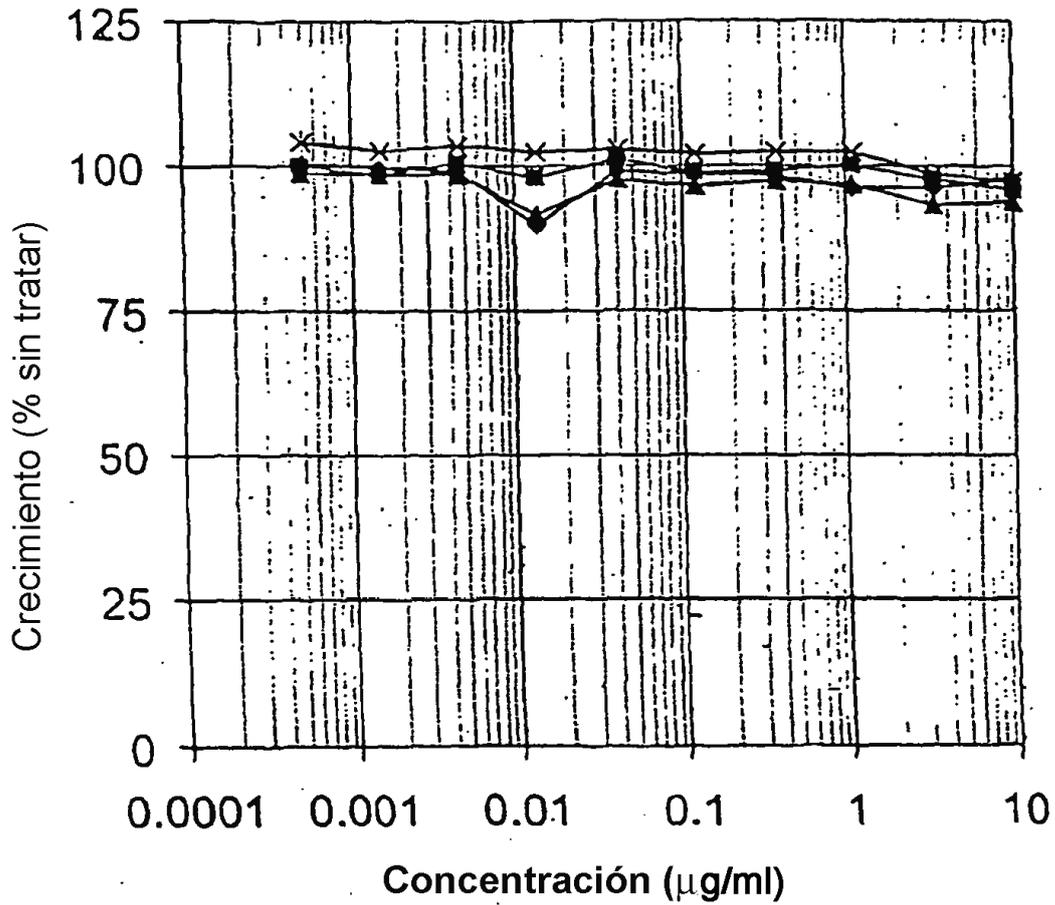


Fig. 3

Citotoxicidad en células H3396
ensayo de 2 horas de exposición
(BR96 Ag +)

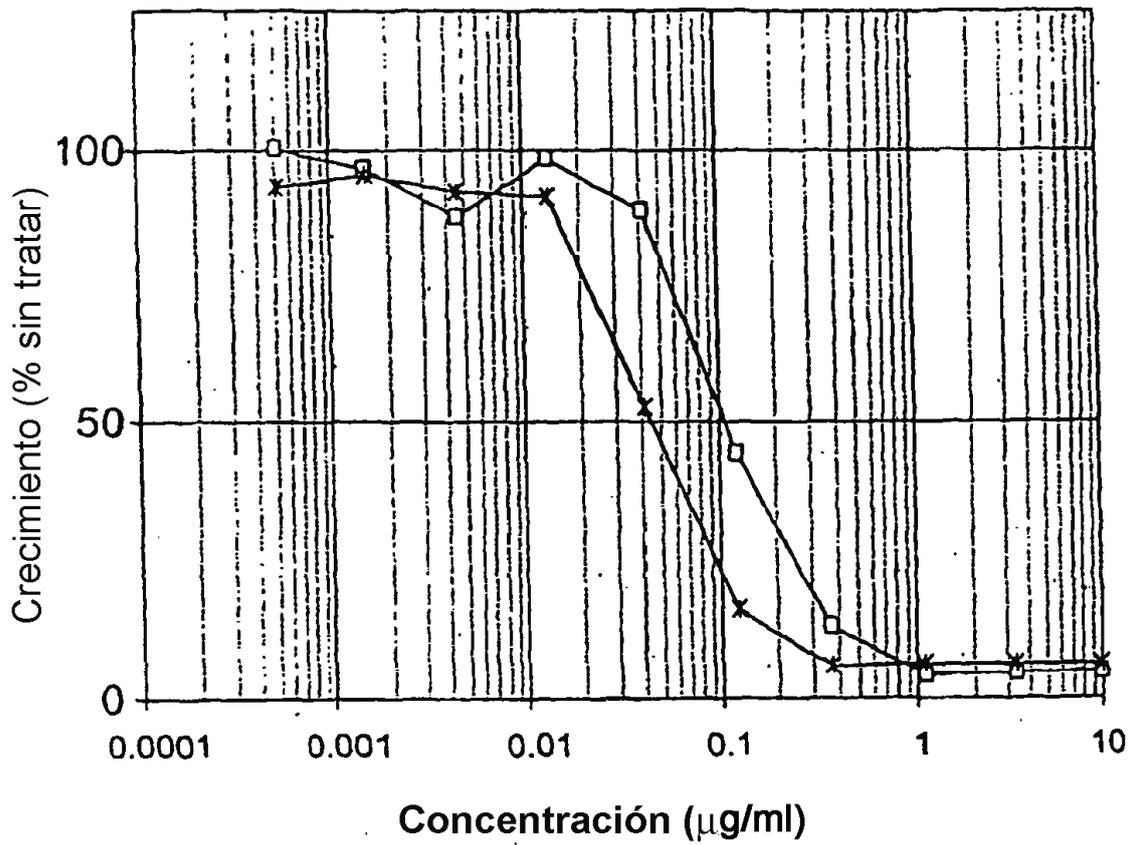


Fig. 4

Citotoxicidad in vitro en células Karpas
exposición de 2 horas del conjugado
(cBR96 Ag -, cAC10 Ag +)

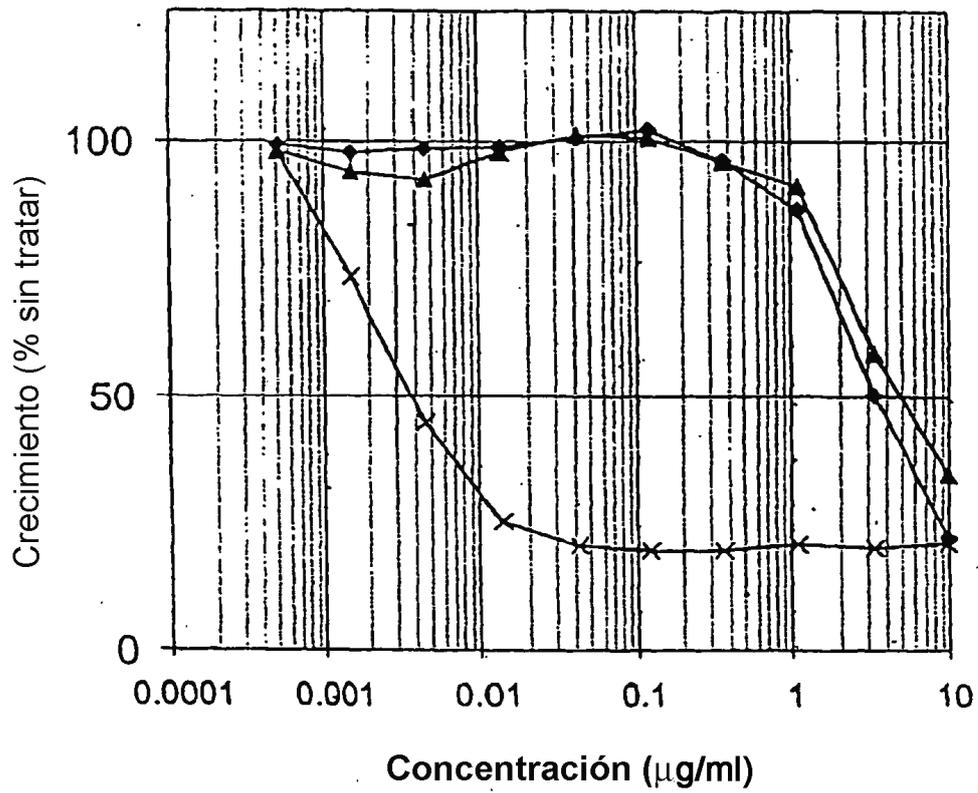


Fig. 5

Citotoxicidad en células H3396 (cBR96 Ag +, cAC10 Ag -)

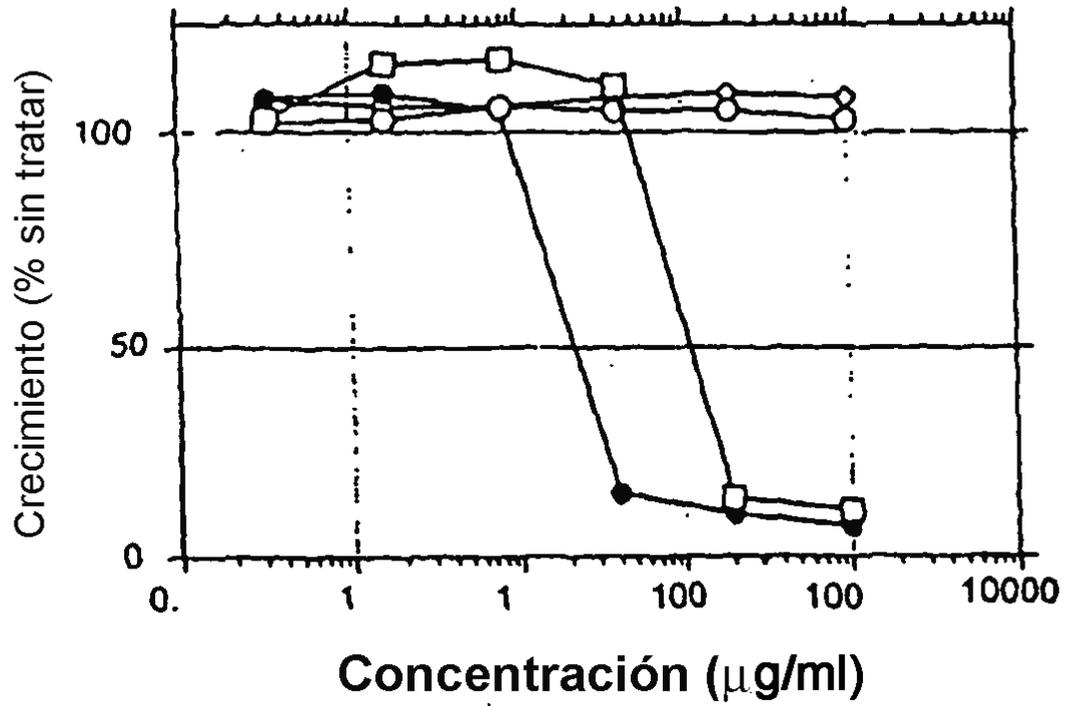


Fig. 6

Terapia in vivo de tumores L2987
(cBR96 Ag +, cAC10 Ag -)

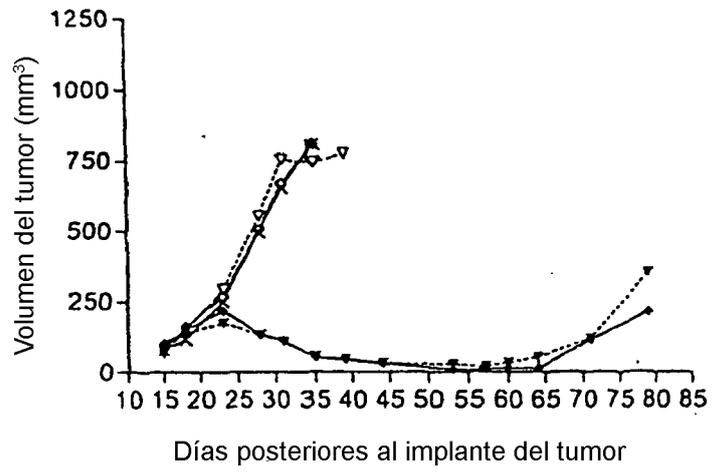


Fig. 7

Terapia in vivo de tumores Karpas
(cAC10 Ag +, cBR96 Ag -)

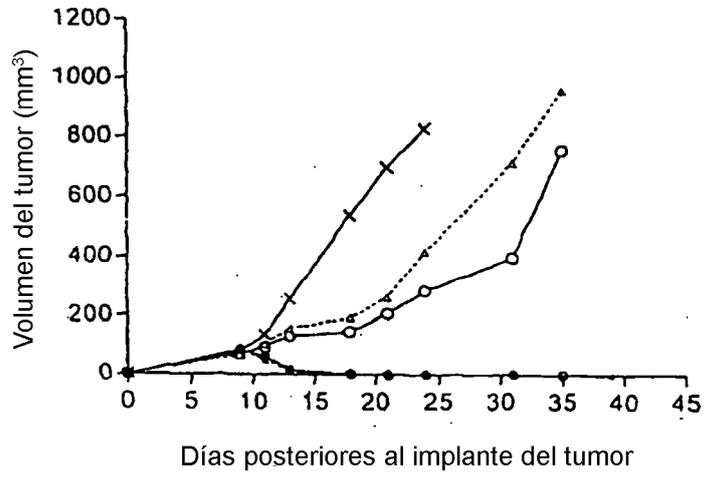


Fig. 8