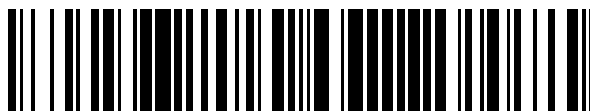


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 927**

51 Int. Cl.:

A61K 47/65 (2007.01)

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 5/02 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2009 E 14182732 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2842575**

54 Título: **Conjugados enlazadores del fármaco auriestatina**

30 Prioridad:

18.03.2008 US 37705 P

11.04.2008 US 44431 P

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

27.12.2017

73 Titular/es:

SEATTLE GENETICS, INC. (100.0%)

21823 30th Drive, S.E.

Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

SENER, PETER;

DORONINA, SVETLANA y

BOVEE, TIMOTHY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 647 927 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 enlazadores del fármaco auriestatina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se dirige a conjugados basados en auriestatina, tales como conjugados de ligandos enlazadores de fármaco y compuestos enlazadores de fármaco, así como a las composiciones que incluyen los mismos, y a los métodos de uso de los mismos para tratar el cáncer, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa y otras patologías. Se describen también en el presente documento métodos para usar dichos conjugados *in vitro*, *in situ*, e *in vivo* para la detección, diagnóstico o tratamiento de células de mamíferos, o afecciones patológicas asociadas.

15 **Antecedente de la invención**

Mucho interés ha rodeado el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) para la administración selectiva de agentes citotóxicos a células tumorales. Aunque que se han probado numerosas clases de fármacos diferentes para su administración mediante anticuerpos, solo unas pocas clases de fármacos han demostrado ser eficaces como conjugados de fármacos con anticuerpos, teniendo al mismo tiempo un perfil de toxicidad adecuado. Una de las mencionadas clases es la de las auriestatinas, derivados del producto natural dolaestatina 10. Las auriestatinas representativas incluyen MMAE (N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-norefedrina) y MMAF (N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-fenilalanina).

La conjugación de fármacos con anticuerpos, tanto directamente como mediante enlazadores, implica la consideración de varios factores, incluyendo la identidad y la localización del grupo químico para la conjugación del fármaco, el mecanismo de liberación del fármaco, los elementos estructurales que proporcionan la liberación del fármaco, y la modificación estructural para el fármaco libre liberado. Además, si el fármaco se va a liberar después de la internalización del anticuerpo, el mecanismo de liberación del fármaco debe ser correspondiente con el tráfico intracelular del conjugado.

MMAF es relativamente no tóxico como fármaco libre, pero tiene una actividad muy potente cuando se conjuga con un mAb y se internaliza. MMAF se ha conjugado correctamente con un mAb en el aminoácido del extremo N de MMAF mediante el enlazador peptídico escindible de la catepsina B maleimidocaproil-valina-citrulina (mc-vc-) y un grupo p-aminobencil-carbamoil (PABC) autodestructivo para producir conjugados anticuerpo-enlazador-fármaco que tienen la siguiente estructura mAb-mc-vc-PABC-MMAF. Tras la escisión del enlazador peptídico, el grupo PABC autodestructivo se separa por sí mismo de MMAF, liberando el fármaco libre.

Se ha descubierto también que MMAF es activo como conjugado enlazador de fármaco no escindible, maleimidocaproil MMAF (mcMMAF). Para mcMMAF, el maleimidocaproil y una cisteína del anticuerpo siguen quedando unidos al extremo N de MMAF.

Sigue existiendo necesidad, sin embargo, de vehículos de administración de fármacos para la liberación selectiva del fármaco a las células.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que los conjugados de fármaco con ligando que comprenden una auriestatina que tiene un grupo carboxilo libre en el extremo C conjugado directamente con un enlazador peptídico mediante un enlace peptídico son activos como agentes de liberación de fármacos *in vitro* e *in vivo*.

En un aspecto, la presente invención, proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables,

en la que L es una unidad de ligando, LU es una unidad enlazadora, y D es una unidad de fármaco;

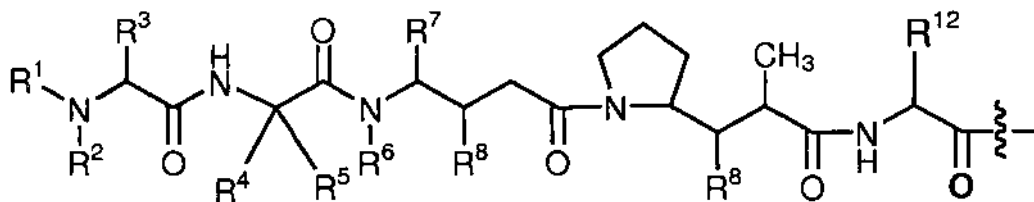
L es un péptido, polipéptido o proteína que se une específicamente a una población de células diana;

LU tiene la fórmula $-A_w-W_w-$,

W_w es una secuencia de w seleccionada independientemente de aminoácidos dirradicales, que comprende un aminoácido natural unido a un aminoácido no natural, en la que el W proximal a la unidad de fármaco (W_1) está unido mediante un enlace peptídico a la unidad de fármaco, , con la condición de que W_1 no pueda formar una amida secundaria con el aminoácido del extremo C de D y que el enlace peptídico pueda escindirse mediante una proteasa intracelular,

w es un número entero comprendido entre 2 y 12,

A es una unidad ensanchadora, y a es 1 o 2;
 p es un número entero de 1 a 20; y
 D tiene la fórmula:



5 en la que la línea ondulada indica el enlace peptídico con LU;

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y alquilo- C_1-C_8 , con la condición de que ambos R^1 y R^2 no sean -H;
 R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , -arilo, alquilarilo C_1-C_8 , $-X^1$ -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo- C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8);
 10 R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , -arilo, $-X^1$ -arilo, alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo- C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8);
 R^5 se selecciona entre el grupo que consiste en -H y metilo;
 o R^4 y R^5 forman conjuntamente un anillo carbocíclico que tiene la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste de -H y alquilo C_1-C_8 y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;
 R^a se selecciona entre el grupo que consiste en -H y alquilo C_1-C_8 ;
 R^7 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , -arilo, $-X^1$ -arilo, $-X^1$ -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8); cada R^8 se selecciona independientemente del grupo que
 20 consiste en H, -OH, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo C_3-C_8 y -O-(alquilo C_1-C_8);
 R^{12} se selecciona entre H, -alquilo C_1-C_8 , arilo, $-X^1$ -arilo, carbociclo C_3-C_8 , $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8), -alquilenos C_1-C_8 , NH_2 , -heterociclo C_3-C_8 , y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8), y cada X_1 es independientemente -alquilenos C_1-C_{10} .

25 En otro aspecto, la invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula:

LU-D

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;

30 en la que LU- es una unidad enlazadora y D es una unidad de fármaco;

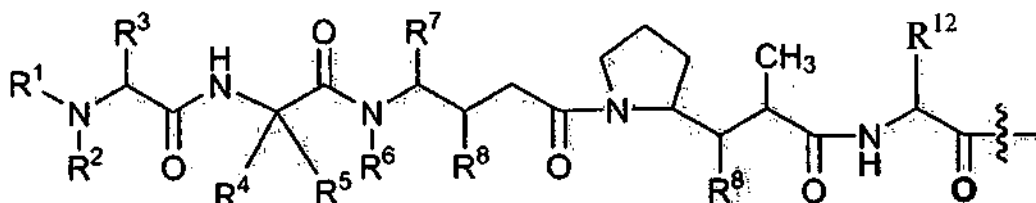
LU tiene la fórmula A_a-W_w- ,

W_w es una secuencia de w aminoácidos dirradicalarios independientemente seleccionados, que comprenden un aminoácido natural unido a un aminoácido no natural, en el que el W proximal a la unidad de fármaco (W_1) está unido mediante un enlace peptídico a la unidad de fármaco, con la condición de que W_1 no puede formar una amida secundaria con el aminoácido del extremo C de D y de que el enlace peptídico puede escindirse mediante una proteasa intracelular, w es un número entero comprendido de 2 a 12,

35 A es una unidad extensora, y

a es 1 o 2; y

D tiene la fórmula:



40 en la que la línea ondulada indica el enlace peptídico a (LU);

R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste H y -alquilo C_1-C_8 ;
 R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en H, -alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, -alquilarilo C_1-C_8 , $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8);
 45 R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en H, -alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , -arilo, $-X^1$ -arilo, $-X^1$ -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo- C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8);
 R^5 se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo;
 o R^4 y R^5 forman conjuntamente un anillo carbocíclico que tiene la fórmula $-(CR^3R^b)_n-$, donde
 R^a y R^b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H y -alquilo C_1-C_8 y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en H y -alquilo C₁-C₈;
 R⁷ se selecciona entre el grupo que consiste en H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, -X¹-arilo,
 -X¹-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);
 cada R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, -OH, -alquilo C₁-C₈, -carbociclo C₃-C₈
 5 y -O-(alquilo C₁-C₈);
 R¹² se selecciona entre H, -alquilo C₁-C₈, arilo, -X¹-arilo, carbociclo C₃-C₈, -X¹-(heterociclo C₃-C₈), -alquileno
 C₁-C₈-NH₂, -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈); y
 cada X¹ es independientemente -alquileno C₁-C₁₀.

10 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, o una de sus sales o solvatos, diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables, comprendiendo la composición farmacéutica opcionalmente además una cantidad eficaz de agente quimioterapéutico seleccionado entre el grupo que consiste de un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa, y un aglutinante de ADN.

15 En otro aspecto, el compuesto de la invención es para su uso en un método de tratamiento, por ejemplo, un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o infecciosa.

Breve descripción de los dibujos

20 La **Figura 1** muestra los datos de la eficacia *in vivo* para los conjugados de Auriestatina F (AF)-Dipéptido-h1F6 en ratones lampiños que soportan tumores subcutáneos 7860 de carcinoma renal. Se administró a los ratones una única dosis ip, tal como se indica en la figura, en el día 14.

25 La **Figura 2** muestra los datos de la eficacia *in vivo* para los conjugados de Auriestatina-Dipéptido-h1F6 en ratones lampiños que soportan tumores subcutáneos 7860 de carcinoma renal. Se administró a los ratones una única dosis ip de los conjugados, tal como se indica en la figura, en el día 12.

30 La **Figura 3** muestra los datos de la eficacia *in vivo* para los conjugados AF-Dipéptido-h1F6 en ratones lampiños que soportan tumores subcutáneos DBTRG05 de glioblastoma MG. Se administró a los ratones una única dosis de 3 mg/kg de los conjugados en el día 16. Se indica el número de respuestas duraderas en cada grupo.

35 La **Figura 4** muestra los datos de la eficacia *in vivo* para los conjugados AF-Dipéptido-cACIO en un modelo Karpas de ratón SCID (subcutáneo). Se administró a los ratones una única dosis de 0,5 mg/kg ip de los conjugados en el día 12. Se indica el número de curaciones para cada grupo.

La **Figura 5** muestra los datos de tolerabilidad para ratones balb/c a los que se administró una única dosis, 50 mg/kg ip, de los conjugados AF-Dipéptido-h1F6. Se usó como control un conjugado h1F6-vc-PABC-MMAF.

40 La **Figura 6** muestra los datos de tolerabilidad para ratones balb/c a los que se administró una única dosis, 75 mg/kg ip, de los conjugados AF-Dipéptido- h1F6 indicados. Se usó como control un conjugado h1F6-vc-PABC-MMAF.

45 La **Figura 7** muestra los datos de tolerabilidad para ratones balb/c a los que se administró una única dosis iv, a la cantidad indicada, de los conjugados AF-Dipéptido- h1F6. Se usó como control un conjugado h1F6-vc-PABC-MMAF.

La **Figura 8** muestra los datos de tolerabilidad en ratones a los que se administró una única dosis de 150 mg/kg de conjugados de Auriestatina-Dipéptido-h1F6.

50 La **Figura 9** muestra los datos de tolerabilidad para ratones a los que se administró una única dosis ip de 150 mg/kg de los conjugados AF-Dipéptido- o AF-Tripéptido-hl F6.

55 La **Figura 10** muestra los datos de la eficacia *in vivo* de un modelo en ratón de carcinoma subcutáneo 7860 de células renales humanas. Se administraron a los ratones conjugados AF-Dipéptido-h1F6 o conjugados de MMAF-Dipéptido-h1F6. Se administró una dosis única de 2 mg/kg ip de un conjugado en el día 12.

60 La **Figura 11** muestra los datos de tolerabilidad para ratones balb/c a los que se administró una única dosis ip de 100 mg/kg de conjugados AF-Dipéptido-h1F6 o conjugados de MMAF-Dipéptido-h1F6.

La **Figura 12** muestra los datos de la eficacia *in vivo* para un modelo de xenoinjerto de ratón lampiño que soporta tumores subcutáneos 7860 de carcinoma renal. Se administró a los ratones una única dosis ip de 2 mg/kg de los conjugados indicados en el día 12.

65 La **Figura 13** muestra los datos de tolerabilidad para ratones balb/c a los que se administró una única dosis ip de 100 mg/kg de los conjugados AF-Asn-(D)Lys, AF- met-(D)Lys-h1F6, AF-Asn-(L)Lys o AF-met-(L)Lys-h1F6.

La **Figura 14** muestra los datos de la eficacia *in vivo* para un modelo de xenoinjerto de ratón lampiño que soporta tumores subcutáneos 7860 de carcinoma renal. Se administró a los ratones una única dosis ip de 2 mg/kg de los conjugados indicados que tenían uno o dos aminoácidos en el enlazador.

5 La **Figura 15** muestra los datos de tolerabilidad para ratones balb/c a los que se administró una única dosis ip de 50 mg/kg de los conjugados de h1F6; el conjugado tiene un aminoácido en el enlazador.

10 La **Figura 16** muestra los datos de la eficacia *in vivo* para ratones SCID que tenían tumores subcutáneos foliculares de xenoinjertos de linfoma de linfocitos B DoHH-2 humano. Se administraron a los ratones múltiples dosis (3 mg/kg (cuatro dosis en cuatro días) ip) de los conjugados Auriestatina-Dipéptido-hBU12. El tratamiento se inició el día 13.

15 La **Figura 17** muestra los datos de la eficacia *in vivo* para ratones SCID que soportan tumores de xenoinjertos subcutáneos de linfoma de Hodgkin L540cy humano. Se administraron a los ratones múltiples dosis (dosis de 1 mg/kg (cuatro dosis en tres días) ip) de los conjugados indicados. El tratamiento se inició el día 12.

Descripción detallada

Definiciones y abreviaturas

20 A menos que se indique lo contrario, se pretende que los siguientes términos y frases que se usan en el presente documento tengan los siguientes significados. Cuando se usan nombres comerciales en el presente documento, el nombre comercial incluye la formulación del producto, el fármaco genérico, y el(los) principio(s) farmacéutico(s) activo(s) del producto de nombre comercial, a no ser que el contexto indique otra cosa.

25 El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo que presentan la actividad biológica deseada. Un anticuerpo intacto tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable se une e interactúa con un antígeno diana. La región variable incluye una región determinante de la complementariedad (CDR) que reconoce y se une a un sitio de unión específico en un antígeno concreto. La región constante se puede reconocer mediante e interactuar con el sistema inmune (*véase, por ejemplo*, Janeway et al., 2001, *Immuno. Biology*, 5ª ed. Garland Publishing, Nueva York). Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo o clase (*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA) o subclase (*por ejemplo*, IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2). El anticuerpo puede derivarse de cualquier especie adecuada. En algunas realizaciones, el anticuerpo es de origen humano o murino. Un anticuerpo puede ser, por ejemplo, humano, humanizado o quimérico.

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

40 El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es *decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y esto no se debe de tomar como una necesidad de preparar el anticuerpo por algún método concreto.

50 El término "anticuerpos monoclonales" incluye anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o de la cadena ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de una especie concreta o que comienzan con una clase o subclase concreta de anticuerpo, mientras que el(los) resto(s) de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homólogas a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como a los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

55 Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (C_L) y dominios constantes de la cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} . según sea adecuado para la clase de anticuerpo. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencias naturales (por ejemplo, dominios constantes de secuencias naturales humanas) o las secuencias variantes de aminoácidos de la misma.

60 Un anticuerpo intacto puede tener una o más "funciones efectoras", lo que se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (por ejemplo, una región Fc de la secuencia natural o una región Fc variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la citotoxicidad dependiente del complemento, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y la fagocitosis

mediada por células dependiente de anticuerpo.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, que comprende preferentemente la región de unión a antígeno o la región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios, scFv, scFv-Fc, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo(s) producido(s) mediante una biblioteca de expresión en Fab, o fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores que se unen inmuno-específicamente a un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de células cancerosas, un antígeno vírico o un antígeno microbiano).

El término "variable" en el contexto de un anticuerpo se refiere a determinadas porciones de los dominios variables del anticuerpo que difieren ampliamente en la secuencia y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto para su antígeno concreto. Esta variabilidad se concentra en tres segmentos denominados "regiones hipervariables" de los dominios variable de la cadena ligera y la cadena pesada. La mayoría de porciones muy conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprende cuatro FR conectados mediante tres regiones hipervariables.

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

Un fragmento de anticuerpo "Fv de cadena única" o "scFv" comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Normalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv para formar la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpo" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica. Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen los diacuerpos más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 0 404 097 A2, WO 93/11161, y en Hollinger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, de roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) para las que los restos de una región hipervariable del receptor están sustituidos por los restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. Por lo general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., 1986, Nature 321:522-525 Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329 y Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596,

Como se usa en el presente documento, "aislado" significa separado de otros componentes de (a) una fuente natural, tal como una célula vegetal o una célula animal o cultivo de células, o (b) una reacción mixta de química orgánica sintética. Como se usa en el presente documento, "purificado" significa que cuando se aísla, el aislado contiene al menos un 95 %, y en otro aspecto al menos un 98 %, de un compuesto (*por ejemplo*, un conjugado) en peso del aislado.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los

usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido o anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso del anticuerpo tal como se determina mediante el método de Lowry, y lo más preferible más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos en el extremo N o la secuencia interna de aminoácidos mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes debido a que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. De forma habitual, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo que "induce la apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada tal como se determina mediante la unión de la anexina V, la fragmentación del ADN, el acortamiento celular, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular, y/o la formación de vesículas membranosas (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es una célula tumoral, *por ejemplo*, una célula de mama, de ovario, estómago, endometrial, glándula salival, de pulmón, riñón, colon, tiroides, de páncreas o de vejiga. Están disponibles diversos métodos para evaluar los acontecimientos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la translocación de la fosfatidil serina (PS) mediante la unión de la anexina; se puede evaluar la fragmentación del ADN mediante el escalonamiento del ADN; y se puede evaluar la condensación de la cromatina nuclear junto con la fragmentación del ADN mediante cualquier aumento en las células hipodiploides.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (*es decir*, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (*es decir*, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia, por ejemplo, puede medirse evaluando el tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o mediante la determinación de la tasa de respuesta (RR).

La expresión "cantidad sustancial" se refiere a una mayoría, *es decir* >50 % de una población, de una mezcla o una muestra.

El término "metabolito intracelular" se refiere a un compuesto resultante de un proceso o reacción metabólica en el interior de una célula que se lleva a cabo sobre un conjugado de ligando enlazador de fármacos (*por ejemplo*, un conjugado fármaco-anticuerpo (ADC)). El proceso o reacción metabólica puede ser un proceso enzimático tal como una escisión proteolítica de un enlazador peptídico del ADC. Los metabolitos intracelulares incluyen, pero sin limitación, anticuerpos y fármacos libres que han experimentado una escisión intracelular tras la entrada, difusión, captación o transporte en una célula.

Los términos "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso metabólico o reacción en el interior de una célula sobre un conjugado del ligando enlazador de fármacos (*por ejemplo*, un conjugado fármaco-anticuerpo (ADC) o similar), por lo cual, el enlace covalente, *por ejemplo*, el enlazador, entre el resto de fármaco (D) y la unidad de ligando (*por ejemplo*, un anticuerpo (Ab)) se rompe, dando como resultado el fármaco libre, u otro metabolito del conjugado disociado del anticuerpo en el interior de la célula. Los restos escindidos del conjugado de ligando enlazador de fármacos son, por tanto, metabolitos intracelulares.

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

El término "actividad citotóxica" se refiere la destrucción de células, un efecto citostático o antiproliferativo de un conjugado de ligando enlazador de fármacos o un metabolito intracelular de un conjugado de un ligando enlazador de fármacos. La actividad citotóxica se puede expresar como el valor de la CI_{50} , que es la concentración (molar o másica) por unidad de volumen unitario a la cual sobrevive la mitad de las células.

El término "agente citotóxico" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o produce la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya los isótopos radioactivos (por ejemplo, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{60}Co , y los isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo los análogos sintéticos y sus derivados. En un aspecto, el término no incluye el(los) isótopo(s) radioactivo(s).

Un "trastorno" es cualquier dolencia que se beneficiaría del tratamiento con un conjugado de ligando enlazador de fármacos. Esto incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades que incluyen aquellas dolencias patológicas que

predisponen a un mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen cánceres benignos y malignos, leucemia y neoplasias malignas, trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

5 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la dolencia o trastorno fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

10 Una "enfermedad autoinmune" en el presente documento es una enfermedad o trastorno que surge de y se dirige contra los propios tejidos de un individuo o un segregado simultáneo o manifestación del mismo o dolencia resultante del anterior.

15 Los ejemplos de un "paciente" incluyen, pero sin limitación, un ser humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdos, cabras, vacas, caballo, perros, gatos, pájaros y aves. En una realización ilustrativa, el paciente es un ser humano.

20 Los términos "tratar" o "tratamiento", a no ser que el contexto indique otra cosa, se refieren a un tratamiento terapéutico y a las medidas profilácticas para evitar la recidiva, donde el objetivo es inhibir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, como el desarrollo o proliferación del cáncer. Para los fines de la presente invención, los beneficios o resultados clínicos deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de síntomas, disminución de la extensión de una enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización en la evolución de la enfermedad, mejora o alivio de la patología, y remisión (tanto total o parcial), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también significa prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibiera tratamiento. Los que necesitan el tratamiento incluyen los que ya padecen la enfermedad o afección y también los que muestran propensión a tener la enfermedad o afección.

25 En el contexto del cáncer, el término "que trata" incluye cualquiera o todo de: inhibir el crecimiento de células tumorales, células cancerosas, o de un tumor; inhibir la replicación de las células tumorales o las células cancerosas, disminuir la carga tumoral total o disminuir el número de células cancerosas, y mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

30 En el contexto de una enfermedad autoinmune, el término "que trata" incluye cualquiera o todo de: inhibir la replicación de las células asociada con una patología autoinmune que incluye, pero sin limitación, las células que producen un anticuerpo autoinmune, disminuir la carga de anticuerpo autoinmune y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.

35 En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término "que trata" incluye cualquiera o todo de: inhibir el crecimiento, la multiplicación o la replicación del patógeno que produce la enfermedad infecciosa y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa.

40 El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre la(s) indicación(es), uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

45 Un polipéptido de "secuencia natural" es aquel que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido, *por ejemplo*, un receptor de antígeno asociado a tumor, derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos de secuencia natural se pueden aislar de la naturaleza o se puede producir por medios recombinantes o sintéticos. De esta manera, un polipéptido de secuencia natural puede tener la secuencia de aminoácidos de un polipéptido humano que se produce naturalmente, un polipéptido de murino, o un polipéptido procedente de cualquier especie de mamífero.

50 Una molécula de ácido nucleico "aislado" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa a partir de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante a la cual está asociada de manera ordinaria en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislado es diferente en la forma o configuración de la que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácidos nucleicos aislados se distinguen por tanto de la molécula de ácido nucleico en que ésta existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente contienen la molécula de ácido nucleico en la que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

60 La expresión "secuencias control" se refiere a las secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida de manera operativa en un organismo hospedador concreto. Las secuencias control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

65 Un ácido nucleico está "unido de manera operativa" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o un líder secretor está unido de manera operativa con el

ADN que codifica un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de manera operativa a una secuencia de codificación, por ejemplo, si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido de manera operativa a una secuencia de codificación si se sitúa de tal manera que facilita la traducción. En general, "unido de manera operativa" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y, en el caso del líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no han de ser contiguos. La unión se puede llevar a cabo mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se pueden utilizar adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa en el presente documento, los términos "célula", "línea celular", y "cultivo de células" se usan de manera indistinta y todas las mencionadas designaciones incluyen la progenie. Las palabras "transformantes" y "células transformadas", incluyen la célula primaria sujeto y los cultivos o la progenie derivada de los anteriores sin tener en cuenta el número de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada para la célula originalmente transformada. Cuando es prevean designaciones distintas, esto será evidente según el contexto.

Salvo que se indique de otra forma, el término "alquilo" por sí mismo o como parte de otro término se refiere a un hidrocarburo saturado o insaturado de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido, que tiene el número indicado de átomos de carbono (*por ejemplo*, "-alquilo C₁-C₈" o "-alquilo C₁-C₁₀", se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 o de 1 a 10 átomos de carbono, "alquilo C₁-C₈" y "alquilo C₁-C₁₀" se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 o de 1 a 10 átomos de carbono, respectivamente). Cuando el número de átomos de carbono no está indicado, el grupo alquilo utilizado tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos "-alquilo C₁-C₈" de cadena lineal representativos incluyen, pero sin limitación, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo y -n-octilo; Los ejemplos representativos de -alquilos C₁-C₈ ramificados incluyen, pero sin limitación, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, y -2-metilbutilo; los alquilos C₂-C₈ insaturados incluyen, pero sin limitación, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, -1-hexilo, -2-hexilo, -3-hexilo, -acetilenilo, propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo y -3-metil-1 butinilo. En algunas realizaciones, un grupo alquilo está no sustituido. En otras realizaciones, un grupo alquilo está sustituido con uno o más grupos. Los sustituyentes preferidos incluyen: -O-(alquilo C₁-C₈), arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -OH, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -SR', -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₈ no sustituido y arilo. Los sustituyentes particularmente preferidos incluyen: -OH, -SCH₃, -CONH₂, -COOH, -NHC(=NH)NH₂, -NH₂, NHC(O)CH₃, -NHCHO, y -NHCONH₂.

"Alquenilo" se refiere a un hidrocarburo C₂-C₁₈ sustituido o no sustituido que contiene átomos de carbono normales, secundarios o terciarios con al menos un sitio de insaturación, es decir, un doble enlace carbono-carbono, *sp*². Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: etileno o vinilo (-CH=CH₂), alilo (-CH₂CH=CH₂), ciclopentenilo (-C₅H₇), y 5-hexenilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH=CH₂).

"Alquinilo" se refiere a un hidrocarburo C₂-C₁₈ sustituido o no sustituido que contiene átomos de carbono normales, secundarios, o terciarios con al menos un sitio de insaturación, es decir, un triple enlace carbono-carbono *sp*. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: acetilénico (-C≡CH) y propargilo (-CH₂C≡CH).

Salvo que se indique de otra forma, "alquileno", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un radical hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada, o cíclico, del número indicado de átomos de carbono, normalmente de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos diferentes átomos de carbono de un alcano progenitor. Los radicales alquileno típicos incluyen, pero no se limitan a: metileno (-CH₂-), 1,2-etilo (-CH₂CH₂-), 1,3-propilo (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-butilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), y similares. Un "alquileno C₁-C₁₀" es un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal, de fórmula -(CH₂)₁₋₁₀-. Los ejemplos de alquileno -C₁-C₁₀- incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

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

"Alquinileno" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos diferentes átomos de carbono de un alquino progenitor. Los radicales alquinileno típicos incluyen, pero no se limitan a: acetileno (-C≡C-), propargil (-CH₂C≡C-), y 4-pentinil (-CH₂CH₂CH₂C≡CH-).

Salvo que se indique de otra forma, "arilo", por sí mismo o como parte de otro término, significa un radical hidrocarburo aromático carbocíclico monovalente sustituido o no sustituido de 6-20 átomos de carbono derivado mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno procedente de un único átomo de carbono de un sistema de anillo aromático

progenitor. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen, pero sin limitación, radicales derivados de benceno, bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenilo, y similares. Se puede sustituir un grupo aromático carbocíclico sustituido (por ejemplo, un grupo arilo) con uno o más preferiblemente de 1 a 5, de los siguientes grupos: -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -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 entre -H, alquilo C₁-C₈ y arilo no sustituido. En algunas realizaciones, un grupo aromático carbocíclico sustituido puede incluir además uno o más de: -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(O)₂R' y -SR'.

"Alquilo sustituido" y "arilo sustituido" significan alquilo y arilo, respectivamente, en el que uno o más átomos de hidrógeno se sustituyen, cada uno independientemente, con un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, pero sin limitación, -X, -R, -O-, -OR, -SR, -S', -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -NRC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -AsO₂H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, o -C(=NR)NR₂, en el que cada X es independientemente un halógeno: -F, -Cl, -Br, o -I; y cada R es independientemente -H, alquilo C₁-C₂₀, arilo C₆-C₂₀, heterociclo C₃-C₁₄, un grupo protector o un resto profármaco. Los grupos alquilenos, alquilenos, y alquilenos tal como se han descrito anteriormente también se pueden sustituir de forma similar.

Salvo que se indique de otra forma, un "heterociclo C₃-C₈," por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un sistema de anillo monocíclico o bicíclico aromático o no aromático sustituido o no sustituido que tiene de 3 a 8 átomos de carbono (denominados también miembros del anillo) y uno a cuatro heteroátomos miembros del anillo seleccionados independientemente entre N, O, P o S, y derivados mediante la eliminación de un átomo de hidrógeno procedente de un átomo del anillo de un sistema de un anillo progenitor. Uno o más átomos N, C o S en el heterociclo se pueden oxidar. El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. A menos que se indique lo contrario, el heterociclo se une a su grupo pendiente a cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable.

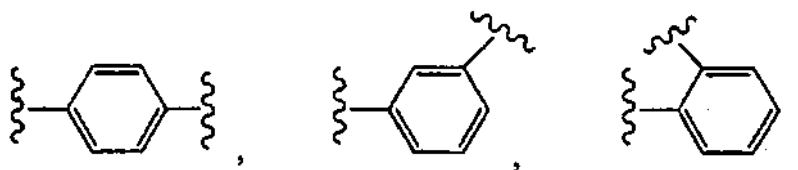
Los ejemplos representativos de un heterociclo C₃-C₈ incluyen, pero sin limitación, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, pirrolilo, tiofenilo (tiofeno), furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. un heterociclo C₃-C₈ puede estar sustituido con hasta siete grupos que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), 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 entre -H, alquilo C₁-C₈ y arilo; En algunas realizaciones, un heterociclo sustituido puede incluir también uno o más de: -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(O)₂R' y -SR'.

Salvo que se indique de otra forma, un "heterociclo C₃-C₈," por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un grupo heterociclo C₃-C₈ definido anteriormente donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo se sustituye con un enlace. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sustituido o no sustituido con hasta seis grupos que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), 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 entre -H, alquilo C₁-C₈ y arilo; En algunas realizaciones, un heterociclo sustituido puede incluir también uno o más de: -NHC(=NH)NH₂, -NHCONH₂, -S(O)₂R' y -SR'.

Salvo que se indique de otra forma, un "carbociclo C₃-C₈," por sí mismo o como parte de otro término, es un anillo carbocíclico, monocíclico o bicíclico no aromático monovalente de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros. sustituido o no sustituido, saturado o insaturado derivado por la eliminación de un átomo de hidrógeno procedente de un átomo del anillo de un sistema de anillo progenitor. Los carbociclos C₃-C₈ representativos incluyen, pero sin limitación, -ciclopropilo, -ciclobutilo; -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo, y -ciclooctadienilo. Un grupo "carbociclo C₃-C₈" puede estar sustituido o no sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), 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 entre -H, alquilo C₁-C₈ y arilo;

Salvo que se indique de otra forma, un "carbociclo C₃-C₈," por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un grupo carbociclo C₃-C₈ definido anteriormente donde otro de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo se sustituye con un enlace.

Salvo que se indique de otra forma, un "arileno", por sí mismo o como parte de otro término, es un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones orto, meta, o para tal como se muestra en las siguientes estructuras, con fenilo como grupo ilustrativo:



El grupo arileno puede estar sustituido o no sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), 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 entre -H, alquilo C₁-C₈ y arilo;

Salvo que se indique de otra forma, El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otros términos significa, salvo que se indique de otra forma, un hidrocarburo estable de cadena lineal o ramificada, o una de sus combinaciones, completamente saturado o que contiene de 1 a 3 grados de insaturación. que consiste en el número indicado de átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en O, N, Si y S, y donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El heteroátomo o heteroátomos O, N y S pueden estar colocados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. El heteroátomo Si puede estar colocado en cualquier posición del grupo heteroalquilo, incluyendo la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₃-CH₃, -NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-O-CH₃, y -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. Salvo que se indique de otra forma, el término "heteroalquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un grupo divalente derivado de heteroalquilo (tal como se ha descrito anteriormente), tal como se ilustra por -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para grupos heteroalquileno, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera, o ambos, de los extremos de la cadena. Aún más adicionalmente, para los grupos enlazadores de alquileno y heteroalquileno, esto implica la falta de orientación del grupo enlazador.

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superposición del compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que pueden superponerse sobre sus compañeros de imagen especular.

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

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

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

Un "derivado" de aminoácido incluye un aminoácido que tiene sustituciones o modificaciones por enlace covalente de un aminoácido progenitor, como, por ejemplo, mediante alquilación, glicosilación, acetilación, fosforilación, y similares. Incluido además en la definición de "derivado" están, por ejemplo, uno o más análogos, de un aminoácido con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

Un "aminoácido natural" se refiere a arginina, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptófano, lisina, glicina, alanina, histidina, serina, prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, treonina, cisteína, metionina, leucina, asparagina, isoleucina, y valina, a no ser que el contexto indique otra cosa.

"Grupo protector" se refiere a un resto que cuando se une a un grupo reactivo en una molécula enmascara, reduce o

- evita esta reactividad. Se pueden encontrar ejemplos de grupos protectores en T.W. Green y P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 1999, y Harrison y Harrison et al., Compendium of Synthetic Organic Methods, Volúmenes 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996). Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen grupos acilo, éteres de bencilo y tritilo, éteres de tetrahidropirano, éteres de triisopropilsililo y alilo. Los grupos protectores de amino representativos incluyen, grupos formilo, acetilo, trifluoroacetilo, bencilo, benciloxicarbonilo (CBZ), terc-butoxicarbonilo (Boc), trimetilsililo (TMS), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (SES), tritilo y tritilo sustituido, aliloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (FMOC), nitro-veratriloxicarbonilo (NVOC), y similares.
- Los ejemplos de "grupo protector de hidroxilo" incluyen, pero sin limitación, metoximetil éter, 2-metoxietoximetil éter, éteres de tetrahidropirano, éter de bencilo, éter de p-metoxibencilo, éter de trimetilsililo, éter de trietilsililo, éter de triisopropilsililo, éter de t-butildimetilsililo, éter de trifenilmetilsililo, éster de acetato, ésteres de acetato sustituidos, pivalato, benzoato, metanosulfonato y p-toluensulfonato.
- "Grupo saliente" se refiere a un grupo funcional que puede estar sustituido por otro grupo funcional. Dichos grupos salientes son bien conocidos en la materia, y los ejemplos incluyen, pero sin limitación, un haluro (*por ejemplo*, cloruro, bromuro, yoduro), metanosulfonilo (mesilo), p-toluensulfonilo (tosilo), trifluorometilsulfonilo (triflato), y trifluorometilsulfonato.
- La frase "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto (*por ejemplo*, un fármaco, un compuesto enlazador de fármaco, o un conjugado del ligando enlazador de fármacos). El compuesto contiene normalmente al menos un grupo amino, y de acuerdo con ello, las sales de adición de ácido se pueden formar con este grupo amino. Las sales ilustrativas incluyen, pero sin limitación, 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, gentsinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato, y pamoato (*es decir*, sales de 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxil-3-naftoato)) Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga del compuesto progenitor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. De este modo, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/ uno o más contraiones.
- "Solvato farmacéuticamente aceptable" o "solvato" se refiere a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la invención, *por ejemplo*, un conjugado de ligandos enlazadores de fármacos y compuestos enlazadores de fármacos. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético, y etanolamina.
- Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: Boc es N-(t-butoxicarbonilo), cit es citrulina, dap es dolaproína, DCM es diclorometano, DIEA es N,N-diisopropiletilamina, dil es dolaisoleucina, 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 ditiotreitolo, Fmoc es N-(9-fluorenil-metoxicarbonilo), gly es glicina, HATU es hexafluorofosfato de 0-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, HBTU es hexafluorofosfato de 2-[1H-benzotriazol-1-il]-1,1,3,3-tetrametilamino; HOBt es 1-hidroxibenzotriazol, HPLC es cromatografía líquida de alta presión, ile es isoleucina, lys es lisina, MeOH es metanol, MeVal es N-metil-valina, PAB es p-aminobencilol, PBS es solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4), Ph es fenilo, phe es L-fenilalanina, PyBrop es hexafluorofosfato de bromo tris-pirrolidino fosfonio, TFA es ácido trifluoroacético, UV es ultravioleta, y val es valina.
- Las siguientes abreviaturas de enlazadores se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: Val Cit o vc es un sitio dipéptido de valina-citrulina en el enlazador de la proteasa escindible; PABC es p-aminobencilcarbamoilo; (Me)vc es N-metil-valina-citrulina, en el que el enlace peptídico del enlazador se ha modificado para evitar su escisión por la cathepsina B; y MC(PEG)₆-OH es maleimidocaproil-poli-etilenglicol.
- Las siguientes abreviaturas de fármacos citotóxicos se usan en el presente documento y tienen las definiciones indicadas: "Auriestatina F" o "AF" es N,N-dimetilvalina-valina-dolaisoleucina(dil)-dolaproína(dap)-fenilalanina. "MMAF" es N-metilvalina-valina-dolaisoleucina(dil)-dolaproína(dap)-fenilalanina (PM 731,5).

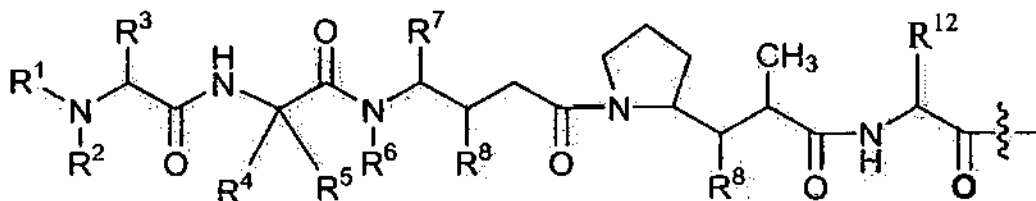
60 **Compuestos y conjugados**

Se describe en el presente documento una serie de compuestos y conjugados que contienen un resto de fármaco (D) unido mediante su extremo C a una unidad enlazadora. La unidad enlazadora puede actuar para proporcionar una liberación adecuada de D.

65 Por ejemplo, se describen en el presente documento compuestos enlazadores de fármacos que tienen la Fórmula I:

LU-D (I)

o una sal o solvato del mismo farmacéuticamente aceptable donde D tiene la fórmula:



5 en la que la línea ondulada indica la unión a la unidad enlazadora (LU);

cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C₁-C₈, con la condición de que ambos R¹ y R² no sean -H;

10 R³ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, -X¹-arilo, -X¹-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, -X¹-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

R⁵ se selecciona entre el grupo que consiste en -H y metilo;

15 o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico que tiene la fórmula -(CR^aR^b)_n- donde R^a y R^b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C₁-C₈ y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en -H y alquilo C₁-C₈;

20 R⁷ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, -X¹-arilo, -X¹-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

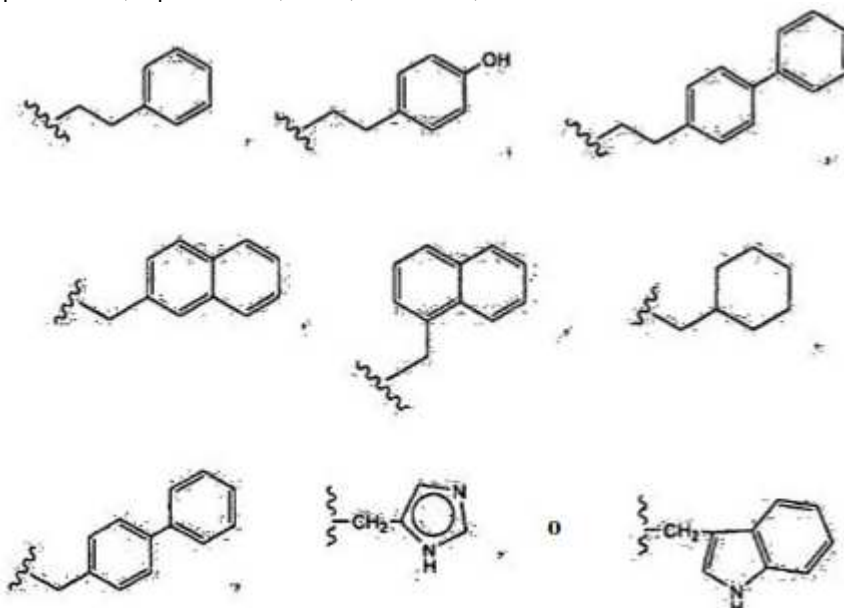
cada R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, -OH, -alquilo C₁-C₈, -carbociclo C₃-C₈ y -O-(alquilo C₁-C₈);

cada X¹ es independientemente -alquileno C₁-C₁₀; y

25 R¹² se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, arilo, -X¹-arilo, carbociclo C₃-C₈, -X¹-(heterociclo C₃-C₈), -alquileno C₁-C₈-NH₂, -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈); o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables,

En algunos compuestos, R¹² se selecciona entre el grupo que consiste en cadenas secundarias de aminoácidos naturales y no naturales.

30 En algunos compuestos, R¹² se selecciona entre el grupo que consiste en H, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetilo, 3-piridilmetilo, 4-piridilmetilo, fenilo, ciclohexilo,



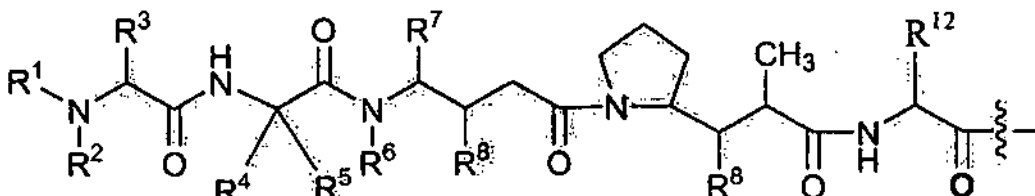
35

En algunos compuestos, R¹² se selecciona entre el grupo que consiste en cadenas secundarias de aminoácidos naturales. En algunos compuestos, R¹² es la cadena secundaria de fenilalanina. En algunos compuestos, R¹² es la cadena secundaria de metionina. En algunos compuestos, R¹² es la cadena secundaria de triptófano.

5 Se describen también en el presente documento compuestos enlazadores de fármacos que tienen la Fórmula I:

LU-D (I)

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables; donde D tiene la fórmula:



10

en la que la línea ondulada indica la unión a la unidad enlazadora (LU);

cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C₁-C₈, con la condición de que ambos R¹ y R² no sean -H;

15

R³ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilarilo C₁-C₈, -X¹-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, -X¹-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

20

R⁵ se selecciona entre el grupo que consiste en -H y metilo;

o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico que tiene la fórmula -(CR^aR^b)_n- donde

R^a y R^b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C₁-C₈ y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en -H y alquilo C₁-C₈;

25

R⁷ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, -X¹-arilo, -X¹-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

cada R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, -OH, -alquilo C₁-C₈, -carbociclo C₃-C₈ y -O-(alquilo C₁-C₈);

R¹² se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, arilo, -X¹-arilo, carbociclo C₃-C₈, -X¹-(heterociclo C₃-C₈), -alquileno C₁-C₈-NH₂, -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈); y

30

cada X¹ es independientemente -alquileno C₁-C₁₀;

el resto LU es una unidad enlazadora que tiene la fórmula -W_w-A_a;

W_w es una secuencia de w seleccionada independientemente de aminoácidos dirradicales, w es un número entero comprendido entre 1 y 12;

35

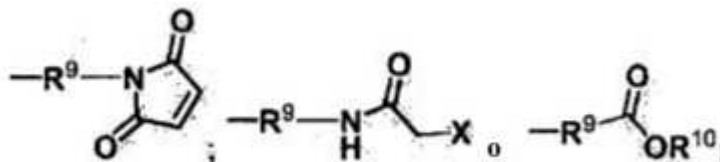
A es una unidad ensanchadora, y a es 1 o 2;

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables,

En algunos compuestos, R¹² es una cadena secundaria de un aminoácido natural. En algunos compuestos, R¹² es la cadena secundaria de fenilalanina. En algunos compuestos, R¹² es la cadena secundaria de metionina. En algunos compuestos, R¹² es la cadena secundaria de triptófano.

40

En algunos conjugados, la unidad ensanchadora A es -NH-R⁹-R¹¹ o -O-R⁹-R¹¹, donde -R⁹-R¹¹ tiene la fórmula:



45

en la que R⁹ se puede seleccionar entre el grupo que consiste en alquileno C₁-C₁₀, -carbociclo C₃-C₈, -arileno-, -heteroarileno C₁-C₃₀, -heterociclo C₃-C₈, -alquileno-arileno C₁-C₁₀, -arileno-C₁-C₁₀ alquileno-, -alquileno C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileno C₁-C₁₀, -alquileno C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, y -(heterociclo C₃-C₈)-alquileno C₁-C₁₀-,

donde X es un grupo saliente; y

cada R¹⁰ forma un éster activado, en la que R¹⁰ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en

50

H, -alquilo C₁-C₁₀, carbociclo C₃-C₈, -arilo, -heteroarileno C₁-C₃₀, -heterociclo C₃-C₈, -alquileno-C₁-C₁₀-arilo, -arileno-alquilo-C₁-C₁₀, -alquileno C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈), -(carbociclo C₃-C₈)-alquileno C₁-C₁₀-, -alquileno C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, y -(heterociclo C₃-C₈)-alquilo C₁-C₁₀.

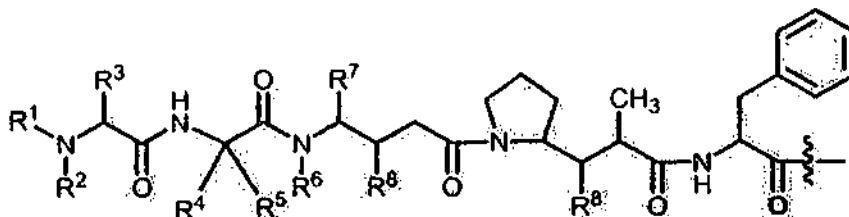
En algunos ejemplos de las unidades ensanchadoras A, -NH-R⁹- se selecciona entre -NH-alquileo C₁-C₁₀-, -NH-alquileo C₁-C₁₀-NH-alquileo C(O)-C₁-C₁₀-, -NH-alquileo C₁-C₁₀-C(O)-NH-alquileo C₁-C₁₀-, -NH-(CH₂CH₂O)_r-, -NH-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -NH-(CH₂CH₂NH)_r-(CH₂)_r-, -NH-(CH₂CH₂NH)_r-(CH₂)_r-NH-C(O)-(CH₂)_r-, -NH-(carbociclo C₃-C₈)-, -NH-(arileno)-, y -NH-(heterociclo C₃-C₈)-, donde cada r es independientemente 1-10.

En algunos ejemplos de las unidades ensanchadoras A, -O-R⁹- se selecciona entre -O-alquileo C₁-C₁₀-, -O-alquileo C₁-C₁₀-NH-C(O)-alquileo C₁-C₁₀-, -O-alquileo C₁-C₁₀-C(O)-NH-alquileo C₁-C₁₀-, -O-(CH₂CH₂O)_r-, O-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -O-(carbociclo C₃-C₈)-, -O-(arileno)-, y -O-(heterociclo C₃-C₈)-, donde cada r es independientemente 1-10.

Opcionalmente, cuando la unidad ensanchadora A es -O-R⁹-R¹¹-, el éster es un éster impedido.

En algunos ejemplos, R⁹ es una poliamina.

En algunos ejemplos, D tiene la fórmula:

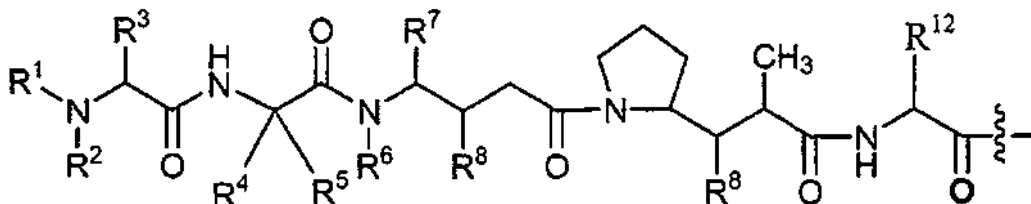


en la que R¹-R⁸ son tal como se ha definido anteriormente.

También se describen en el presente documento conjugados de ligandos enlazadores de fármacos en los que los compuestos enlazadores de fármacos comprenden además una unidad de ligando (L), teniendo los conjugados la fórmula (II):



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables; donde D tiene la fórmula:



en la que la línea ondulada indica la unión a la unidad enlazadora (LU);

R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y alquilo-C₁-C₈, con la condición de que ambos R¹ y R² no sean -H;

R³ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, alquilarilo C₁-C₈, -X¹-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, -X¹-arilo, alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

R⁵ se selecciona entre el grupo que consiste en -H y metilo;

o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico que tiene la fórmula -(CR^aR^b)_n- donde R^a y R^b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C₁-C₈ y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en -H y alquilo C₁-C₈;

R⁷ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, -X¹-arilo, -X¹-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

cada R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, -OH, -alquilo C₁-C₈, -carbociclo C₃-C₈ y -O-(alquilo C₁-C₈);

cada X¹ es independientemente -alquileo C₁-C₁₀;

R¹² se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, arilo, -X¹-arilo, carbociclo C₃-C₈, -X¹-(heterociclo C₃-C₈), -alquileo C₁-C₈-NH₂, -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈); el resto LU es una unidad enlazadora que tiene la fórmula -W_w-A_a;

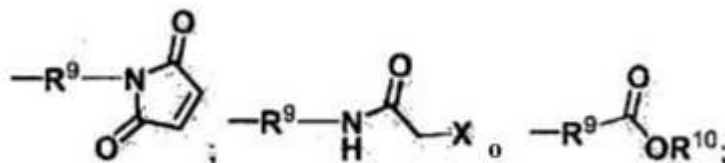
W_w es una secuencia de w seleccionada independientemente de aminoácidos dirradicales, w es un número entero comprendido entre 1 y 12;

A es una unidad ensanchadora, a es 1 o 2; y

p es un número entero de 1 a 20;

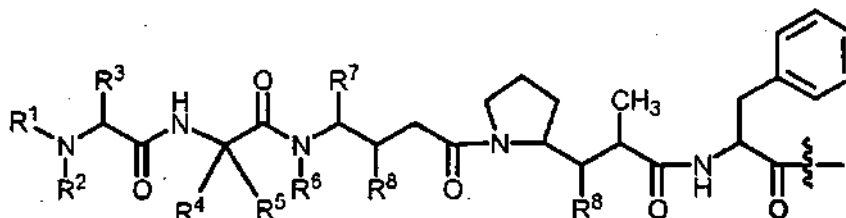
o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables,

En algunos ejemplos, la unidad ensanchadora A es $-\text{NH}-\text{R}^9-\text{R}^{11}$ o $-\text{O}-\text{R}^9-\text{R}^{11}$, donde $-\text{R}^9-\text{R}^{11}$ tiene la fórmula:



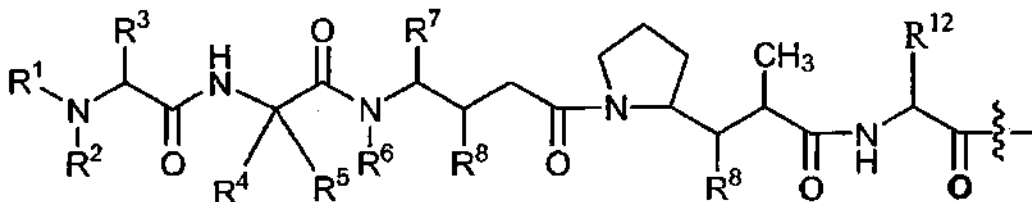
- 5 en la que R^9 se puede seleccionar entre el grupo que consiste en alquileo C_1-C_{10} , -carbociclo C_3-C_8 , -arileno-, -heteroalquileo C_1-C_{30} , -heterociclo C_3-C_8 , -alquileo-arileno C_1-C_{10} , -arileno- C_1-C_{10} alquileo-, -alquileo C_1-C_{10} -(C_3-C_8 carbociclo)-, -(carbociclo C_3-C_8)-alquileo C_1-C_{10} -, -alquileo C_1-C_{10} -(heterociclo C_3-C_8)-, y -(heterociclo C_3-C_8)-alquileo C_1-C_{10} -, donde X es un grupo saliente; y
- 10 cada R^{10} forma un éster activado, en la que R^{10} se selecciona independiente entre el grupo que consiste en H, -alquilo C_1-C_{10} , carbociclo C_3-C_8 , arilo, -heteroalquilo C_1-C_{30} , -heterociclo C_3-C_8 , -alquileo-arilo C_1-C_{10} , -arileno-alquilo- C_1-C_{10} -, -alquileo C_1-C_{10} -(carbociclo C_3-C_8)-, -(carbociclo C_3-C_8)-alquileo C_1-C_{10} -, -alquileo C_1-C_{10} -(heterociclo C_3-C_8)-, y -(carbociclo C_3-C_8)-alquilo C_1-C_{10} -,
- 15 En algunos ejemplos de las unidades ensanchadoras A, $-\text{NH}-\text{R}^9$ se selecciona entre $-\text{NH}$ -alquileo C_1-C_{10} -, $-\text{NH}$ -alquileo C_1-C_{10} - NH - alquileo $\text{C}(\text{O})-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ -, $-\text{NH}$ -alquileo C_1-C_{10} - $\text{C}(\text{O})-\text{NH}$ -alquileo C_1-C_{10} -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_r-(\text{CH}_2)_r$ -, $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_r-(\text{CH}_2)_r-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_r$ -, $-\text{NH}$ -(carbociclo C_3-C_8)-, $-\text{NH}$ -(arileno)-, y $-\text{NH}$ -(heterociclo C_3-C_8)-, donde cada r es independientemente 1-10.
- 20 En algunos ejemplos de las unidades ensanchadoras A, $-\text{O}-\text{R}^9$ se selecciona entre $-\text{O}$ -alquileo C_1-C_{10} -, $-\text{O}$ -alquileo C_1-C_{10} - $\text{NH}-\text{C}(\text{O})$ -alquileo C_1-C_{10} -, $-\text{O}$ -alquileo C_1-C_{10} - $\text{C}(\text{O})-\text{NH}$ -alquileo C_1-C_{10} -, $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -, $\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2$ -, $-\text{O}$ -(carbociclo C_3-C_8)-, $-\text{O}$ -(arileno)-, y $-\text{O}$ -(heterociclo C_3-C_8)-, donde cada r es independientemente 1-10.
- 25 En los ejemplos en los que la unidad ensanchadora A es $-\text{O}-\text{R}^9-\text{R}^{11}$ -, el éster es un éster impedido.

En algunos ejemplos de fórmula I o II, D tiene la fórmula:

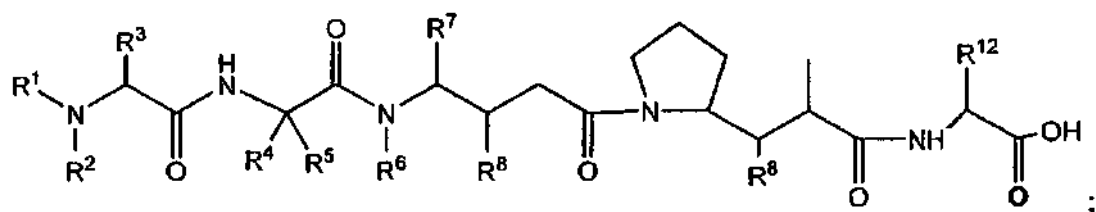


- 30 o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que R^1-R^8 son tal como se define en el presente documento.

Los conjugados de ligando enlazador de fármacos y los compuestos enlazadores de fármacos incluyen también aquellos donde D tiene la fórmula:

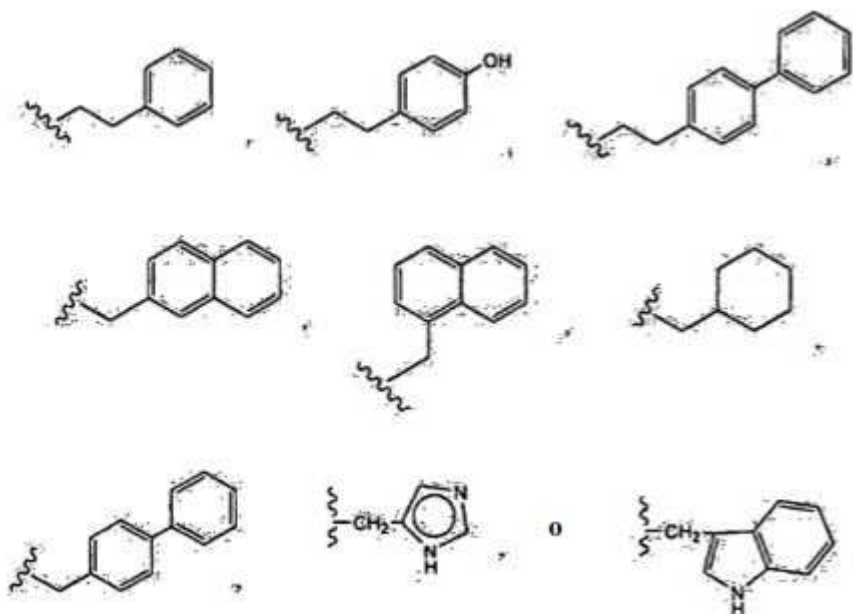


- 35 cuando se conjuga; y, como un fármaco libre, D tiene la fórmula:



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde para ambas fórmulas:

- 5 (a) R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y alquilo- C_1-C_8 , con la condición de que ambos R^1 y R^2 no sean -H;
- (b) R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y alquilo- C_1-C_8 no sustituido, con la condición de que ambos R^1 y R^2 no sean -H;
- (c) R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y metilo con la condición de que R^1 y R^2 no sean -H;
- 10 (d) R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, $-X^1$ -arilo, $-X^1$ -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8); R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C_1-C_8 ,
- (f) R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en -H o alquilo - C_1-C_8 sustituido;
- (g) R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en -H o isopropilo;
- 15 (h) R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, $-X^1$ -arilo, alquil C_1-C_8 -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8);
- (i) R^4 es una cadena secundaria de un aminoácido natural;
- (j) R^4 es -H, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-piridilmetilo, 3-piridilmetilo, 4-piridilmetilo, fenilo, ciclohexilo,
- 20



- 25 (k) R^4 es isopropilo y R^5 es -H;
- (l) o R^4 y R^5 forman conjuntamente un anillo carbocíclico que tiene la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ en la que R^a y R^b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C_1-C_8 y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;
- (m) R^6 se selecciona entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C_1-C_8 ;
- (n) R^6 se selecciona entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C_1-C_8 sustituido;
- 30 (o) R^6 se selecciona entre el grupo que consiste en -H y metilo;
- (p) R^7 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C_1-C_8 , carbociclo C_3-C_8 , arilo, $-X^1$ -arilo, $-X^1$ -(carbociclo C_3-C_8), -heterociclo C_3-C_8 y $-X^1$ -(heterociclo C_3-C_8);
- (q) R^7 se selecciona entre el grupo que consiste en -H y -alquilo C_1-C_8 ;
- (r) R^7 se selecciona entre el grupo que consiste en -H y alquilo - C_1-C_8 ;
- 35 (s) R^7 se selecciona entre el grupo que consiste en -H y sec-butilo;
- (t) cada R^8 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -alquilo C_1-C_8 , -carbociclo

C₃-C₈ y -O-(alquilo C₁-C₈);

(u) cada R⁸ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H y -O-(alquilo C₁-C₈);

(v) cada R⁸ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H y -O-(alquilo C₁-C₈);

5 (w) cada R⁸ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste que consiste en -H y -OCH₃ no sustituido;

(x) cada X¹ es independientemente -alquileo C₁-C₁₀;

(y) cada X¹ es independientemente alquileo C₁-C₁₀ no sustituido;

(z) R¹² se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, arilo, -X¹-arilo, carbociclo C₃-C₈, -X¹-(heterociclo C₃-C₈), -alquileo C₁-C₈-NH₂, -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);

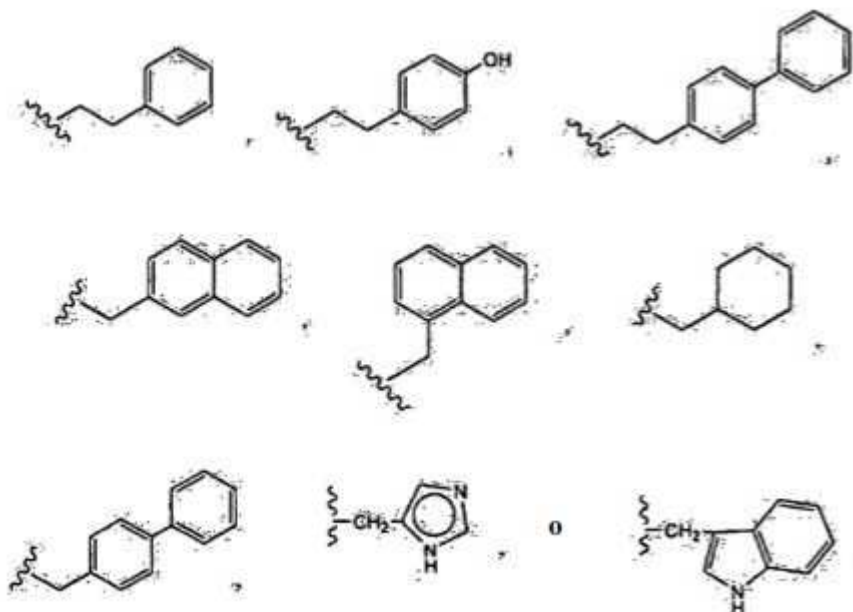
10 (aa) R¹² es una cadena secundaria de un aminoácido natural.

(bb) R¹² es H, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃,

-CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂,

-(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO,

15 -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetilo, 3-piridilmetilo, 4-piridilmetilo, fenilo, ciclohexilo,



20 y cualquier combinación de las realizaciones (a) a (bb), con la condición de que se entiende que se excluyen las combinaciones en las que se podrían combinar diferentes ejemplos del mismo sustituyente. En un compuesto ilustrativo, los grupos alquilo en los grupos (a) a (bb) están insaturados.

25 En los compuestos ilustrativos, R⁵ es -H, y R⁴ y R¹² son independientemente una cadena secundaria de un aminoácido natural y los grupos restantes son tal como se ha indicado en el presente documento.

25 En los compuestos ilustrativos, R³ es -H o -alquilo (C₁-C₈); R⁴ es una cadena secundaria de un aminoácido natural. R⁷ es -H o -alquilo (C₁-C₈); y R⁸ es -O-(alquilo C₁-C₈) y los grupos restantes son tal como se ha indicado en el presente documento.

30 En los compuestos ilustrativos, R³ es -H o -alquilo (C₁-C₈); R⁴ es -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, R⁷ es -H o -alquilo (C₁-C₈); y R⁸ es -O-(alquilo C₁-C₈) y los grupos restantes son tal como se ha indicado en el presente documento.

35 En los conjugados ilustrativos, R³ es -H o -alquilo (C₁-C₈); R⁴ es -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, R⁷ es -H o -alquilo (C₁-C₈); R⁸ es -O-(alquilo C₁-C₈). R¹² es una cadena secundaria de un aminoácido natural. y los grupos restantes son como se indica en cualquiera de las realizaciones del el presente documento.

40 En los compuestos ilustrativos, R³ es -H o -alquilo (C₁-C₈); R⁴ es -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, R⁷ es -H o -alquilo (C₁-C₈); R⁸ es -O-(alquilo C₁-C₈). R¹² es la cadena secundaria de

fenilalanina, metionina o triptófano, y los grupos restantes son como se indica en el presente documento.

En los compuestos ilustrativos, R^3 es -H o -alquilo (C_1-C_8); R^4 es $-CH_2CH_2SCH_3$ o $-CH_2CH(CH_3)CH_3$, R^7 es -H o -alquilo (C_1-C_8); y R^8 es -O-(alquilo C_1-C_8) y los grupos restantes son tal como se ha indicado en el presente documento.

En los conjugados ilustrativos, R^3 es -H o -alquilo (C_1-C_8); R^4 es $-CH_2CH_2SCH_3$ o $-CH_2CH(CH_3)CH_3$, R^7 es -H o -alquilo (C_1-C_8); R^8 es -O-(alquilo C_1-C_8). R^{12} es una cadena secundaria de un aminoácido natural. y los grupos restantes son como se indica en el presente documento.

En los compuestos ilustrativos, R es -H o -alquilo (C_1-C_8); R^4 es $-CH_2CH_2SCH_3$ o $-CH_2CH(CH_3)CH_3$, R^7 es -H o -alquilo (C_1-C_8); R^8 es -O-(alquilo C_1-C_8). R^{12} es la cadena secundaria de fenilalanina, metionina o triptófano, y los grupos restantes son como se indica en el presente documento.

En los compuestos ilustrativos, R^3 es -H o -alquilo- C_1-C_8 saturado, R^4 es una cadena secundaria de un aminoácido natural. R^6 es -H o -alquilo- C_1-C_8 saturado; R^7 es -H o alquilo C_1-C_8 saturado, y R^8 es -O-(alquilo C_1-C_8 saturado) y los grupos restantes son tal como se ha indicado en el presente documento.

En los compuestos ilustrativos, R^3 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^4 es una cadena secundaria de un aminoácido natural. R^6 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^7 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, y R^8 es -O-(alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido) y los grupos restantes son tal como se ha indicado en el presente documento.

En los compuestos ilustrativos, R^1 y R^2 son -H o -alquilo- C_1-C_8 saturado no sustituido con la condición de que ambos no sean hidrógeno, R^3 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^4 es una cadena secundaria de un aminoácido natural. R^6 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^7 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, y R^8 es -O-(alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido) y los grupos restantes son como se indica en el presente documento.

En los compuestos ilustrativos, R^1 y R^2 son -H o -alquilo- C_1-C_8 saturado no sustituido con la condición de que ambos no sean hidrógeno, R^3 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^4 es una cadena secundaria de un aminoácido natural. R^6 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^7 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^8 es -O-(alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido); R^{12} es una cadena secundaria de un aminoácido natural y los grupos restantes son como se indica en el presente documento.

En los compuestos ilustrativos, R^1 y R^2 son -H o -alquilo- C_1-C_8 saturado no sustituido con la condición de que ambos no sean hidrógeno, R^3 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^4 es $-CH_2CH_2SCH_3$ o $-CH_2CH(CH_3)CH_3$, R^6 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^7 es -H o -alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido, R^8 es -O-(alquilo C_1-C_8 saturado no sustituido); R^{12} es la cadena secundaria de fenilalanina, metionina o triptófano y los grupos restantes son como se indica en el presente documento.

En los compuestos ilustrativos, R^1 y R^2 son -H o -alquilo- C_1-C_3 saturado no sustituido con la condición de que ambos no sean hidrógeno, R^3 es -alquilo C_1-C_4 saturado no sustituido, R^4 es $-CH_2CH_2SCH_3$ o $-CH_2CH(CH_3)CH_3$, R^5 es -H, R^6 es metilo, R^7 es -alquilo C_1-C_4 saturado no sustituido, R^8 es -O-(alquilo C_1-C_3 saturado no sustituido); R^{12} es la cadena secundaria de fenilalanina, metionina o triptófano y los grupos restantes son como se indica en el presente documento.

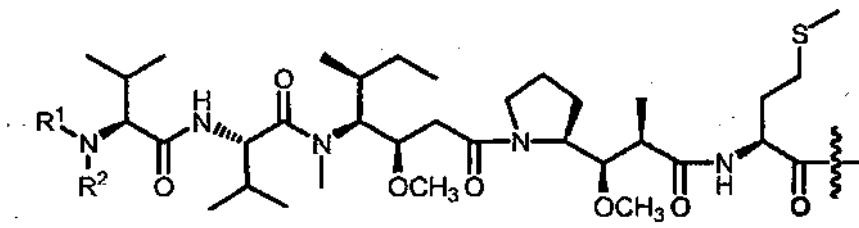
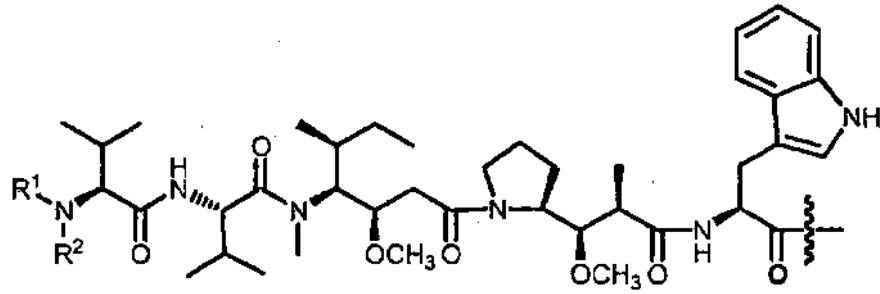
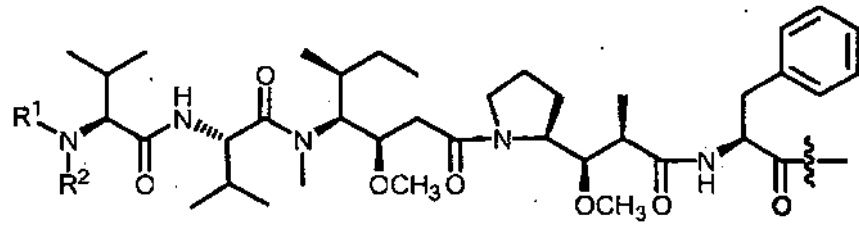
En algunos ejemplos, R^3 , R^4 y R^7 son independientemente isopropilo o sec-butilo y R^5 es H. En un conjugado ilustrativo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo; R^5 es -H, y R^7 es sec-butilo.

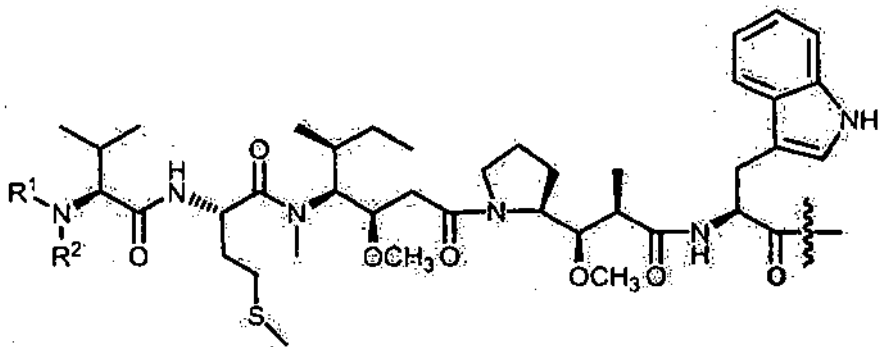
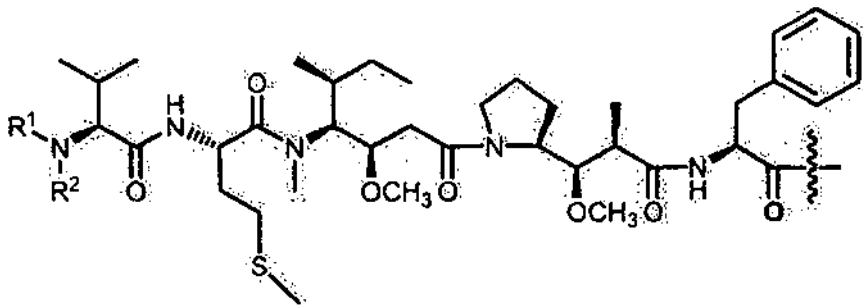
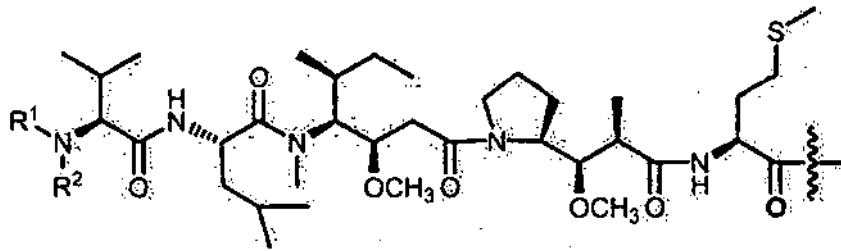
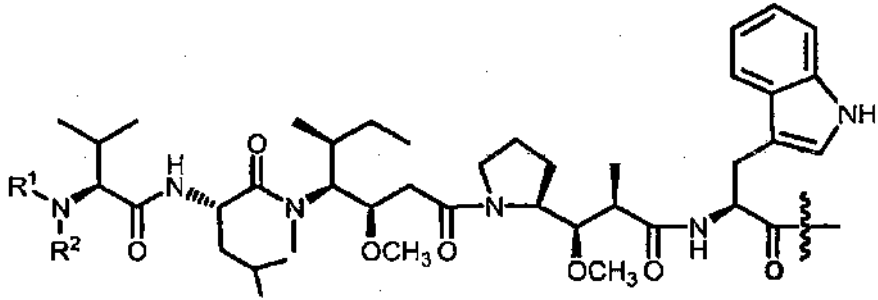
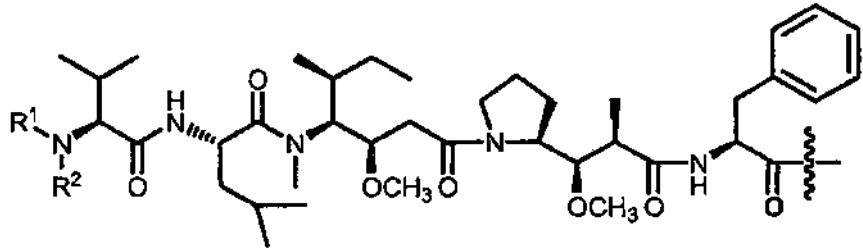
En algunos ejemplos, R^2 y R^6 son cada uno H o -alquilo C_1-C_8 . En otro, R^2 y R^6 son cada uno $-CH_3$, y R^5 es H,

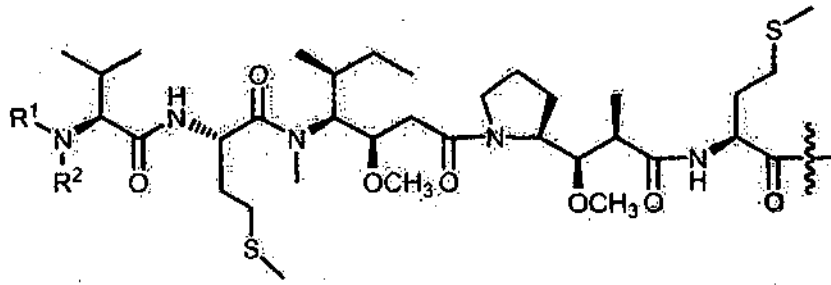
En algunos ejemplos, cada ocurrencia de R^8 es $-OCR_3$.

En un ejemplo, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo; R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es -H, R^7 es sec-butilo, y cada ocurrencia de R^8 es $-OCH_3$.

En el presente documento también se describe que el compuesto D puede tener la siguiente fórmula:

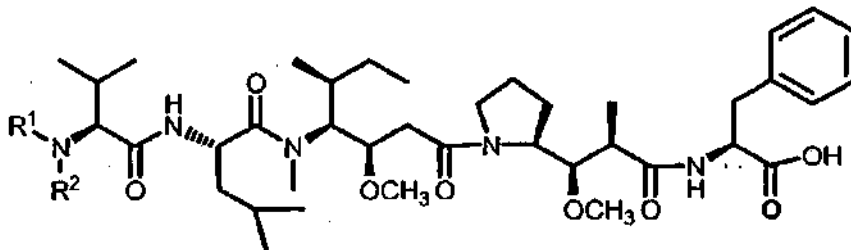
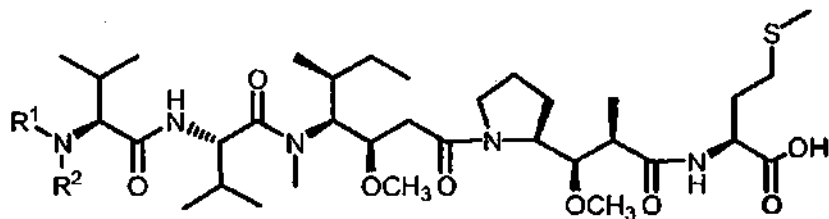
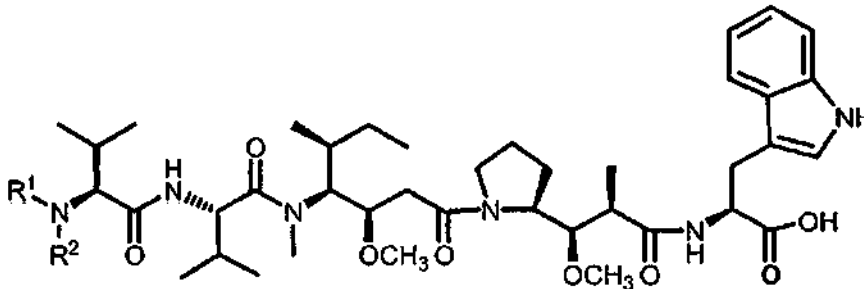
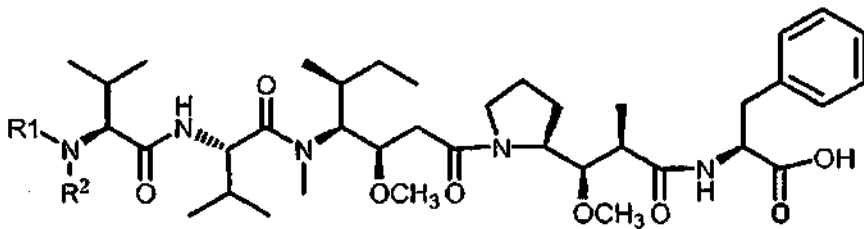


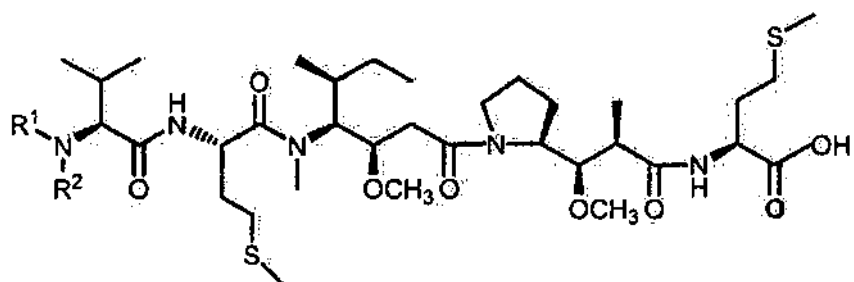
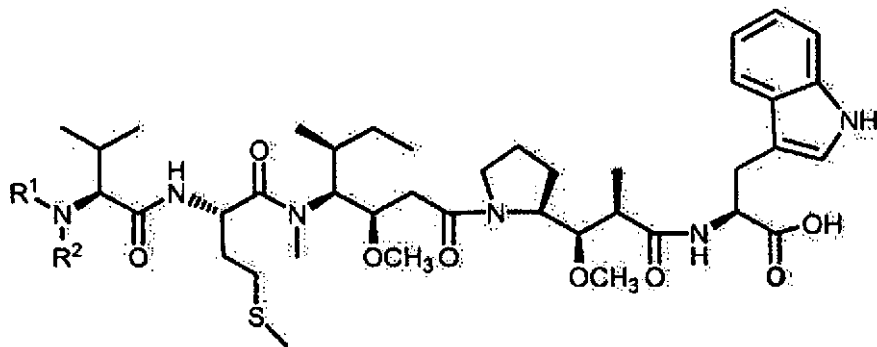
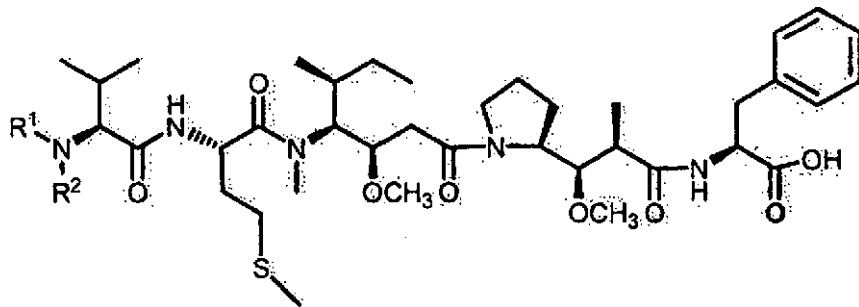
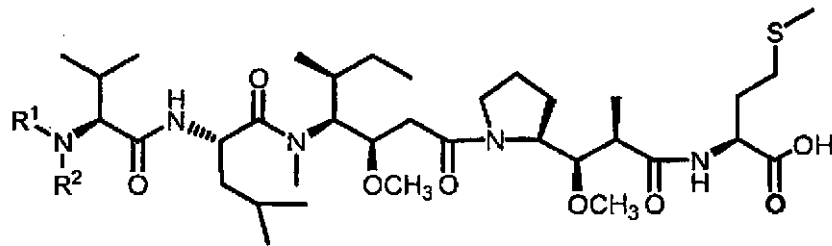
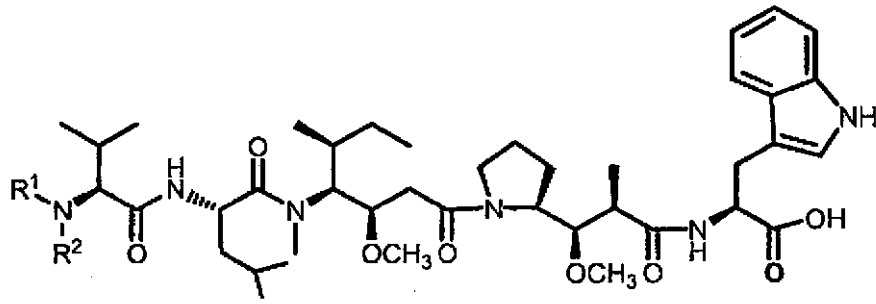




o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que la línea ondulada indica el enlace covalente con la unidad enlazadora (LU);

- 5 En el presente documento, también se describe que el compuesto D puede tener una de las siguientes fórmulas como fármaco libre:



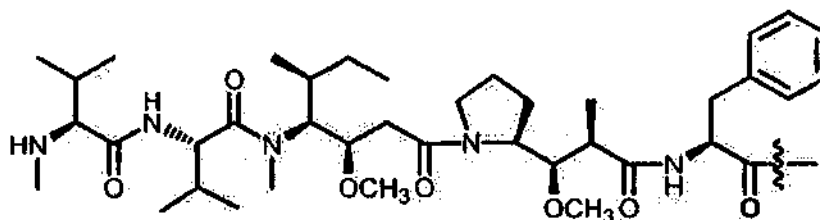


o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables,

En los ejemplos anteriores, cada uno de R¹ y R² es -H o -alquilo-C₁₋₈, con la condición de que R¹ y R² no sean -H. En otro grupo de ejemplos, cada uno de R¹ y R² es -CH₃.

5

En otro ejemplo más, D tiene la fórmula:

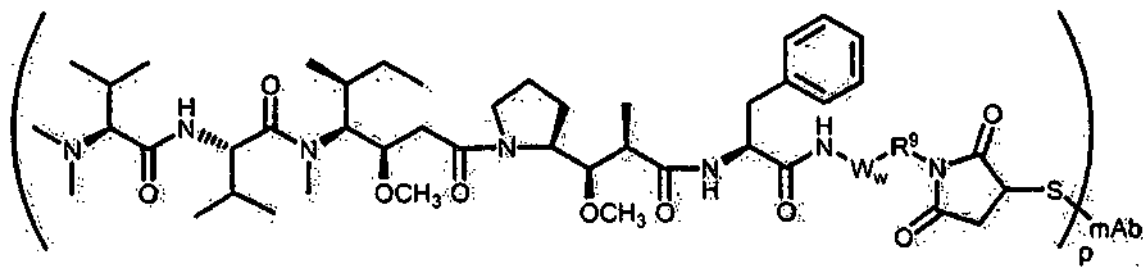


10 Se describen también conjugados de ligandos enlazadores de fármacos en los que el ligando es un anticuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo intacto o fragmentos de anticuerpo). Estos conjugados se representan mediante la Fórmula IIa:



15 o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde Ab es un anticuerpo, A es una unidad ensanchadora, a es 1 o 2, cada W es independientemente una unidad de aminoácido, w es un número entero comprendido entre 1 y 12, p es un número entero de 1 a aproximadamente 20, y D es un resto de fármaco como se ha descrito anteriormente.

20 Los compuestos ilustrativos de Fórmula IIa' tienen las siguientes estructuras:



donde el NH adyacente a W_w es un grupo amino de una W.

25 La carga del fármaco se representa por p, el número promedio de moléculas de fármaco por ligando (*por ejemplo*, un anticuerpo) (*por ejemplo* de Fórmula II, IIa, IIa'). La carga del fármaco puede variar de 1 a 20 unidades de fármaco (D) por unidad de ligando (*por ejemplo*, Ab o mAb). Las composiciones de Fórmula IIa y Fórmula IIa' incluyen mezclas de anticuerpos conjugados con una gama de fármacos, de 1 a 20.

30 En algunos ejemplos, p es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por unidad de ligando. En algunas realizaciones, p es 1. En algunos ejemplos, p es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por unidad de ligando. En algunos ejemplos, p es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, 2 a aproximadamente 5, o de 2 a aproximadamente 4 unidades de fármaco por unidad de ligando. En algunos ejemplos, p es aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6 o aproximadamente 8 unidades de fármaco por unidad de ligando.

35 El número promedio de unidades de fármaco por unidad de ligando en una preparación de una reacción de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA, y HPLC. Puede determinarse también la distribución cuantitativa de los conjugados de ligandos enlazadores de fármacos en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación, y caracterización de los conjugados de ligandos enlazadores de fármacos, donde p es un determinado valor de los conjugados de ligandos enlazadores de fármacos con otras cargas de fármacos se pueden conseguir mediante la citada HPLC en fase inversa o electroforesis.

45 Volviendo a la Fórmula IIa', los conjugados comprenden un anticuerpo unido covalentemente a una o más unidades de fármacos (restos) mediante una unidad enlazadora: A, a, W y w son tal como se ha descrito anteriormente. El conjugado del fármaco de anticuerpo incluye sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

La carga del fármaco se representa por p, el número promedio de unidades de fármacos por anticuerpo en una

molécula de Fórmula II. La carga del fármaco puede variar de 1 a 20 fármacos (D) por anticuerpo (Ab o mAb). Las composiciones del ADC de Fórmula IIa' incluyen mezclas de anticuerpos conjugados con una gama de fármacos, de 1 a 20. En algunos ejemplos, p es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por anticuerpo. En algunos ejemplos, p es 1. En algunos ejemplos, p es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 unidades de fármaco por anticuerpo. En algunos ejemplos, p es de aproximadamente 2 a aproximadamente 6, 2 a aproximadamente 5, o de 2 a aproximadamente 4 unidades de fármaco por anticuerpo. En algunos ejemplos, p es aproximadamente 2, aproximadamente 4, aproximadamente 6 o aproximadamente 8 unidades de fármaco por anticuerpo.

El número promedio de fármacos por anticuerpo en preparaciones de los ADC derivados de reacciones de conjugación se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de UV/visible, espectrometría de masas, ensayo ELISA, y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de los ADC en términos de p. En algunos casos, la separación, purificación, y caracterización de los ADC homogéneos donde p es un determinado valor derivado de ADC con otras cargas de fármaco se puede conseguir por medios tales como HPLC en fase inversa o electroforesis.

Para algunos conjugados de fármaco-anticuerpo, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, cuando la unión se realiza en un tiol de la cisteína, un anticuerpo puede tener solo uno o algunos grupos tiol de la cisteína, o puede tener solo uno o algunos grupos tiol lo suficientemente reactivos a través de los cuales se puede unir una unidad enlazadora. En algunos ejemplos, el tiol de la cisteína es un grupo tiol de un resto cisteína que forma un enlace disulfuro intercadena. En algunos ejemplos, el tiol de la cisteína es un grupo tiol de un resto cisteína que no forma un enlace disulfuro intercadena.

Normalmente, menos restos que el máximo teórico de restos de fármacos se conjugan con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede incluir, por ejemplo, muchos restos lisina que no reaccionan con el compuesto enlazador de fármacos intermedio o el reactivo de la unidad enlazadora. Solo los grupos lisina más reactivos pueden reaccionar con un reactivo de unidad enlazadora que reacciona con aminas. En general, los anticuerpos no contienen muchos, en su caso, grupos tioles de cisteína libres y reactivos que se puedan unir al resto de fármaco mediante una unidad enlazadora. La mayoría de restos tiol de la cisteína en los anticuerpos se encuentran como puentes disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT). El anticuerpo puede someterse a condiciones de desnaturalización para revelar grupos nucleófilos reactivos tales como lisina o cisteína. La carga (relación fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, incluyendo: (i) limitar el exceso molar del compuesto enlazador de fármacos intermedio del reactivo de la unidad enlazadora con respecto al anticuerpo, (ii) limitar el tiempo de la reacción de conjugación o la temperatura, y (iii) limitar de forma parcial o limitar las condiciones reductoras para la modificación del tiol de la cisteína.

Cuando más de un grupo nucleófilo reacciona con un intermedio del compuesto enlazador de fármacos, o el reactivo de la unidad enlazadora seguido por el reactivo del resto de fármaco, a continuación, el producto resultante es una mezcla de los conjugados del ligando enlazador de fármacos (*por ejemplo*, ADC) con una distribución de uno o más restos de fármaco por unidad de ligando (*por ejemplo*, un anticuerpo). el número promedio de fármacos por unidad de ligando (*por ejemplo*, anticuerpo) puede calcularse a partir de la mezcla mediante, por ejemplo, el ensayo de anticuerpos ELISA doble, específico para anticuerpos y específico para el fármaco. Se pueden identificar moléculas individuales de conjugados del ligando enlazador de fármacos en la mezcla mediante espectroscopía de masas, y separarse mediante HPLC, *por ejemplo*, cromatografía de interacción hidrófoba ("Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate", Hamblett, K.J., et al, Resumen N° 624, American Association for Cancer Research; Hamblett et al., 2004, Cancer Research 10:7063; Reunión Anual de 2004, marzo 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004; "Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates", Alley, S.C., et al, Resumen N° 627, American Association for Cancer Research; Reunión Anual de 2004, marzo 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volumen 45, marzo de 2004). De esta manera, se puede aislar un conjugado homogéneo con un único valor de carga de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

La unidad enlazadora (LU)

Una "unidad enlazadora" es un compuesto bifuncional que se puede usar para enlazar una unidad de fármaco y una unidad de ligando para formar un conjugado del ligando enlazador de fármacos. Dichos conjugados son útiles, por ejemplo, en la formación de inmunocombinados dirigidos contra antígenos asociados a tumores. Dichos conjugados permiten la administración selectiva de fármacos citotóxicos a las células tumorales.

En un ejemplo, la unidad enlazadora del compuesto enlazador de fármacos y del conjugado de ligando enlazador de fármacos tiene la fórmula:



donde -A- es una unidad ensanchadora; a es 1 o 2; cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido, w es un número entero comprendido entre 1 y 12.

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

La unidad ensanchadora

5 La unidad ensanchadora (-A-) puede unir una unidad de ligando con una unidad de aminoácido (-W-). A este respecto, una unidad de ligando (L) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de una unidad ensanchadora. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en una unidad de ligando, tanto naturalmente como mediante manipulación química incluyen, pero sin limitación, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. En un aspecto, los grupos funcionales de la unidad de ligando son sulfhidrilo y amino. Se pueden generar grupos sulfhidrilo mediante reducción de un enlace disulfuro intramolecular de una unidad de ligando. Como alternativa, se pueden generar grupos sulfhidrilo mediante la reacción de un grupo amino de un resto de lisina de una unidad de ligando utilizando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo generador de sulfhidrilos.

15 En un ejemplo, a es 1 y la unidad ensanchadora forma un enlace con la unidad de aminoácido. En otra, a es 2 y una de las unidades ensanchadoras forma un enlace con la unidad de aminoácido.

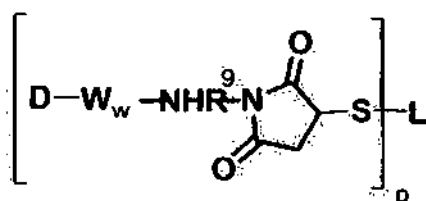
20 En algunos ejemplos, la unidad ensanchadora forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de ligando. Se puede derivar el átomo de azufre de un grupo sulfhidrilo de una unidad de ligando. Las unidades ensanchadoras representativas de esta realización se representan gráficamente en los corchetes de las fórmulas IIIa y IIIb, donde L-, -W-, -D, w y p son tal como se ha definido anteriormente, y R⁹ se puede seleccionar entre el grupo que consiste en alquileo C₁-C₁₀, -carbociclo C₃-C₈, -arileno-, -heteroalquileo C₁-C₃₀, -heterociclo C₃-C₈, -alquileo-arileno C₁-C₁₀, -arileno-C₁-C₁₀ alquileo-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, y -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-;

25 En algunos ejemplos de las unidades ensanchadoras A, -NH-R⁹- se selecciona entre -NH-alquileo C₁-C₁₀-, -NH-alquileo C₁-C₁₀-NH-alquileo C(O)-C₁-C₁₀-, -NH-alquileo C₁-C₁₀-C(O)-NH-alquileo C₁-C₁₀-, -NH-(CH₂CH₂O)_r-, -NH-(CH₂CH₂NH)_r-(CH₂)_r-, -NH-(CH₂CH₂NH)_r-(CH₂)_r-NH-C(O)-(CH₂)_r-, -NH-(carbociclo C₃-C₈)-, -NH-(arileno)-, y -NH-(heterociclo C₃-C₈)-, donde cada r es independientemente 1-10.

30 En algunos ejemplos de las unidades ensanchadoras A, -O-R⁹- se selecciona entre -O-alquileo C₁-C₁₀-, -O-alquileo C₁-C₁₀-NH-C(O)-alquileo C₁-C₁₀-, -O-alquileo C₁-C₁₀-C(O)-NH-alquileo C₁-C₁₀-, -O-(CH₂CH₂O)_r-, O-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -O-(carbociclo C₃-C₈)-, -O-(arileno)-, y -O-(heterociclo C₃-C₈)-, donde cada r es independientemente 1-10.

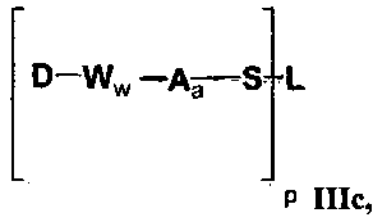
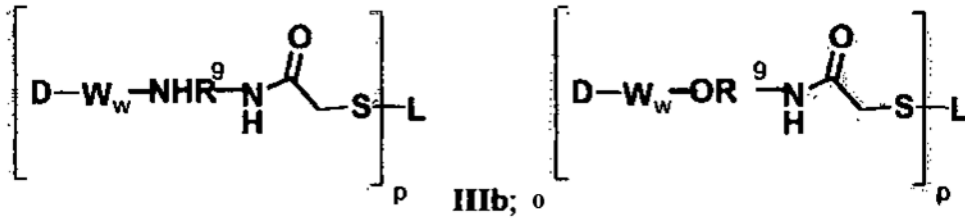
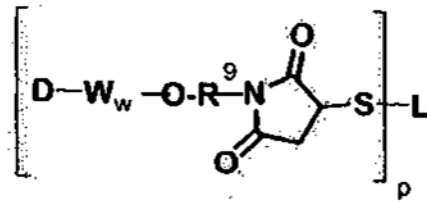
35 Cuando la unidad ensanchadora A es -O-R⁹-R¹¹-, el éster es un éster impedido.

40 Debe entenderse de todos los ejemplos de Fórmula II, tal como III-VI, que incluso no se han denotado de forma expresa, procedentes de 1 a 20 restos de fármacos se unen a una unidad de ligando (p = 1-20).



IIIa;

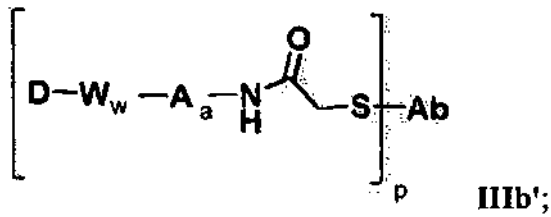
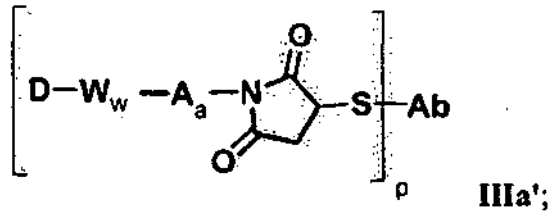
o



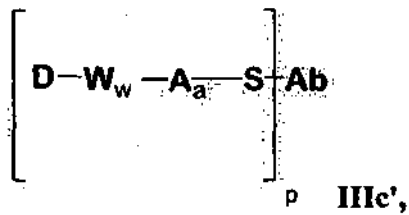
donde S es un grupo tiol de la unidad de ligando.

5

Algunos conjugados de Anticuerpo-Fármaco incluyen:

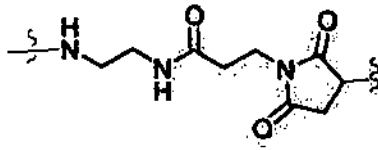


o

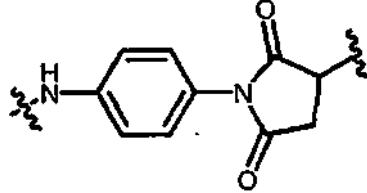


10 donde S es un grupo tiol de la unidad de ligando.

otra unidad ilustrativa tiene la Fórmula IIIa, en la que R⁹ es heteroalquileno C₁-C₃₀, tal como el siguiente:

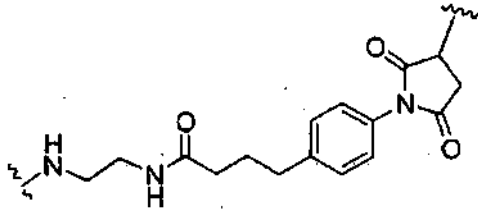


otra unidad ilustrativa tiene la Fórmula IIIa, donde NH-R⁹ es -NH-(C₆H₄)-:

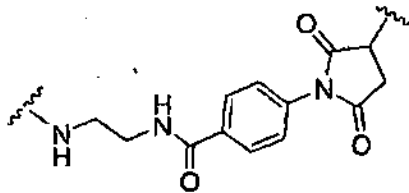


5

Otra unidad ensanchadora ilustrativa tiene la siguiente fórmula:

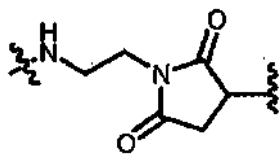


Otra unidad ensanchadora ilustrativa tiene la Fórmula,



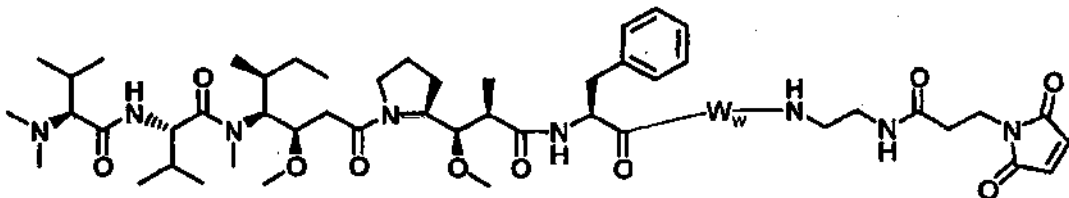
10

Otra unidad ensanchadora ilustrativa tiene la siguiente fórmula, en la que R⁹ es heteroalquileo C₁-C₃₀ de la siguiente fórmula:

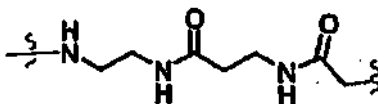


15

Otro compuesto ilustrativo es el que tiene la fórmula:

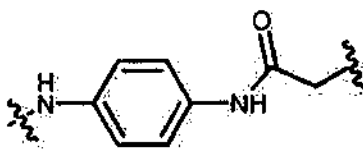


Otra unidad ensanchadora ilustrativa es la de la siguiente Fórmula IIIb, en la que R⁹ es -heteroalquileo C₁-C₃₀:

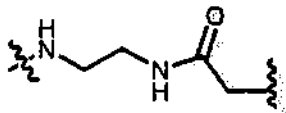


20

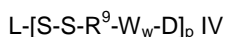
Otra unidad ilustrativa es la de la Fórmula IIIb, donde NH-R⁹ es -NH-(C₆H₄)-:



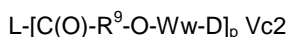
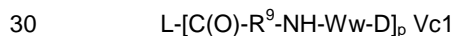
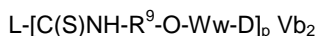
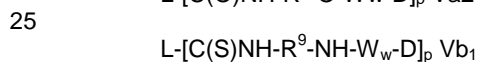
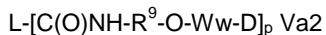
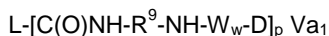
Otra unidad ensanchadora ilustrativa es la de la siguiente Fórmula IIIb en la que R⁹ es -heteroalqueno C₁-C₃₀-:



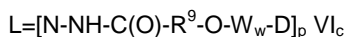
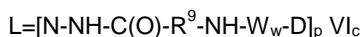
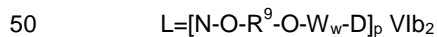
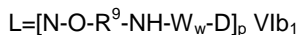
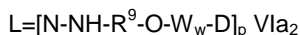
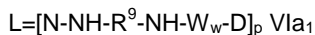
5 La unidad ensanchadora se puede unir también a la unidad de ligando mediante un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de ligando y un átomo de azufre de la unidad ensanchadora. Se representa gráficamente una
10 unidad ensanchadora representativa entre corchetes del conjugado del ligando enlazador de fármacos de Fórmula IV. en la que R⁹, L-, -W-, -D, w y p son como se han definido anteriormente y la S de la izquierda es parte de la unidad de ligando.



15 En otro ejemplo más, el grupo reactivo de la unidad ensanchadora contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de una unidad de ligando. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero sin limitación, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Los conjugados del ligando enlazador de fármacos representativos se representan gráficamente con
20 los compuestos enlazadores de fármacos dentro de corchetes de las Fórmulas Va - Vc, donde -R⁹-, L-, -W-, -D, w y p son como se han definido anteriormente y el sitio reactivo de la unidad de ligando no se muestra;



35 En otros ejemplos, el grupo reactivo de la unidad ensanchadora contiene un sitio reactivo que es reactivo con un grupo de hidratos de carbono modificado (-CHO) que puede estar presente en un ligando. Por ejemplo, un hidrato de carbono se puede oxidar suavemente utilizando un reactivo como peryodato de sodio y la unidad (-CHO) resultante del hidrato de carbono oxidado se puede condensar con una unidad ensanchadora de forma que contenga una funcionalidad como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina, y una arilhidrazida tal como las descritas por Kaneko et al. (1991) Bioconjugate Chem 2:133-41. Los
40 conjugados del ligando enlazador de fármacos representativos se representan gráficamente con los compuestos enlazadores de fármacos dentro de corchetes de las Fórmulas VIa, VIb, y VIc, donde -R⁹-, L-, -W-, -Y-, -D, w y p son como se define anteriormente y el sitio reactivo de la unidad de ligando no se muestra;

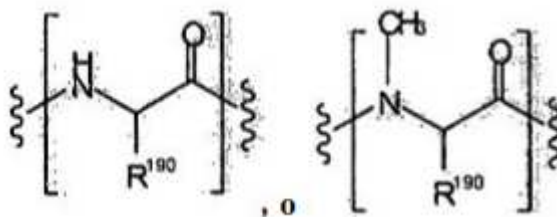


La unidad de aminoácido

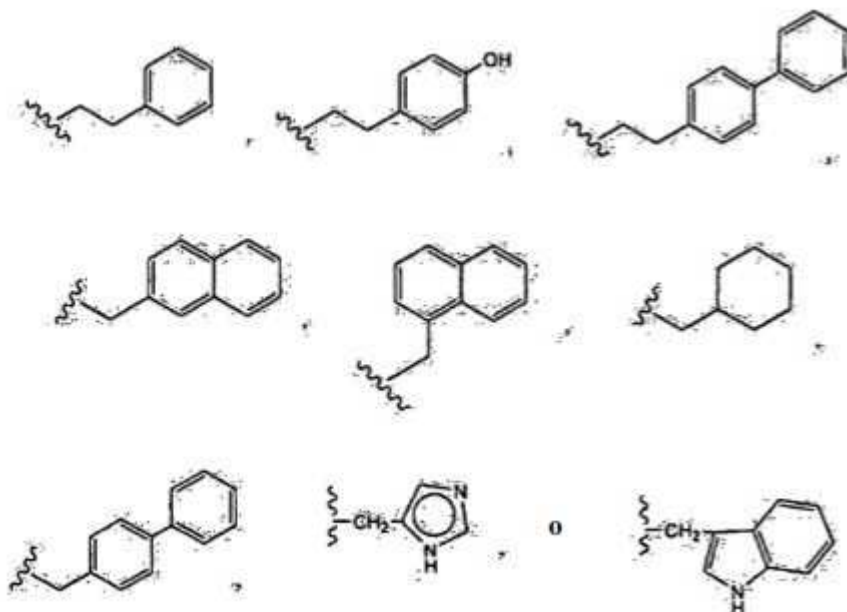
La unidad de aminoácido (-W-) se une a la unidad ensanchadora en el resto del fármaco.

5 -W_w- es un aminoácido, o una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. En algunos ejemplos, W_w es un radical dipéptido.

10 Cada aminoácido W puede ser natural o no natural. Análogamente, cada aminoácido puede ser un isómero D o L. En algunas realizaciones, cada unidad -W- independientemente tiene la fórmula denotada a continuación en los corchetes, y w es un número entero comprendido entre 1 y 12:



15 en la que R¹⁹⁰ es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetilo, 3-piridilmetilo, 4-piridilmetil-fenilo, ciclohexilo,



20 En otro ejemplo, cada unidad -W- se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en los siguientes aminoácidos: alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, valina, ornitina, penicilamina, β-alanina, ácido aminoalcanoico, ácido aminoalquinoico, ácido aminoalcanodioico, ácido aminobenzoico, ácido aminoheterocicloalcanoico, ácido heterociclocarboxílico, citrulina, estatina, ácido diaminoalcanoico, y sus derivados.

25 En otro ejemplo, cada unidad -W- se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en los siguientes aminoácidos L (naturales): alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano y valina.

30 En algunos ejemplos, -W- no es cisteína. En algunos, -W- no es prolina. En algunos ejemplos, -W- no es un N-metil aminoácido.

35 En otros ejemplos, cada unidad -W- se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en los siguientes aminoácidos D de estos aminoácidos naturales: alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, triptófano y valina. En algunos ejemplos, la unidad de aminoácido (-W₁-) próxima a la unidad de fármaco no es un aminoácido D.

Los ejemplos ilustrativos de alanina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: alanina (Ala), N-alquil-alanina, deshidro-alanina, 4-tiazolilalanina, 2-piridilalanina, 3-piridilalanina, 4-piridilalanina, β -(1-naftil)-alanina, β -(2-naftil)-alanina, ácido α -aminobutírico, β -cloro-alanina, β -ciano-alanina, β -ciclopentil-alanina, β -ciclohexil-alanina, β -yodo-alanina, β -ciclopentenil-alanina, β -tBu-alanina, β -ciclopropil-alanina, β -difetil-alanina, β -fluoro-alanina, β -piperazinil-alanina con el anillo de piperazina protegido o no, β -(2-quinolil)-alanina, β -(1,2,4-triazol-1-il)-alanina, β -ureido-alanina, H- β -(3-benzotienil)-Ala-OH, y H- β -(2-tienil)-Ala-OH.

Los ejemplos ilustrativos de arginina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: arginina (Arg), N-alquil-arginina, H-Arg(Me)-OH, H-Arg(NH₂)-OH, H-Arg(NO₂)-OH, H-Arg(Ac)₂-OH, H-Arg(Me)₂-OH (simétrico), H-Arg(Me)₂-OH (simétrico), (N- ω -hidroxi-nor-arginina) del ácido 2-amino-4-(2'-hidroxiguanidino)-butírico y homoarginina.

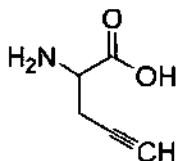
Los ejemplos ilustrativos de ácido aspártico y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: ácido aspártico (Asp), Ácido N-alquil-aspártico, y H-Asp(OtBu)-OH.

Los ejemplos ilustrativos de asparagina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: asparagina (Asn), N-alquil-asparagina, e isoasparagina (H-Asp-NH₂).

Los ejemplos ilustrativos de los derivados de cisteína (Cys) (que no contienen un grupo SH libre) de la misma incluyen, pero no se limitan a: H-Cys(Acm)-OH, H-Cys(Trt)-OH, H-Cys(tBu)-OH, H-Cys(Bzl)-OH, H-Cys(Et)-OH, H-Cys(SO₃H)-OH, H-Cys(aminoetil)-OH, H-Cys(carbamoil)-OH, H-Cys(fenil)-OH, H-Cys(Boc)-OH, y H-Cys(hidroxietil)-OH.

Los ejemplos ilustrativos de histidina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: histidina, (His), N-alquil-histidina, H-His(Boc)-OH, H-His(Bzl)-OH, H-His(l-Me)-OH, H-His(l-Tos)-OH, H-2,5-diyodo-His-OH, eH-His(3-Me)-OH.

Los ejemplos ilustrativos de glicina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: glicina (Gly), N-alquil-glicina, H-propargilglicina (



), α -aminoglicina (protegida o no), β -ciclopropil-glicina, ciclopentil-glicina, ciclohexil-glicina, α -alilglicina, t-Butil-glicina, neopentilglicina, y fenilglicina.

Los ejemplos ilustrativos de ácido glutámico y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: ácido glutámico (Glu), ácido N-alquil-glutámico, H-Glu(OtBu)-OH, H- γ -hidroxi-Glu-OH, H- γ -metileno-Glu-OH, H- γ -carboxi-Glu(OtBu)₂-OH, y ácido piroglutámico.

Los ejemplos ilustrativos de glutamina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: glutamina (Gln), N-alquil-glutamina, isoglutamina (H-Glu-NH₂), H-Gln(Trt)-OH, y H-Gln(isopropil)-OH.

Los ejemplos ilustrativos de fenilalanina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: fenilalanina (Phe), N-alquil-fenilalanina, H-p-amino-Phe-OH, H-p-amino-Phe(Z)-OH, H-p-bromo-Phe-OH, H-p-Bencil-Phe-OH, H-p-tBu-Phe-OH, H-p-carboxi-Phe(OtBu)-OH, H-p-carboxi-Phe-OH, H-p-ciano-Phe-OH, H-p-fluoro-Phe-OH, H-3,4-dicloro-Phe-OH, H-p-yodo-Phe-OH, H-p-nitro-Phe-OH, H-p-metil-Phe-OH, H-pentafluoro-Phe-OH, H-m-fluoro-Phe-OH, H- α -Me-Phe-OH, H-4-fenil-Phe-OH, homofenilalanina, cloro-fenilalanina y β -homofenilalanina.

Los ejemplos ilustrativos de lisina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: lisina (Lys), N-alquil-lisina, H-Lys(Boc)-OH, H-Lys(Ac)-OH, H-Lys(Formil)-OH, H-Lys(Me)₂-OH, H-Lys(nicotinil)-OH, H-Lys(Me)₃-OH, H-trans-4,5-deshidro-Lys-OH, H-Lys(Aloc)-OH, H- δ -hidroxi-Lys-OH, H- δ -hidroxi-Lys(Boc)-OH, H-Lys(acetamidoil)-OH, y H-Lys(isopropil)-OH.

Los ejemplos ilustrativos de leucina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: leucina (Leu), N-alquil-leucina, 4,5-deshidroleucina, H- α -Me-Leu-OH, homoleucina, norleucina, y t-leucina.

Los ejemplos ilustrativos de metionina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: metionina (Met), H-Met(O)-OH, y H-Met(O)₂-OH.

Los ejemplos ilustrativos de serina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: serina (Ser), N-alquil-serina, H-Ser(Ac)-OH, H-Ser(tBu)-OH, H-Ser(Bzl)-OH, H-Ser(p-cloro-Bzl)-OH, H- β -(3,4-dihidroxifenil)-Ser-OH, H- β -(2-tienil)-Ser-OH, isoserina N-alquil-isoserina, y 3-fenilisoserina.

Los ejemplos ilustrativos de tirosina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: tirosina (Tyr), N-alquil-tirosina,

H-3,5-dinitro-Tyr-OH, H-3-amino-Tyr-OH, H-3,5-dibromo-Tyr-OH, H-3,5-diiodo-Tyr-OH, H-Tyr(Me)-OH, H-Tyr(tBu)-OH, H-Tyr(Boc)-OH, H-Tyr(Bzl)-OH, H-Tyr(Et)-OH, H-3-yodo-Tyr-OH, y H-3-nitro-Tyr-OH.

5 Los ejemplos ilustrativos de treonina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: treonina (Thr), N-alquil-treonina, alo-treonina, H-Thr(Ac)-OH, H-Thr(tBu)-OH, y H-Thr(Bzl)-OH.

Los ejemplos ilustrativos de isoleucina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: isoleucina (Ile), N-alquil-isoleucina, alo-isoleucina, y norleucina.

10 Los ejemplos ilustrativos de isoleucina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: isoleucina (Ile), N-alquil-triptófano, H-5-Me-Trp-OH, H-5-hidroxi-Trp-OH, H-4-Me-Trp-OH, H- α -Me-Trp-OH, H-Trp(Boc)-OH, H-Trp(Formil)-OH, y H-Trp(Mesitileno-2-sulfonil)-OH.

15 Los ejemplos ilustrativos de prolina y sus derivados, incluyen, pero no se limitan a: prolina (Pro), N-alquil-prolina, homoprolina, tioprolina, hidroxiprolina (H-Hyp-OH), H-Hyp(tBu)-OH, H-Hyp(Bzl)-OH, H-3,4-deshidro-Pro-OH, 4-ceto-prolina, α -Me-Pro-OH, y H-4-fluoro-Pro-OH.

20 Los ejemplos ilustrativos de valina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: valina (Val), N-alquil- valina, H- α -Me-Val-OH, y norvalina.

Los ejemplos ilustrativos de ornitina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: ornitina, N-alquil- ornitina, H-Om(Boc)-OH, H-Om(Z)-OH, H- α -difluoro-Me-Om-OH (Eflornitina), y H-Orn(Aloc)-OH.

25 Los ejemplos ilustrativos de penicilamina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: penicilamina, H-penicilamina(Acm)-OH (H- β , β -dimetilcys(Acm)-OH) y N-alquil- penicilamina.

Los ejemplos ilustrativos de β -alanina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: β -alanina, N-alquil- β -alanina, y deshidro-alanina.

30 Los ejemplos ilustrativos de un ácido aminoalcanoico y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: Ácido N-alquilaminoalcanoico, Ácido aminobutírico, Ácido 4-(neopentiloxisulfonil)-aminobutírico, Ácido s-aminocaproico, Ácido α -aminoisobutírico, Ácido piperidilacético, Ácido 3-aminopropiónico, Ácido 3-amino-3-(3-piridil)-propiónico, y ácido 5-aminopentanoico (ácido aminovalérico).

35 Los ejemplos ilustrativos de un ácido aminoalquinoico y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: Ácido N-alquilaminoalquinoico, Ácido 6-amino-4-hexinoico, Ácido 6-(Boc-amino)-4-hexinoico.

40 Los ejemplos ilustrativos de un ácido aminoalcanodioico y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: Ácido N-alquilaminoalcanodioico, Ácido 2-aminohexanodioico, Ácido 2-aminoheptanodioico, Ácido 2-aminooctanodioico (H-Asu-OH).

Los ejemplos ilustrativos de un ácido aminobenzoico y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: Ácido N-alquilaminobenzoico, Ácido 2-aminobenzoico, Ácido 3-aminobenzoico, y ácido 4-aminobenzoico.

45 Los ejemplos ilustrativos de un ácido amino-heterociclo-alcanoico y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: Ácidos N-alquilamino-heterociclo-alcanoico, Ácido 4-amino-1-metil-1H-imidazol-2-carboxílico, Ácido 4-amino-1-metil-1H- pirrol-2-carboxílico, Ácida 4-amino-piperidina-4-carboxílico (H-Pip-OH; 1-prottegido o no), Ácido 3-amino-3-(3-piridil)-propiónico.

50 Los ejemplos ilustrativos de un ácido amino-heterociclo-carboxílico y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: ácido azetidina-2-carboxílico, Ácido azetidina-3-carboxílico, Ácido piperidina-4-carboxílico, y ácido tiazolidina-4-carboxílico.

55 Los ejemplos ilustrativos de citrulina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: citrulina (cit), N-alquil-citrulina, tiocitrulina, S-metil-tiocitrulina, y homocitrulina.

Los ejemplos ilustrativos de estatina y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: estatina, N-alquil-estatina, ciclohexilestatina, y fenilestatina.

60 Los ejemplos ilustrativos de ácido diaminoalcanoico (Dab) y sus derivados incluyen, pero no se limitan a: Ácidos N-alquil-diamino-alcanoicos, Ácidos N,N-dialquilamino-alcanoicos, Ácido α , γ -diaminobutírico (H-Dab-OH), H-Dab(Aloc)-OH, H-Dab(Boc)-OH, H-Dab(Z)-OH, Ácido α , β -diaminopropiónico y sus versiones protegidas de la cadena secundaria.

65 En algunos ejemplos, el enlace entre la unidad de aminoácido y la unidad de fármaco se puede escindir enzimáticamente mediante una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada a tumor, para liberar la unidad de

fármaco (-D), que se puede protonar *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco (D).

Las unidades $-W_w$ -unidad de fármaco útiles se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática mediante una enzima concreta, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, En un ejemplo, un enlace entre la unidad $-W_w$ - y la unidad de fármaco es aquel cuya escisión está catalizada por la cathepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

En un grupo de ejemplos, W_1 , la primera unidad W unida al extremo carboxilo de la unidad de fármaco de fórmula D, no puede formar una amida secundaria con el aminoácido del extremo C de la unidad de fármaco de fórmula D.

En un ejemplo, w es 1. En determinados ejemplos, w es un número entero comprendido entre 2 y 12. En un ejemplo, $-W_w$ es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. En un grupo de ejemplos, w es 2.

En determinados ejemplos, la unidad de aminoácido puede comprender solo aminoácidos naturales. En otros, la unidad de aminoácido puede comprender solo aminoácidos no naturales. En algunos ejemplos, la unidad de aminoácido puede comprender un aminoácido natural unido a un aminoácido no natural. En algunos ejemplos, la unidad de aminoácido puede comprender un aminoácido natural unido a un isómero D de un aminoácido natural.

En un grupo de ejemplos, al menos una W es un aminoácido L. En otro grupo, al menos una W es un aminoácido D. En algunos ejemplos, al menos una W tiene un centro quiral en la configuración S. En algunas realizaciones, al menos una W tiene un centro quiral en la configuración R.

En algunos ejemplos de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido W_w se selecciona entre el grupo que consiste en -Metionina-(L)Lisina-, γ -Asparagina-(L)Lisina-. En un ejemplo, de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido W_w se selecciona entre el grupo que consiste en -Tirosina-(D)Ácido Aspártico-, -Norvalina-(D)Ácido Aspártico-, -Fenilglicina-(D)Lisina-, -Metionina-(D)Lisina- γ -Asparagina-(D)Lisina-.

La unidad del ligando (L)

La unidad de ligando (L-) incluye en su alcance cualquier unidad de un ligando (L) que se une o se asocia o compleja de forma reactiva específicamente con un receptor, antígeno u otro resto receptor asociado con una población de células diana dada. Una unidad de ligando es una molécula que se une, se compleja, o reacciona con un receptor, antígeno u otro resto receptor de una población de células que se desea modificar terapéutica o biológicamente de otra forma. Por ejemplo, la unidad de ligando actúa para administrar la unidad de fármaco a la población de células diana concreta con la cual la unidad de ligando interacciona. Dichos ligandos incluyen, pero sin limitación, proteínas, polipéptidos y péptidos, Las unidades de ligando adecuadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, proteínas de pequeño peso molecular, polipéptidos o péptidos, lectinas, glucoproteínas, no péptidos, vitaminas moléculas transportadoras de nutrientes (tales como, pero sin limitación, transferrina), o cualquier otra molécula o sustancia de unión a célula.

Una unidad de ligando puede formar un enlace con una unidad ensanchadora. Una unidad de ligando puede formar un enlace con la unidad ensanchadora de la unidad enlazadora mediante un heteroátomo del ligando. Los heteroátomos que pueden estar presentes en una unidad de ligando incluyen azufre (en una realización, procedente de un grupo sulfidrilo de un ligando), oxígeno (en una realización, procedente de un grupo carbonilo, carboxilo o hidroxilo de un ligando) y nitrógeno (en una realización, procedente 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 que se produce naturalmente, o se pueden introducir en el ligando mediante una modificación química.

En un ejemplo, una unidad de ligando tiene un grupo sulfidrilo y la unidad de ligando se une a la unidad enlazadora mediante el átomo de azufre del grupo sulfidrilo.

En otro ejemplo, el ligando tiene restos lisina que pueden reaccionar con ésteres activados (dichos ésteres incluyen, pero sin limitación, ésteres de N-hidroxisuccinimida, pentafluorofenilo, y p-nitrofenilo) de la unidad ensanchadora de la unidad enlazadora y de esta manera forman un enlace amida que consiste en el átomo de nitrógeno de la unidad de ligando y el grupo C=O de la unidad enlazadora.

En otro ejemplo más, la unidad de ligando tiene uno o más restos lisina que pueden estar modificados químicamente para introducir uno o más grupos sulfidrilo. La unidad de ligando se une a la unidad enlazadora mediante el átomo de azufre del grupo sulfidrilo. Los reactivos que se pueden usar para modificar las lisinas incluyen, pero sin limitación, S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (Reactivo de Traut).

En otro ejemplo, la unidad de ligando puede tener uno o más grupos de hidratos de carbono que pueden estar modificados químicamente para tener uno o más grupos sulfidrilo. La unidad de ligando se une a la unidad enlazadora (la unidad ensanchadora) mediante el átomo de azufre del grupo sulfidrilo.

En otro ejemplo más, la unidad de ligando puede tener uno o más grupos hidrato de carbono que se pueden oxidar

para proporcionar un grupo aldehído (-CHO) (véase, *por ejemplo*, Laguzza, et al., 1989, J. Med. Chem. 32(3):548-55). El correspondiente aldehído puede formar un enlace con un sitio reactivo de una unidad ensanchadora. Los sitios reactivos en una unidad ensanchadora que pueden reaccionar con un grupo carbonilo en un ligando incluyen, pero sin limitación, hidrazina e hidroxilamina. Se describen otros protocolos para la modificación de proteínas para la unión o asociación de las unidades del fármaco en Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley and Sons (2002).

Las proteínas polipéptido, y unidades del ligando peptídicas no inmunorreactivas útiles incluyen, pero sin limitación, transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformantes ("TGF"), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), insulina y factores de crecimiento I y II de tipo insulina, somatostatina, lectinas y apoproteína procedente de una lipoproteína de baja densidad.

Los anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un determinante antigénico concreto (por ejemplo, un antígeno de células cancerosas, un antígeno vírico, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un compuesto químico, ácido nucleico, o sus fragmentos). Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (mAb) para un antígeno de interés utilizando cualquier técnica conocida en la materia que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en el cultivo.

Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, fragmentos de anticuerpo, o anticuerpos monoclonales quiméricos. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos mediante cualquiera de numerosas técnicas conocidas en la materia (*por ejemplo*, Teng et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; y Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16).

El anticuerpo puede ser también un anticuerpo biespecífico. Se conocen en la materia métodos para preparar anticuerpos biespecíficos y se describen *más abajo*.

El anticuerpo puede ser un fragmento, derivado o análogo funcionalmente activo de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a células diana (*por ejemplo*, antígenos de células cancerosas, antígenos víricos, o antígenos microbianos) u otros anticuerpos que se unen a células o matrices tumorales. A este respecto, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de estimular anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo del cual se deriva el fragmento, derivado o análogo reconocido. Específicamente, en un ejemplo, se puede potenciar la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina mediante la delección de las secuencias marco y de la CDR que están en el extremo C de la secuencia CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias CDR en los ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la materia (*por ejemplo*, el ensayo del núcleo BIA) (para la localización de las secuencias CDR, véase, *por ejemplo*, Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, National Institutes of Health, Bethesda, Md; Kabat E et al., 1980, J. Immunology 125(3):961-969).

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, pero sin limitación, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab, Fv, anticuerpos de cadena única, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, scFv, scFv-Fv, o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.

Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, que se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante normalizadas, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como por ejemplo, aquellos que tienen una región variable derivada de regiones constantes de anticuerpos monoclonales de murino e inmunoglobulina humana. (Véase, *por ejemplo*, la patente de los Estados Unidos nº 4.816.567; y la patente de los Estados Unidos Nº 4.816.397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos procedentes de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) procedentes de especies no humanas y una región marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos Nº 5.585.089). Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la publicación internacional Nº WO 87/02671; publicación de patente europea EP 0 184 187; publicación de patente europea EP 0 171 496; publicación de patente europea EP 0 173 494; publicación internacional Nº WO 86/01533; la patente de los Estados Unidos nº 4.816.567; publicación de patente europea Nº 012 023; Berter et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Cancer, Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449 y Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; la patente de los Estados Unidos nº 5.225.539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525 Verhoeyan et al., 1988, Science 239:1534; y Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060,

Son particularmente deseables los anticuerpos completamente humanos y se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar los genes de las cadenas pesada y ligera humanas. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, *por ejemplo*, todo o parte de un polipéptido de la invención. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno utilizando la tecnología del hibridoma convencional. Los transgenes de la inmunoglobulina humana soportados por los ratones transgénicos se redispone durante la diferenciación de los linfocitos B, y posteriormente experimentan un tipo de mutación inactivante y somática. De esta manera, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93, Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, *por ejemplo*, patentes de los Estados Unidos con números 5.625.126, 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806. Se pueden obtener otros anticuerpos humanos comercialmente de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (now Amgen, Fremont, CA) y Medarex (Princeton, NJ).

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada "selección guiada". En esta solución, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, *por ejemplo*, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar el cribado de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Véase, *por ejemplo*, Jaspers et al., 1994, *Biotechnology* 12:899-903). Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la materia. incluyendo bibliotecas de expresión en fagos (véase, *por ejemplo*, Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Quan y Carter, 2002, *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics*, In *Anti-IgE and Allergic Disease*, Jardieu y Fick, eds., Marcel Dekker, Nueva York, NY). Capítulo 20, págs. 427-469).

En otros ejemplos, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionalmente activos, por ejemplo, en el que el anticuerpo se fusiona mediante un enlace covalente (*por ejemplo*, un enlace peptídico), en cualquiera del extremo N o el extremo C de una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o de una de sus porciones, preferentemente al menos 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es de un anticuerpo. Preferentemente, el anticuerpo o su fragmento se une covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante.

Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que bien se modifican, *es decir*, mediante el enlace covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicho enlace covalente permita al anticuerpo retener su inmunoespecificidad de unión a antígeno. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado adicionalmente, *por ejemplo*, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

Los anticuerpos pueden tener modificaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con receptores Fc. En particular, los anticuerpos pueden tener modificaciones en restos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio ant-Fc y el receptor FcRn (véase, *por ejemplo*, Publicación Internacional N° WO 97/34631).

Se pueden obtener anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. Pueden obtenerse anticuerpos inmunoespecíficos que codifican la secuencia de nucleótidos de un antígeno de célula cancerosa, *por ejemplo*, de la base de datos GenBank o de una base de datos del tipo de ésta, publicaciones bibliográficas, o mediante clonación y secuenciación rutinarias.

En un ejemplo específico, En un ejemplo específico, Se pueden obtener anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, técnicas de expresión recombinante, Pueden obtenerse anticuerpos inmunoespecíficos que codifican la secuencia de nucleótidos de un antígeno de célula cancerosa *por ejemplo*, de la base de datos GenBank o de una base de datos del tipo de ésta, las publicaciones bibliográficas, o mediante clonación y secuenciación rutinarias. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, pero sin limitación, RFRUXAN® (rituximab; Genentech) que es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra CD20 para el tratamiento de pacientes con linfoma no de Hodgkin; OVAREX que es un anticuerpo de murino para el tratamiento del cáncer de ovario; PANOREX (Glaxo Wellcome, NC) que es un anticuerpo de IgG_{2a} murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; Cetuximab ERBITUX (Imclone Systems Inc., NY) que es un anticuerpo quimérico dirigido contra la IgG de EGFR IgG para el tratamiento de los cánceres positivos para el factor de crecimiento epidérmico, tales como cáncer de cabeza y cuello. Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; CAMPATH 1/H (Leukosite, MA) que es un anticuerpo de IgG₁ humanizado útil para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL); SMART MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA) y SGN-33 (Seattle Genetics, Inc., WA)

que es un anticuerpo de tipo IgD dirigido contra-CD33 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA); LYMPHOCIDE (Immunomedics, Inc., NJ) que es un anticuerpo de tipo IgG humanizado dirigido contra CD22 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; SMART ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra HLA-DR para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; ONCOLYM (Techniclone, Inc., CA) que es un anticuerpo de murino radiomarcado dirigido contra HLA-DrlO para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; ALLOMUNE (BioTransplant, CA) que es un mAb humanizado dirigido contra CD2 para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o del linfoma no de Hodgkin; AVASTIN (Genentech, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra VEGF para el tratamiento de los cánceres de pulmón y colorrectal; Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA) que es un anticuerpo dirigido contra CD22 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; y CEACIDE (Immunomedics, NJ) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra CEA para el tratamiento del cáncer colorrectal.

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero sin limitación, anticuerpos contra los siguientes antígenos (en el que los cánceres ilustrativos que se pueden tratar con el anticuerpo están entre paréntesis): CA125 (ovario), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), alfa fetoproteína (carcinomas), CA 242 (colorrectal), fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), antígeno específico de próstata (próstata), antígeno de membrana específico de próstata (próstata), fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de crecimiento epidérmico (carcinomas), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), receptor anti-transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1 (cáncer de mama), CEA (colorrectal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), receptor de IL-2 (leucemia de linfocitos T y linfomas), CD20 (linfoma no de Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), gonadotropina coriónica humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma), y producto del oncogen Neu (carcinomas). Se pueden usar otros muchos anticuerpos internalizadores que se unen a antígenos asociados a tumores y se han revisado (véase, *por ejemplo*, Franke et al., 2000, Cancer Biother. Radiopharm. 15, 459-76; Murray, 2000, Semin Oncol. 27:64-70; Breitling y Dubel, Recombinant Antibodies, John Wiley, and Sons, Nueva York, 1998).

En los intentos para descubrir las dianas celulares eficaces para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, los investigadores han deseado identificar polipéptidos transmembrana o asociados de otra forma a tumores que se expresan específicamente sobre la superficie de uno o más tipo(s) concreto(s) de células cancerosas en comparación con una o más célula(s) no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a tumores se expresan más abundantemente sobre la superficie de células cancerosas en comparación a sobre la superficie de células no cancerosas. la identificación de dichos polipéptidos de antígenos superficiales celulares asociados a tumores ha proporcionado una sensibilización a la capacidad de las células cancerosas para dirigirse de manera específica para los tratamientos basados en anticuerpos mediante la destrucción.

En un conjugado del ligando enlazador de fármacos ilustrativo, la unidad de ligando es un anticuerpo Ab que se une a al menos uno de CD19, CD20, CD30, CD33, CD70, BCMA, Glypican-3, Liv-1 y antígeno Y de Lewis, w=2, y D tiene la Fórmula IIb.

En otro ejemplo específico, se usan anticuerpos para el tratamiento de una enfermedad autoinmune de acuerdo con las composiciones y métodos de la invención. Se pueden obtener anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de una célula que es responsable de producir anticuerpos autoinmunes de cualquier organización (*por ejemplo*, un científico de una universidad o una compañía) o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. En otro ejemplo, los anticuerpos útiles que son inmuno-específicos para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, anticuerpos antinucleares; anti-dsADN; anti-ssADN, IgM de anticuerpo dirigido contra cardiolipina, IgG, IgM de anticuerpo dirigido contra fosfolípido, IgG, anticuerpo dirigido contra SM; anticuerpo dirigido contra mitocondrias; anticuerpo tiroideo; anticuerpo microsomal; anticuerpo de tiroglobulina; anticuerpo dirigido contra SCL-70; anticuerpo dirigido contra Jo; anticuerpo dirigido contra U₁RNP; anticuerpo dirigido contra La/SSB; anti-SSA; anticuerpo dirigido contra SSB; anticuerpo dirigido contra células peritales; anticuerpo dirigido contra histonas; anticuerpo dirigido contra RNP; anticuerpo C-ANCA; anticuerpo P-ANCA; anticuerpo dirigido contra centrómero; anticuerpo antifibrilarina y anticuerpo dirigido contra GBM.

En determinados ejemplos, Los anticuerpos útiles pueden unirse a un receptor o un complejo receptor expresado en un linfocito activado. El receptor o el complejo receptor puede comprender un miembro de la superfamilia de genes de la inmunoglobulina, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de la citoquina, un receptor de la quimioquina, una proteína de histocompatibilidad mayor, una lectina, o una proteína control del complemento. Los ejemplos no limitantes de miembros adecuados de la superfamilia de las inmunoglobulinas son CDR2, CD3, CD4, CD8, CD 19, CD22, CDR28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1, e ICOS. Los ejemplos no limitantes de miembros adecuados de la superfamilia de receptores de TNF son CDR27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR- 2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, y APO-3. Los ejemplos no limitantes de integrinas adecuadas son CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103, y CD104. Los ejemplos no limitantes de lectinas adecuadas son las lectinas del tipo C, el tipo S, y el tipo I.

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

En otro ejemplo específico, las unidades del ligando inmuno-específicas útiles para un antígeno vírico o microbiano son anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos, humanizados o monoclonales humanos. Como se usa en el presente documento, El término "antígeno vírico" incluye, pero sin limitación, cualquier péptido vírico, proteína polipeptídica (*por ejemplo*, gp120 del VIH, VIH nef, glicoproteína F del VSR, neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, HTLV tax, glicoproteína del virus del herpes simple (*por ejemplo*, gB, gC, gD, y gE) y el antígeno superficial de la hepatitis B) que es capaz de estimular una respuesta inmune. Como se usa en el presente documento, El término "antígeno microbiano" incluye, pero sin limitación, cualquier péptido microbiano, polipéptido, proteína, sacáridos, polisacáridos, o una molécula de lípidos (*por ejemplo*, un polipéptido bacteriano, hongos, de protozoo patógeno, o de levadura que incluye, *por ejemplo*, LPS y un polisacárido capsular 5/8) que es capaz de estimular una respuesta inmune.

Se pueden obtener anticuerpos inmuno-específicos de un antígeno vírico o microbiano comercialmente, por ejemplo, de BD Biosciences (San Francisco, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), o Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. se puede obtener la secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos que son inmuno-específicos de un antígeno vírico o microbiano, *por ejemplo*, de la base de datos GenBank o de una base de datos del tipo de ésta, publicaciones bibliográficas, o mediante clonación y secuenciación rutinarias.

En un ejemplo específico, los ligandos útiles son aquellos que son útiles para el tratamiento de una infección vírica o microbiana de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de anticuerpos útiles para el tratamiento de una infección vírica o una infección microbiana incluyen, pero sin limitación, SYNAGIS (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el virus sincitial respiratorio (VSR) para el tratamiento de pacientes con infección por VSR; PRO542 (Progenies) que es un anticuerpo de fusión con CD4 útil para el tratamiento de la infección por VIH; OSTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humano útil para el tratamiento del virus de la hepatitis B; PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo de IgG₁ humanizado útil para el tratamiento del citomegalovirus (CMV); y anticuerpos dirigidos contra LPS,

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento de las enfermedades infecciosas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos contra los antígenos procedentes de cepas patógenas de bacterias (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenas*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) del feto*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateneum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi*, y *Chlamydia spp.*); hongos patógenos (*Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, e *Histoplasma capsulatum*); protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*); o Helmintos (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, y anquilostomas).

Otros anticuerpos útiles para el tratamiento de las enfermedades víricas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos contra antígenos de virus patógenos, que incluyen como ejemplos y no como limitación: Poxviridae, Herpesviridae, Virus del Herpes Simple 1, Virus del Herpes Simple 2, Adenoviridae, Papovaviridae, Enteroviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Retroviridae, los virus de la gripe, los virus de la paragripe, paperas, sarampión, virus sincitial respiratorio, rubeola, Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis no A/no B, Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae, y el virus de la inmunodeficiencia humana.

Cribado de conjugados de ligando enlazador de fármacos,

Los animales transgénicos y las líneas celulares son particularmente útiles en el cribado de los conjugados del ligando enlazador de fármacos (*por ejemplo*, los ADC) para tratamientos profilácticos o terapéuticos de enfermedades o trastornos que implican la expresión en exceso de una proteína diana (*por ejemplo*, CD 19, CD20, CDR30, CD33, CD70, BCMA, Glypican-3, Liv-1 e Y de Lewis, El cribado de conjugados del ligando enlazador de fármacos como los ADC se ejemplifica en el presente documento.

Los animales transgénicos y las líneas de células son particularmente útiles en el cribado de los ADC. El cribado de un ADC útil puede implicar administrar un ADC candidato en un intervalo de dosis al animal transgénico, y evaluar en diversos puntos temporales el(los) efectos del ADC sobre la enfermedad o el trastorno que se está evaluando. Como alternativa, o adicionalmente, el fármaco se puede administrar antes de o de manera simultánea con exposición a un

inductor de la enfermedad, si es aplicable Se pueden seleccionar los ADC candidatos en serie e individualmente, o en paralelo con formato de cribado del medio o de alto rendimiento. La velocidad a la cual se pueden seleccionar los ADC para la utilidad de tratamientos profilácticos o terapéuticos de las enfermedades o trastornos está limitada solo por la velocidad de síntesis o la metodología de cribado, incluyendo la detección (medida/análisis de los datos).

5 Se describe en el presente documento un método de cribado que comprende (a) trasplantar células desde una línea de células cancerosas estable en un animal no humano, (b) administrar un fármaco ADC candidato al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato de inhibir la formación de tumores procedentes de la línea de células trasplantadas.

10 Se describe en el presente documento un método de cribado que comprende (a) trasplantar células desde una línea de células cancerosas estable en un animal no humano y permitir al tumor establecerse en el animal, (b) administrar un fármaco ADC candidato al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato de inhibir la formación de tumores procedentes de la línea de células trasplantadas.

15 Se describe en el presente documento un método de cribado que comprende (a) poner en contacto las células de una línea de células cancerosas estable con un fármaco ADC candidato y (b) evaluar la capacidad del ADC candidato de inducir la muerte celular. En una realización, se evalúa la capacidad del ADC candidato de inducir la apoptosis.

20 Se describe también un método de cribado que comprende (a) trasplantar células desde una línea de células cancerosas de células renales estable en un animal no humano, (b) administrar un fármaco ADC candidato al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato de inhibir la formación de tumores procedentes de la línea de células trasplantadas.

25 Un ejemplo es un método de cribado que comprende (a) trasplantar células desde una línea de células cancerosas de células renales estable en un animal no humano y permitir al tumor establecerse en el animal, (b) administrar un fármaco ADC candidato al animal no humano y (c) determinar la capacidad del candidato de inhibir la formación de tumores procedentes de la línea de células trasplantadas.

30 Otro ejemplo es un método de cribado que comprende (a) poner en contacto las células de una línea de células de la enfermedad de Hodgkin estable con un fármaco ADC candidato y (b) evaluar la capacidad del ADC candidato de inducir la muerte celular. En un ejemplo, se evalúa la capacidad del ADC candidato de inducir la apoptosis.

35 En un ejemplo, los ADC candidatos se seleccionan administrándose al animal transgénico en un intervalo de dosis, y evaluar la respuesta fisiológica del animal hacia el candidato en el tiempo. La administración puede ser una inyección adecuada, o de otra forma, dependiendo de la naturaleza química del candidato que se está evaluando. En algunos casos, Puede ser adecuado administrar el candidato junto con otro agente terapéutico que podría potenciar la eficacia del candidato. Si se usan líneas celulares derivadas de animales transgénicos sujeto para seleccionar los candidatos útiles en el tratamiento de diversos trastornos, los candidatos del ensayo se añaden al medio del cultivo celular en el momento adecuado, y se evalúa la respuesta celular al candidato en el tiempo utilizando los ensayos bioquímicos y/o histológicos adecuados. En algunos casos, puede ser adecuado aplicar el candidato de interés al medio de cultivo junto con otros agentes terapéuticos que podrían potenciar la eficacia del candidato.

45 De esta manera, se describen en el presente documento ensayos para identificar los conjugados del ligando enlazador de fármacos (tales como los ADC) que se dirigen específicamente y se unen a una proteína diana, la presencia de la cual está correlacionada con una función celular anómala, y en la patogénesis de la proliferación y/o la diferenciación celular que está relacionada causalmente con el desarrollo de los tumores.

50 Para identificar los candidatos inhibidores del crecimiento que se dirigen específicamente a un antígeno de interés, se puede llevar a cabo el ensayo descrito en la patente de los Estados Unidos N° 5.677.171. Se pueden seleccionar los compuestos que inhiben el crecimiento de las células cancerosas que expresan en exceso el antígeno de interés derivado de animales transgénicos. De acuerdo con este ensayo, las células cancerosas que expresan en exceso el antígeno de interés se hacen crecer en una mezcla 1:1 de medios F12 y DMEM suplementada con suero de feto bovino al 10 %, glutamina y penicilina estreptomicina. Las células se sembraron en placas a 20.000 células en una placa de cultivo de células de 35 mm (2 ml/placa de 35 mm) y se añadió el compuesto de ensayo a varias concentraciones. Después de seis días, se hizo el recuento del número de células, en comparación con las células no tratadas usando un contador de células COULTER™ electrónico. Se pueden seleccionar aquellos compuestos que inhiben el crecimiento celular en aproximadamente un 20-100 % o aproximadamente 50-100 % como compuestos inhibidores del crecimiento.

60 Para seleccionar los candidatos que inducen la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de integridad de la membrana tal como se indica mediante *por ejemplo*, PI, el azul tripán o 7AAD, con respecto a un control. El ensayo de captación de PI utiliza células aisladas a partir del tejido tumoral de interés de un animal transgénico. De acuerdo con este ensayo, las células se cultivan en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (D-MEM): F-12 de Ham (50:50) suplementado con FBS inactivado térmicamente al 10 % (Hyclone) y L-glutamina 2 mM. De esta manera, el ensayo se lleva a cabo en ausencia de complemento y células inmunoefectoras. Se sembraron las células a una densidad de 3 x

65

10⁶ por placa en placas de 100 x 20 mm y se dejó que se unieran durante la noche. A continuación se retiró el medio y se sustituyó con medio reciente solo o medio que contenía diversas concentraciones del candidato. Se incubaron las células durante un periodo de tiempo de 3 días. Tras cada tratamiento, se lavaron las monocapas con PBS y se separaron mediante tripsinización. A continuación se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 5 minutos a 4 °C. se volvió a suspender el aglomerado en 3 ml en tampón de unión con Ca²⁺ + frío (Hepes 10 mM, pH 7,4 NaCl 140 mM, 2,5 mM CaCl₂) y se distribuyó en alícuotas en tubos de 12 x 75 mm con un filtro de rosca de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de grumos de células. Los tubos reciben a continuación PI (10 µg/ml). Se pueden analizar las muestras usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y un software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos candidatos que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular tal como se determinó mediante la captación de PI se pueden seleccionar como compuestos inductores de muerte celular.

A fin de seleccionar los candidatos que inducen la apoptosis, se llevó a cabo un ensayo de unión a anexina utilizando células establecidas a partir del tejido tumoral de interés del animal transgénico. Las células se cultivaron y se sembraron en placas tal como se describe en el párrafo anterior. A continuación se retiró el medio y se sustituyó con medio reciente solo o medio que contenía 10 µg/ml del conjugado del fármaco de anticuerpo (ADC). Tras un periodo de incubación de tres días, se lavaron las monocapas con PBS y se separaron mediante tripsinización. A continuación se centrifugaron las células, se volvieron a suspender en Ca²⁺ + tampón de unión y se distribuyeron en alícuotas en tubos tal como se ha descrito anteriormente para el ensayo de muerte celular. A continuación los tubos reciben anexina marcada (por ejemplo, anexina V- FITC) (1 µg/ml). Se pueden analizar las muestras usando un citómetro de flujo FACSCAN™ y un software FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos candidatos que inducen niveles estadísticamente significativos de la concentración de anexina con respecto al control se seleccionan como compuestos inductores de la apoptosis.

25 Ensayos de proliferación celular *in vitro*

En general, se midió la actividad citotóxica o citostática del conjugado del ligando enlazador de fármacos, tal como un ADC, exponiendo las células de mamífero que tenían proteínas receptoras al anticuerpo del conjugado en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días, preferentemente 96 horas, y midiendo la viabilidad celular. Se usaron los ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad (proliferación) citotoxicidad, e inducción de la apoptosis (activación de la caspasa) de un conjugado de un ligando enlazador de fármacos. El cribado de conjugados del ligando enlazador de fármacos como los ADC se ejemplifica en el presente documento.

Se midió la potencia *in vitro* de los conjugados de fármacos de anticuerpos mediante un ensayo de proliferación celular (véanse los Ejemplos). El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® es un método de ensayo homogéneo comercialmente disponible (Promega Corp., Madison, WI), basado en la expresión recombinante de la luciferasa en *Coleoptera* (patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.583.024; 5.674.713 y 5.700.670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en un cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, un indicador de las células metabólicamente activas (Crounc et al., 1993, J. Immunol. Meth. 160:81-88, la patente de Estados Unidos N^o 6.602.677) Se llevó a cabo el ensayo CellTiter-Glo® en un formato de 96 pocillos, haciéndolo sensible al cribado automatizado de alto rendimiento (HTS) (Cree et al., 1995, AntiCancer Drugs 6:398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica añadir el reactivo individual (CellTiter-Glo® Reagent) directamente a células cultivadas en medio suplementado con suero. No se requiere el lavado de las células, la retirada del medio y múltiples etapas de pipeteado. El sistema detecta tan poco como 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de añadir el reactivo y mezclar. Las células se pueden tratar de manera continua con ADC, o se pueden tratar y separar a partir de ADC. En general, las células tratadas de forma breve, es decir, 3 horas, muestran los mismos efectos de potencia que las células tratadas de forma continua.

El formato de "adición-mezcla-medida" da como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El ensayo CellTiter-Glo® genera una señal luminiscente de "tipo brillo", producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una vida media generalmente mayor de cinco horas, dependiendo del tipo de célula y del medio utilizados. las células viables se reflejan en unidades de luminiscencia relativas ((ULR). El sustrato, luciferina de escarabajo, se decarboxila oxidativamente por la luciferasa de luciérnaga recombinante con conversión simultánea de ATP a AMP y generación de fotones. La vida media extendida elimina la necesidad de usar inyectores de reactivos y proporciona flexibilidad para el procesamiento en modo continuo o discontinuo de múltiples placas. Se puede usar este ensayo de proliferación celular con diversos formatos multipocillo, *por ejemplo*, un formato de 96 o 384 pocillos. Se pueden registrar los datos mediante un luminómetro o un dispositivo de formación de imágenes de una cámara CCD. La salida de la luminiscencia se presenta como unidades de luz relativa (ULR). medida en el tiempo.



Se pueden medir los efectos antiproliferativos de los conjugados de fármacos de anticuerpos mediante la proliferación

celular, el ensayo de destrucción celular *in vitro* contra diferentes líneas de células de tumores de mama.

Aclaramiento y estabilidad plasmática *in vivo*

- 5 Se puede investigar el aclaramiento y la estabilidad farmacocinética en plasma de los conjugados del ligando enlazador de fármacos, tales como los ADC, en ratas y macacos en el tiempo. El cribado de conjugados del ligando enlazador de fármacos como los ADC se ejemplifica en el presente documento.

Toxicidad en roedores

- 10 Se evaluaron los conjugados de fármacos de anticuerpos y un control ADC-menos, "Vehículo" en un modelo de rata de toxicidad aguda. Se investigó la toxicidad de los ADC mediante el tratamiento de ratas Sprague-Dawley macho y hembra con los ADC y la posterior inspección y análisis de los efectos sobre varios órganos. Las observaciones ordinarias incluyen cambios en los pesos corporales y signos de lesiones y sangrado. Se llevaron a cabo los parámetros de la patología clínica (química sérica y hematología) histopatología, y necropsia en animales que se habían dosificado. se considera que la pérdida de peso, o el cambio de peso con respecto a los animales sometidos a dosificación solo con vehículo, en animales tras la dosificación con ADC es un indicador ordinario y general de toxicidad sistémica o localizada.

- 20 Se midió la hepatotoxicidad por la elevada concentración de enzimas hepáticas, los elevados números de figuras mitóticas y apoptóticas y la necrosis de los hepatocitos. Se observó toxicidad hematolinfoide por el agotamiento de leucocitos, principalmente granulocitos (neutrófilos), y/o plaquetas, e implicación de órganos linfáticos, *es decir*, atrofia o actividad apoptótica. Se notificó también toxicidad por lesiones en el tracto gastrointestinal tales como números elevados de figuras mitóticas y apoptóticas y enterocolitis degenerativa.

- 25 Las enzimas indicadoras de lesión hepática que se estudiaron incluyen:

AST (aspartato aminotransferasa)

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

ALT (alanina aminotransferasa)

- 35 - Localización: citoplásmica; de hígado, riñón, corazón, músculo esquelético,
- Relación hígado:plasma de 3 000:1
- T1/2:42 h; variación diurna de GGT (g-glutamyl transferasa)
40 - Localización: membrana plasmática de células con elevada capacidad secretora o absorbitiva; de hígado, riñón, intestino.
- Mal predictor de lesión hepática; comúnmente elevado en los trastornos de los conductos biliares

Toxicidad/seguridad en macacos

- 45 similar a la del estudio de toxicidad/seguridad en rata, se trataron macacos con ADC seguido por medidas de las enzimas hepáticas, y la inspección y el análisis de los efectos sobre diversos órganos. Las observaciones ordinarias incluyen cambios en los pesos corporales y signos de lesiones y sangrado. Se llevaron a cabo los parámetros de la patología clínica (química sérica y hematología) histopatología, y necropsia en animales que se habían dosificado.

Síntesis de compuestos

- Los conjugados de ligando enlazador de fármaco y los compuestos enlazadores de fármacos se pueden preparar usando los procedimientos sintéticos detallados a continuación en los Esquemas 1-4. Tal como se detalla en lo sucesivo, los conjugados de ligando enlazador de fármaco y los compuestos enlazadores de fármacos se puede preparar usando una sección de una unidad enlazadora que tiene un sitio reactivo para su unión a la unidad de fármaco. En un aspecto, se introduce una segunda sección de la unidad enlazadora que tiene un segundo sitio reactivo *por ejemplo*, un grupo electrófilo que reacciona con un grupo nucleófilo presente en una unidad de ligando (*por ejemplo*, un anticuerpo). Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo reacciona con un grupo electrófilo de una unidad enlazadora y constituye un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, pero sin limitación, grupos maleimida y haloacetamida. El grupo electrófilo proporciona un sitio cómodo para unión del anticuerpo.

- 65 En otro ejemplo, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que reacciona con un grupo electrófilo presente en un anticuerpo. Los grupos electrófilos de un anticuerpo útiles incluyen, pero sin limitación,

grupos carbonilo de aldehídos y acetonas. El heteroátomo del grupo nucleófilo de una unidad enlazadora reacciona con un grupo electrófilo de un anticuerpo y constituye un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos de una unidad enlazadora útiles incluyen, pero sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y arilhidrazida. El grupo electrófilo de un anticuerpo proporciona un sitio cómodo para su unión con una unidad enlazadora.

Los grupos aminofuncionales son también sitios reactivos útiles para una unidad enlazadora porque pueden reaccionar con ácido carboxílico, o ésteres activados de una unidad de fármaco para formar un enlace amida. Normalmente, las unidades de fármaco basadas en péptido se pueden preparar formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Dichos enlaces peptídicos se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase, por ejemplo, Schroder y Lubke, "The Peptides", volumen 1, pp 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos.

La síntesis de una unidad ensanchadora ilustrativa que tiene un grupo maleimida electrófilo se ilustra más adelante en los Esquemas 1-3. Los métodos sintéticos generales útiles para la síntesis de compuestos enlazadores de fármacos se describen en el Esquema 1. Los Esquemas 2 y 3 muestran la construcción de una unidad enlazadora que tiene un grupo maleimida electrófilo. El Esquema 4 detalla la unión de un anticuerpo a un compuesto enlazador de fármaco para formar un conjugado de ligando (anticuerpo) enlazador de fármaco.

Tal como se detalla en lo sucesivo, los conjugados de ligando enlazador de fármaco se pueden preparar usando una sección del enlazador que tiene un sitio reactivo para su unión a la unidad de fármaco e introduciendo otra sección de la unidad enlazadora que tiene un sitio reactivo para una unidad de ligando. En un ejemplo, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo electrófilo que reacciona con un grupo nucleófilo presente en una unidad de ligando, tal como un anticuerpo. El grupo electrófilo proporciona un sitio cómodo para unión del anticuerpo. Los grupos nucleófilos útiles en un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, los grupos sulfhidrilo, hidroxilo y amino. El heteroátomo del grupo nucleófilo de un anticuerpo reacciona con un grupo electrófilo de una unidad enlazadora y constituye un enlace covalente con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos útiles incluyen, pero sin limitación, grupos maleimida y haloacetamida.

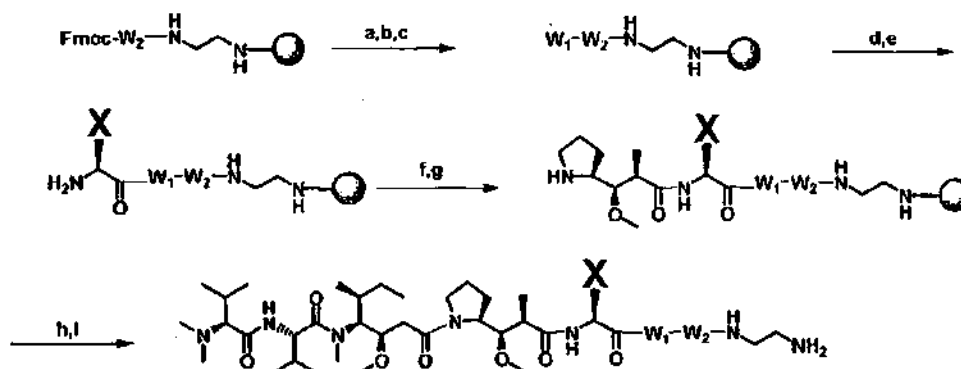
En otro ejemplo, una unidad enlazadora tiene un sitio reactivo que tiene un grupo nucleófilo que reacciona con un grupo electrófilo presente en una unidad de ligando, tal como un anticuerpo. El grupo electrófilo de un anticuerpo proporciona un sitio cómodo para su unión con una unidad enlazadora. Los grupos electrófilos de un anticuerpo útiles incluyen, pero sin limitación, grupos carbonilo de aldehídos y acetonas. El heteroátomo del grupo nucleófilo de una unidad enlazadora reacciona con un grupo electrófilo de un anticuerpo y constituye un enlace covalente con el anticuerpo. Los grupos nucleófilos de una unidad enlazadora útiles incluyen, pero sin limitación, hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, hidrazina carboxilato, y arilhidrazida.

Resto de fármaco y síntesis del enlazador

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

Los restos de fármaco auristatina/dolastatina se pueden preparar de acuerdo con los métodos generales de: la patente de los Estados Unidos nº 5.635.483; la patente de los Estados Unidos nº 5.780.588; Pettit et al., 1989, J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al., 1998, AntiCancer Drug Design 13:243-277; y Pettit et al., 1996, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863.

Esquema I. Ruta de síntesis en fase sólida



Condiciones de reacción (a): piperidina al 20 %/DMF, (b) Fmoc-W₁ (2-5 equiv.), HATU (2-5 equiv.) y DIEA, (4-10

equiv.), (c) piperidina al 20 %/DMF, (d) Fmoc-NH-CH(X)-COOH (2 equiv.) HATU (2 equiv.) y DIEA (4 equiv.), (e) piperidina al 20 %/DMF, (f): Fmoc Dap (2 equiv.) HATU (2 equiv.) y DIEA (4 equiv.), (g) piperidina al 20 %/DMF, (h) Dov-Val-Dil-OH (2 equiv.), HATU (2 equiv.), y DIEA (4 equiv.), (i): TFA al 95 %/diclorometano.

5 Los aminoácidos no comercialmente disponibles precargados en una resina lábil ácida adecuada, preferentemente una resina de 1,2-diaminoetano, se pueden cargar en una resina de 1,2-diaminoetanotritilo como se describe en el procedimiento general SP(a). La carga se puede determinar mediante un ensayo de cuantificación espectrofotométrico Fmoc. Los niveles de carga (mmol/g) de los aminoácidos comercialmente disponibles precargados en una resina de 1,2-diaminoetanotritilo se pueden determinar como se describe en el procedimiento general SP(b). A continuación, los péptidos se pueden ensamblar en la resina cargada con los aminoácidos de la unidad de aminoácido mediante acoplamiento Fmoc-aminoácido usando el reactivo de acoplamiento adecuado. preferentemente HATU/DIEA, seguido por la desprotección de Fmoc y el posterior acoplamiento con los reactivos que constituyen la unidad de fármaco. La síntesis de la unidad de fármaco se puede llevar a cabo a continuación por acoplamiento de Fmoc-dolaproína usando el agente de acoplamiento adecuado preferentemente HATU/DIEA, seguido por la desprotección de Fmoc y el posterior acoplamiento del tripéptido Fmoc-MeVal-Val-Dil. La rutina de acoplamiento en fase sólida es bien conocida en la materia, y se describe en el procedimiento general SP(c). La desprotección final de los péptidos y la escisión de la resina se puede llevar a cabo fácilmente de acuerdo con el procedimiento general SP(d).

20 Los compuestos enlazadores de fármacos que contienen solamente un aminoácido en la unidad enlazadora se prepararon siguiendo el procedimiento anterior, pero sin realizar las etapas (b) y (c).

Los compuestos enlazadores de fármacos que contienen más de 2 aminoácidos en la unidad enlazadora se prepararon incorporando más etapas (b), (c) con Fmoc-W₃

25 Las versiones monometiladas de los enlazadores de fármaco se prepararon sustituyendo Dov-Val-Dil-OH en la etapa (h) por Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH. Fmoc se eliminó por tratamiento con piperidina al 20 %/DMF antes de escindir el compuesto de la resina, etapa (i).

30 Las auristatinas que contienen varios aminoácidos en el extremo C del fármaco se generaron usando el correspondiente Fmoc-NH-CH(X)-COOH en la etapa (d): por ejemplo, Fmoc-fenilalanina para auristatina F (AF); Fmoc-metionina para auristatina M (AM); Fmoc-triptófano para auristatina W (AW), etc.

Procedimiento general SP(a). Carga de la resina

35 El Fmoc-aminoácido se suspendió en un disolvente anhidro tal como CH₂Cl₂ y DIEA. La mezcla resultante se añadió a una jeringa que contenía resina de 1,2-diaminoetanotritilo. La mezcla se agitó a temperatura ambiente, a continuación la resina se filtró, se lavó con disolventes, tales como DCM/MeOH/DIEA, MeOH, DCM, DMF, etil éter, y se secó a vacío. La resina se dejó resina a vacío durante la noche.

40 La carga se determinó por cuantificación mediante Fmoc. Una cantidad conocida de resina se pesa en un matraz aforado, y se introduce en el matraz un disolvente tal como piperidina al 20 %/DMF. La mezcla se deja escindir durante aproximadamente 1 h, con agitación ocasional. Se transfiere al matraz un disolvente tal como DMF para llevar el volumen total al nivel preconfigurado (por ejemplo, 10 ml). Se preparó una solución diana con un volumen equivalente de piperidina al 20 %/DMF en un matraz aforado. El espectrofotómetro se pone a cero con la solución diana. La absorbancia se mide a 301 nm y el nivel de carga viene dado por:

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

50 donde A₃₀₁ es la absorbancia a 301nm, 7800 es el coeficiente de extinción del aducto piperidina-fluorenona, y ps es el peso de la resina utilizada en miligramos. La cuantificación por Fmoc se realiza generalmente por duplicado.

Procedimiento general SP(b). Cuantificación por Fmoc de resinas precargadas comercialmente disponibles

55 Fmoc-Cl se disuelve un disolvente anhidro, tal como CH₂Cl₂ para preparar una solución de trabajo. Esta solución se transfiere a una jeringa de plástico que contiene aminoácido-resina de 1,2-diaminoetanotritilo. La mezcla se agita durante aproximadamente 2 h. A continuación, la resina se filtró y se lavó con los disolventes adecuados, como DMF, CH₂Cl₂ o etil éter, y se secó a vacío durante aproximadamente 2 h. La resina se sometió a un ensayo de aminas de Kaiser. Si se obtiene un resultado negativo (amina libre completamente protegida), la cuantificación por Fmoc para obtener el nivel de carga se lleva a cabo como se muestra en el procedimiento general SP(a).

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

65 Una solución de piperidina al 20 %/DMF se añade a la jeringa con una resina que contiene PET fritado, y la mezcla se agita durante aproximadamente 2 h. A continuación, la resina se filtró y se lavó con disolventes adecuados como DMF, DCM o etil éter, y se secó a vacío durante aproximadamente 2 h.

Una solución de Fmoc-aminoácido, HATU y DIEA en DMF se añadió a continuación a la resina, que se agitó durante aproximadamente 4 h, se lavó, y se secó. De esta manera, Fmoc-Phe, Fmoc-Dap, y Dov-Val DiI-OH (o Fmoc-MeVal-Val-Dil) se acoplaron secuencialmente en la resina como se ha descrito anteriormente.

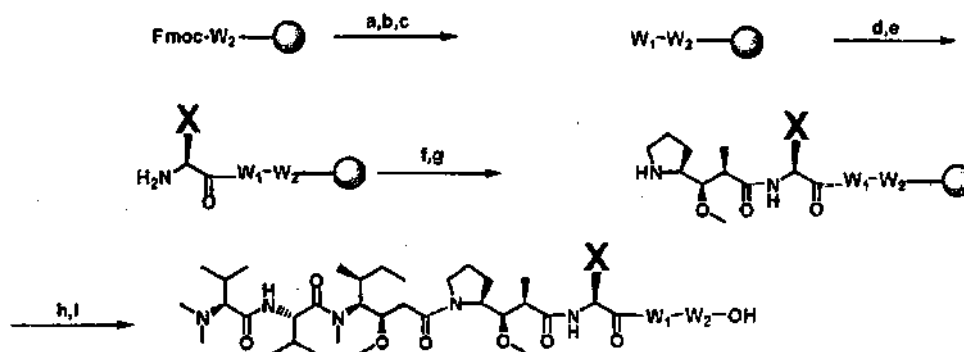
5

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

10

A continuación, la resina se trató con una solución de TFA al 95 %/diclorometano, y se lavó con T al 95 %/diclorometano. El filtrado combinado se dejó reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min, después se concentró a sequedad. El producto se purificó mediante HPLC preparativa en fase invertida.

Como alternativa, los enlazadores de fármacos se pueden preparar en resinas de clorotritilo como se muestra en el Esquema 1a:



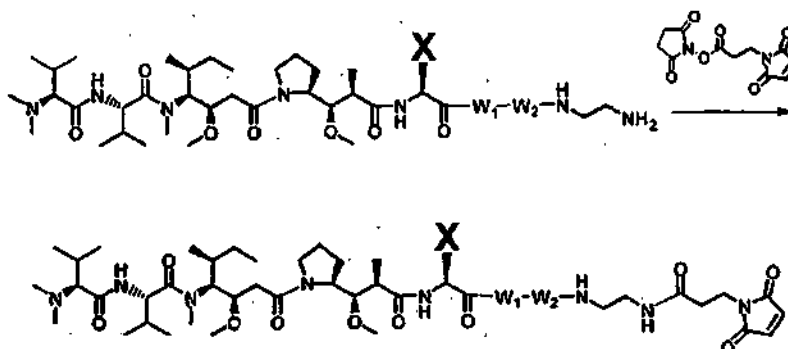
15 Se utilizan las mismas condiciones de reacción que en el Esquema 1. (Nota: el hidroxilo libre después de las etapas h, i forma parte de W_2 .)

Finalización de la síntesis del enlazador de fármaco

20 Para finalizar la síntesis del compuesto enlazador de fármaco, e introducir un sitio reactivo que se usarán en la conjugación con el ligando, el compuesto enlazador de fármaco parcial, a medida que se escinde de la resina, se hace reaccionar con otra parte de una unidad ensanchadora para formar un compuesto enlazador de fármaco completo.

25 En un aspecto, el compuesto enlazador de fármaco parcial reacciona con un ácido carboxílico o un éster activado de la segunda parte de la unidad ensanchadora. Véase, por ejemplo el esquema 2:

Esquema 2

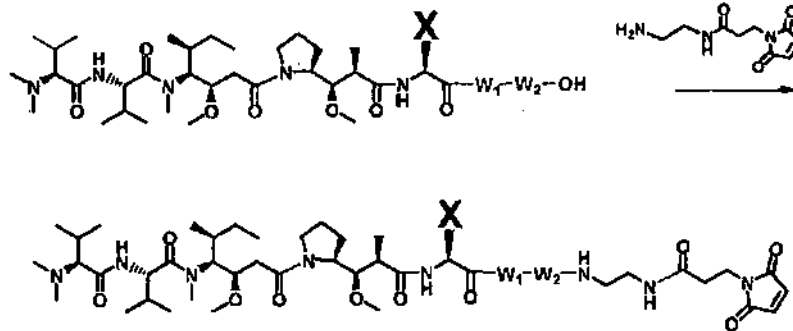


30

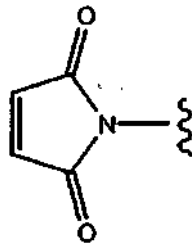
Condiciones de reacción: Éster NHS del ácido maleimidopropiónico (2 equiv.), DIEA (2 equiv.), DMF.

En otro ejemplo, el compuesto enlazador de fármaco preparado de acuerdo con el Esquema 1 reacciona con una amina de la segunda parte de la unidad ensanchadora siguiendo los procedimientos de acoplamiento convencionales en la química de péptidos. Véase por ejemplo el Esquema 2a.

35 **Esquema 2a**



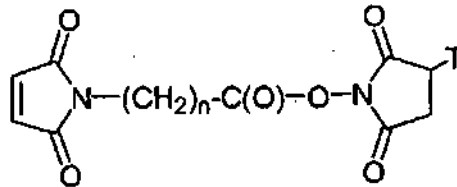
En un ejemplo, la segunda parte de la unidad ensanchadora también contiene un grupo aceptor de tior. Los grupos aceptores de tior aceptables incluyen, por ejemplo; grupos haloacetamida o grupos maleimida que tienen la formula



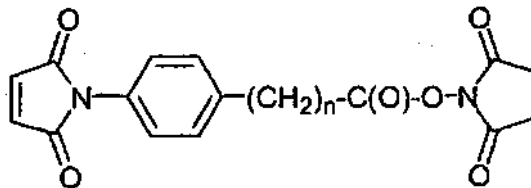
5

las unidades ensanchadoras adecuadas se pueden obtener de fuentes comerciales, como Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), o como se muestra a continuación. Además, Las unidades ensanchadoras se pueden preparar como se resume en el Esquema 3 siguiente. El Esquema 3 ilustra una síntesis general de unidades ensanchadoras ilustrativas que incluyen una unidad ensanchadora de maleimida.

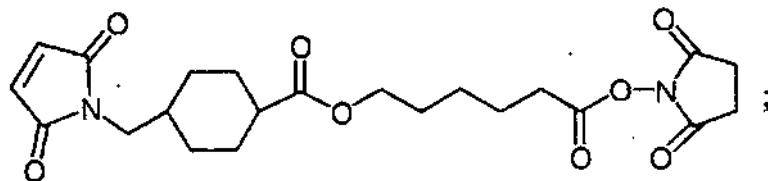
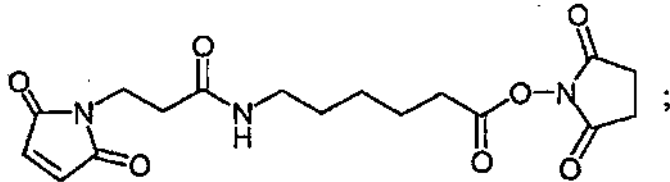
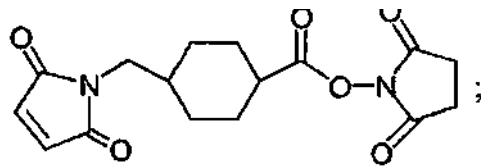
10



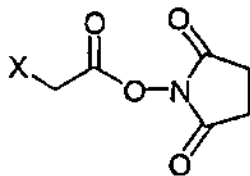
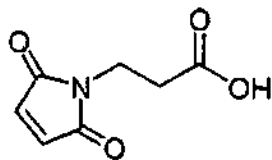
donde n es un número entero comprendido entre 1-10 y T es -H o -SO₃Na;



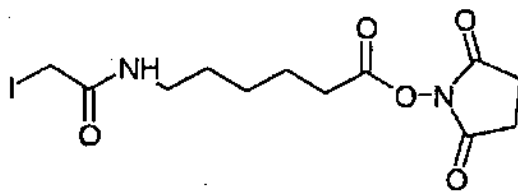
donde n es un número entero comprendido entre 0-3;



y



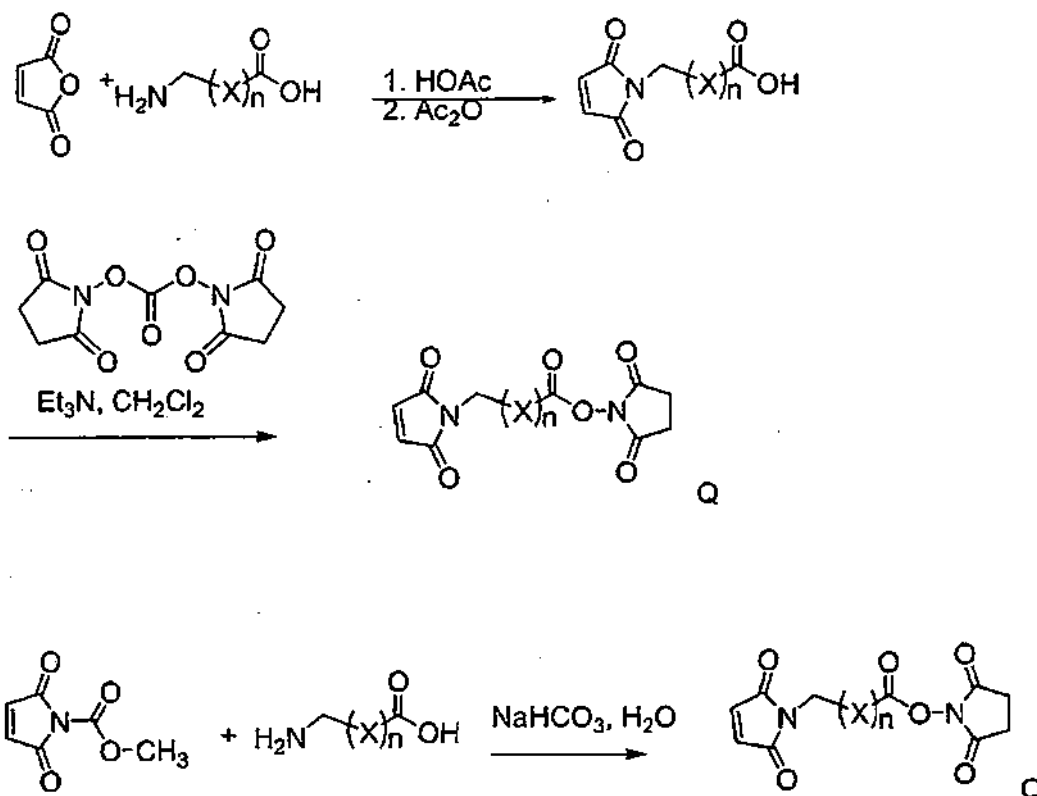
donde X es -Br o -I; y



5

El siguiente Esquema 3 muestra métodos para obtener una unidad ensanchadora que contiene un éster activado para reaccionar con una unidad de aminoácido y que tiene una maleimida para su conjugación con una unidad de ligando.

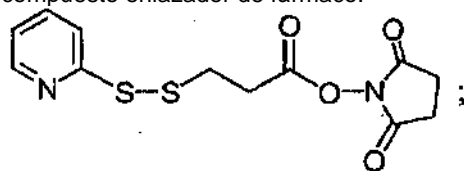
10

Esquema 3

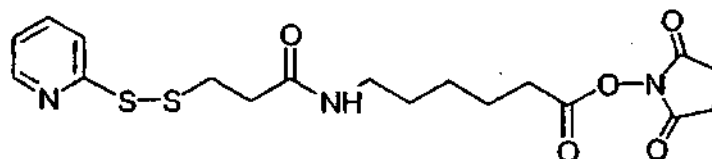
donde X es -alquileo-, -arileno-, carbociclo C₃-C₈, heterociclo C₃-C₈, -heteroalquileo-; y n es un número entero comprendido entre cualquiera de 0-1.

5

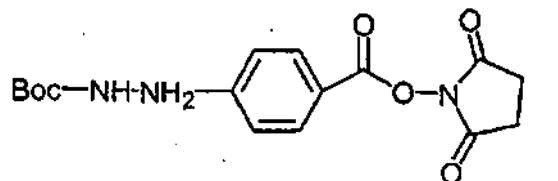
Otro ligando útil reactivo con unidades ensanchadoras contiene disulfuros activados, tal como se muestra a continuación. Se pueden introducir en un compuesto enlazador de fármaco por reacción de los siguientes compuestos intermedios con la función amina del compuesto enlazador de fármaco:



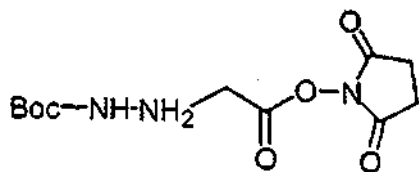
10 y



unidades ensanchadoras de fórmula (Va) se pueden introducir en una unidad enlazadora por reacción de los siguientes compuestos intermedios con el extremo N de la unidad aminoácido:



15 y



Otras unidades ensanchadoras se pueden sintetizar de acuerdo con procedimientos conocidos. Las unidades ensanchadoras de aminooxi de la fórmula que se muestra a continuación se pueden preparar tratando haluros de alquilo con N-Boc-hidroxilamina de acuerdo con los procedimientos descritos en Jones et al., 2000, Tetrahedron Letters 41(10):1531-1533; y en Gilon et al., 1967, Tetrahedron 23(11):4441-4447. El grupo aminooxi reacciona con un grupo reactivo de la unidad de ligando.

$\text{NH}_2\text{-O-R}^9\text{-NH-}$ o $\text{NH}_2\text{-O-R}^9\text{-O-}$

en la que R^9 se selecciona entre el grupo que consiste en alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$, -arileno-, heteroalquileo- $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ -, heterociclo- $\text{C}_3\text{-C}_8$ -, alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ arileno-, -arileno-alquileo - $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -($\text{C}_3\text{-C}_8$ carbociclo)-, -(carbociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -, -alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-, y -(heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_8$)-alquileo $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ -.

Los ensanchadores de isotiocianato de la fórmula que se muestra a continuación se pueden preparar a partir de cloruros del ácido isocianatocarboxílico como se describe en Angew. Chem., 87(1.4):517 (1975). El grupo isotiocianato reacciona con un grupo reactivo de la unidad de ligando.

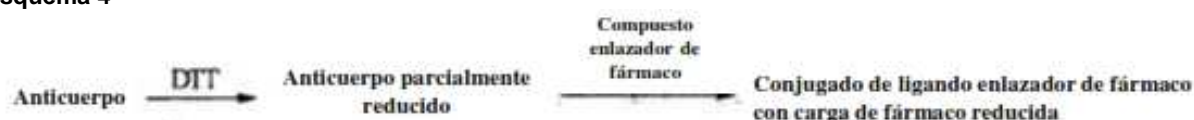
$\text{S=C=N-R}^9\text{-NH-}$ o $\text{S=C=N-R}^9\text{-O-}$

donde $\text{-R}^9\text{-}$ es como se describe en el presente documento.

Conjugación de los compuestos enlazadores de fármacos con las unidades del ligando

El Esquema 4 ilustra metodología útil para preparar conjugados de ligando enlazador de fármaco que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 fármacos por unidad de ligando, que se ilustra mediante un anticuerpo. Un anticuerpo se trata con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) para reducir todo o parte de los restos disulfuro de cisteína intercadena para formar grupos tiol de cisteína fuertemente nucleófilos ($\text{-CH}_2\text{SH}$). El anticuerpo parcialmente reducido puede seguidamente reaccionar con compuestos enlazadores de fármacos, o reactivos de unidades enlazadoras, con grupos funcionales electrófilos tales como maleimida o α -halocarbonilo, de acuerdo con el procedimiento de conjugación de la página 766 de Klussman et al., 2004, Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773.

Esquema 4



Por ejemplo, un anticuerpo, disuelto en borato de sodio 500 nM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0, se trata con un exceso de ditioneitol 100 mM (DTT). Tras una incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambia por elución en resina Sephadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. El valor tiol/Ab se comprueba determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia de la solución medida a 280 nm y de la concentración de tiol determinada por reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido se disuelve en PBS y se enfría intensamente sobre hielo. El compuesto enlazador de fármaco en DMSO, disuelto en acetonitrilo y agua a concentración conocida, se añade al anticuerpo reducido intensamente enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para desactivar la reacción y proteger todos los grupos tiol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga, y el ADC se purifica y se desala por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 μm en condiciones estériles, y se congela para su almacenamiento.

Se pueden preparar varios ADC, con varios enlazadores y varios restos de fármaco, siguiendo los protocolos de los Ejemplos y caracterizados mediante HPLC y ensayo de carga de fármaco.

Composiciones y métodos de administración

También se describe una composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz de un conjugado de ligando enlazador de fármaco y/o un compuesto enlazador de fármaco y un portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones son adecuadas para su administración veterinaria o humana.

Las actuales composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permite que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un sólido o un líquido. Las rutas de administración típicas incluyen, sin limitación, parenteral, ocular e intratumoral. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares o intraesternales o técnicas de infusión. En un ejemplo, las composiciones se administran por vía parenteral. En un ejemplo específico, las composiciones se administran por vía intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera que permitan que un conjugado de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. La composición puede estar en forma de una o más unidades de dosificación, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una dosis unitaria simple, y un recipiente de un conjugado de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco en forma líquida puede incluir una pluralidad de dosis unitarias.

Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden no ser tóxicos en las cantidades utilizadas. Será evidente para una persona normalmente experta en la materia que la dosificación óptima del principio o principios activos en la composición farmacéutica dependerá de varios factores: Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, ser humano), la forma concreta de administración del ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco, la forma de administración, y la composición utilizada.

El portador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser sólido o estar en forma de partículas, de forma que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimidos o polvo. El vehículo o vehículo(es) pueden ser líquidos. Además, el vehículo o vehículo(es) pueden estar en forma de partículas.

La composición puede estar en la forma de o un líquido, por ejemplo, una solución, emulsión o suspensión. En una composición para su administración mediante inyección se puede incluir uno o más de un tensioactivo, conservante, agente mojante, agente dispersante, agentes suspensores, tampón, estabilizante y agente isotónico.

Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, también pueden incluir uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, suero salino, preferente suero salino fisiológico, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como monoglicéridos o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio disolvente o de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos, fosfatos o aminoácidos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. La composición parenteral se puede introducir en una ampolla, una jeringa desechable o un vial multidosis hecho de vidrio, plástico u otro material. El suero salino fisiológico es un adyuvante ilustrativo. Una composición inyectable es, preferentemente, estéril.

La cantidad de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco que es eficaz para el tratamiento de un trastorno o dolencia dependerá de la naturaleza del trastorno o dolencia, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, se pueden utilizar de manera opcional ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en las composiciones también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se decidirá de acuerdo con el criterio del especialista y las circunstancias de cada paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco de forma que se obtenga una dosificación adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos aproximadamente 0,01 % de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco en peso de la composición. Por ejemplo, se pueden preparar composiciones farmacéuticas de manera que una dosis unitaria parenteral comprenda de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2 % en peso de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco.

Para administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco por kg de peso corporal del paciente. En un ejemplo, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco por kg de peso corporal del paciente. En otro ejemplo, la cantidad administrada puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco.

En general, la dosificación de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco administrado a un paciente está comprendido de forma típica entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal del paciente. En un ejemplo, la dosificación administrada a un paciente está comprendida entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del paciente. En otro ejemplo, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del paciente. La dosificación administrada a un paciente puede estar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal del paciente. En otro ejemplo más, la dosificación administrada a un

paciente puede estar comprendida entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal del paciente. En otro ejemplo más, la dosificación administrada puede estar comprendida entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal del paciente.

5 El ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco se pueden administrar por cualquier ruta conveniente. por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo. La administración puede ser sistémica o local. Se conocen varios sistemas de administración, por ejemplo, encapsulación de liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y se pueden utilizar para administrar un ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco. En determinados ejemplos, se administra al paciente más de un ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco.

10 En ejemplos específicos, puede ser deseable administrar uno o más conjugados de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco localmente a una zona que necesita tratamiento. Esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante una cirugía; aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía; mediante inyección; mediante un catéter; o mediante un implante, siendo el implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialísticas, o fibras. En un ejemplo, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o preneoplásico. En otro ejemplo, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmune.

15 En otro ejemplo más, el ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco se pueden suministrar en un sistema de liberación controlada, tales como pero sin limitarse a, una bomba o bien se pueden utilizar diferentes materiales poliméricos. En otro ejemplo más, un sistema de liberación controlada se puede situar cerca de la diana del ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco, *por ejemplo*, el hígado, requiriendo de esta manera solo una fracción de la dosis sistémica (*véase, por ejemplo*, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, más arriba, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Se pueden utilizar otros sistemas de liberación controlada descritos en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

20 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, que se administra junto con el ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los derivados de petróleo, o de origen animal, vegetal o sintético. Los vehículos pueden ser suero salino, y similares. Además, se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizantes y de otro tipo. En una realización, cuando se administran a un paciente, el ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco y los vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo ilustrativo cuando el ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco se administran por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como vehículos líquidos, especialmente para soluciones inyectables. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden incluir cantidades pequeñas de agentes mojanteros o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH.

30 Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, aglomerados, polvos, formulaciones de liberación continua, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

35 En un ejemplo, los conjugados de ligando enlazador de fármaco y/o compuestos enlazadores de fármacos se formulan de acuerdo con procedimientos rutinarios como composiciones farmacéuticas adaptadas para administración intravenosa a animales, especialmente seres humanos. Normalmente, los portadores o vehículos para administración intravenosa son soluciones acuosas estériles tamponadas. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaína para disminuir el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran tanto por separado o se mezclan conjuntamente en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o sobrecillo que indica la cantidad de principio activo. Cuando un ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco se va administrar mediante infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con un frasco para infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o suero salino. Cuando el ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o suero salino para que los componentes se mezclen antes de la administración.

40 La composición puede incluir varios materiales que modifican la forma fisiológica de una forma farmacéutica sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que constituyen una envoltura de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que constituyen la envoltura de revestimiento son normalmente inertes, y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, shellac, y otros agentes gastrorresistentes. Como alternativa, los principios activos se pueden incluir en una cápsula de gelatina.

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

65 **Usos terapéuticos de los conjugados de ligando enlazador de fármaco y/o compuestos enlazadores de**

fármacos

Los conjugados de ligando enlazador de fármaco y/o compuestos enlazadores de fármacos son útiles para tratar el cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en un paciente.

5

Tratamiento del cáncer

Los conjugados de ligando enlazador de fármaco y los compuestos enlazadores de fármacos son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa, ocasionando la apoptosis de una célula tumoral o célula cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Los conjugados de ligando enlazador de fármaco y/o compuestos enlazadores de fármacos se pueden usar de acuerdo con esto en varios escenarios para el tratamiento de cánceres en animales. Los conjugados de ligando enlazador de fármaco se pueden utilizar para suministrar un fármaco o unidad de fármaco a una célula tumoral o célula cancerosa Sin desear quedar ligado por la teoría, la unidad de ligando de un conjugado de ligando enlazador de fármaco se pueden unir o se pueden asociar a una célula cancerosa o a un antígeno asociado a una célula tumoral, y el conjugado de ligando enlazador de fármaco se puede capturar (internalizar) en una célula tumoral o célula cancerosa mediante endocitosis mediada por el receptor u otro mecanismo de internalización. El antígeno se puede unir a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de la matriz extracelular asociada a la célula tumoral o célula cancerosa. Una vez en el interior de la célula, una o más secuencias específicas de péptido en o cerca del extremo proximal de la unidad de fármaco de la unidad enlazadora se escinden hidrolíticamente mediante uno o más proteasas asociadas a una célula tumoral o célula cancerosa, dando como resultado la liberación de la unidad de fármaco. La unidad de fármaco liberada queda libre, a continuación, para migrar al interior de la célula e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. El conjugado de ligando enlazador de fármaco también se puede escindir mediante una proteasa intracelular para liberar el resto de fármaco. Como alternativa, el fármaco o unidad de fármaco se escinde desde el conjugado de ligando enlazador de fármaco en el exterior de la célula tumoral o célula cancerosa, y a continuación el fármaco o unidad de fármaco penetra en el interior de la célula.

10

15

20

25

30

Los conjugados de ligando enlazador de fármaco proporcionan un direccionamiento farmacológico contra el fármaco o tumor específico de la conjugación, reduciendo de esta forma la toxicidad general del fármaco. Las unidades enlazadoras estabilizan los conjugados de ligando enlazador de fármaco en la sangre, pero son escindibles por las proteasas específicas de tumor en el interior de la célula, liberando una unidad de fármaco.

En un ejemplo, la unidad de ligando se une a la célula tumoral o célula cancerosa.

35

En otro ejemplo, la unidad de ligando se une a un antígeno de una célula tumoral o célula cancerosa que se encuentra en la superficie de la célula tumoral o célula cancerosa.

40

En otro ejemplo, La unidad de ligando se une a un antígeno de una célula tumoral o célula cancerosa que es una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa.

45

La especificidad de la unidad de ligando por una célula tumoral o célula cancerosa concreta puede ser importante para determinar los tumores o cánceres que se tratan de la manera más eficaz. Por ejemplo, un conjugado de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco que tiene una unidad de ligando BR96 puede ser útil para tratar carcinomas positivos para antígenos entre los que se incluyen los de pulmón, mama, colon, ovarios, y páncreas. Los conjugados de ligando enlazador de fármaco que tienen una unidad de ligando para su unión a un anti-CD30 o un anti-CD70 pueden ser útiles para tratar neoplasias hematológicas.

50

Otros tipos particulares de cánceres que se pueden tratar con un conjugado de ligando enlazador de fármaco y/o un compuesto enlazador de fármaco incluyen, pero sin limitación, los descritos en la Tabla 1:

Tabla 1

Tumores sólidos, incluyendo pero sin limitarse a:

55

fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomas, rhabdomiomas, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer óseo, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello de útero, cáncer uterino, cáncer de testículo, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma,

60

65

cánceres transmitidos por la sangre, incluyendo pero sin limitarse a leucemia linfoblástica aguda "ALL", leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia mielógena aguda "AML", leucemia promielótica aguda "APL", leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia aguda no diferenciada, leucemia mielocítica crónica "CML", leucemia linfocítica crónica "CLL", leucemia de células pilosas, leucemias de mieloma múltiple aguda y crónica: linfoblástica, mielógena, linfocítica, linfomas de leucemias mielocíticas: enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, Policitemia vera

Tratamiento multimodal para el cáncer

Los cánceres incluyendo, pero sin limitación, un tumor, metástasis, u otra enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado, se puede tratar o inhibir mediante la administración de un conjugado de ligando enlazador de fármaco o compuesto enlazador de fármaco.

En el presente documento también se describen métodos para tratar el cáncer, incluyendo la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz de un conjugado de ligando enlazador de fármaco y un agente quimioterapéutico. En un ejemplo, el agente quimioterapéutico es uno para el que se ha descubierto que, como tratamiento contra el cáncer, no genera resistencia. En otro ejemplo, el agente quimioterapéutico es uno para el que se ha descubierto que, como tratamiento contra el cáncer, genera resistencia. Los conjugados de ligando enlazador de fármaco se pueden administrar a un paciente que también se ha sometido a cirugía como tratamiento contra el cáncer.

En algunos ejemplos, el paciente recibe también un tratamiento adicional, tal como radioterapia. En un ejemplo específico, el conjugado de ligando enlazador de fármaco se administra simultáneamente con el agente quimioterapéutico o con radioterapia. En otro ejemplo específico, el agente quimioterapéutico o radioterapia se administra antes o después de la administración de un conjugado de ligando enlazador de fármaco.

Se puede administrar un agente quimioterapéutico durante una serie de sesiones. Se puede administrar una cualquiera de una combinación de agentes quimioterapéuticos, tal como un agente o agentes quimioterapéuticos habituales en el tratamiento.

Adicionalmente, los métodos para el tratamiento del cáncer con un conjugado de ligando enlazador de fármaco y/o un compuesto enlazador de fármaco se proporcionan como alternativa a la quimioterapia o radioterapia, donde la quimioterapia o la radioterapia se ha demostrado que es, o que puede ser, tóxica. *por ejemplo*, da como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando. El paciente que se está tratando, opcionalmente, puede tratarse con otro tratamiento del cáncer como la cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo de qué tratamiento se considera aceptable o soportable.

Los conjugados de ligando enlazador de fármaco y/o compuestos enlazadores de fármacos también se pueden usar *in vitro* o *ex vivo*, tal como en el tratamiento de determinados cánceres, incluyendo, pero sin limitación, leucemias y linfomas, implicando dicho tratamiento trasplantes de citoblastos autólogos. Esto puede implicar un procedimiento multietapa en el que citoblastos hematopoyéticos autólogos del animal se recogen y limpian de todas las células cancerosas, a continuación, la población de células de la médula ósea remanentes del animal se erradica mediante la administración de una dosis elevada de conjugados de ligando enlazador de fármaco y/o compuesto enlazador de fármaco con o sin radioterapia coadyuvante a dosis elevada, y el injerto de citoblastos se vuelve a infundir al animal. A continuación, se proporciona tratamiento de soporte mientras se restaura la función de la médula ósea del paciente.

Tratamiento de enfermedades autoinmunes

Los conjugados de ligando enlazador de fármaco y compuestos enlazadores de fármacos son útiles para destruir o inhibir la replicación de una célula que produce una enfermedad autoinmune o para tratar una enfermedad autoinmune. Los conjugados de ligando enlazador de fármaco y los compuestos enlazadores de fármacos se pueden usar de acuerdo con esto en varios escenarios para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un paciente. Los conjugados de ligando enlazador de fármaco se pueden utilizar para suministrar una unidad de fármaco a una célula diana. Sin desear quedar vinculado a una teoría, el conjugado de ligando enlazador de fármaco se asocia con un antígeno en la superficie de una célula diana, y el conjugado de ligando enlazador de fármaco seguidamente se lleva al interior de la célula diana por endocitosis mediada por receptor. Una vez en el interior de la célula, una o más secuencias específicas de péptido en o cerca del extremo de la unidad de fármaco proximal a la unidad enlazadora se escinden hidrolítica o enzimáticamente dando como resultado la liberación del fármaco o de la unidad de fármaco. El fármaco o unidad de fármaco liberado queda libre para migrar al citosol e inducir actividades citotóxicas o citostáticas. El conjugado de ligando enlazador de fármaco también se puede escindir mediante una proteasa intracelular para liberar el fármaco o resto de fármaco. Como alternativa, el fármaco se escinde desde el conjugado de ligando enlazador de fármaco en el exterior de la célula diana, y a continuación el fármaco o unidad de fármaco penetra en el interior de la célula.

En un ejemplo, la unidad de ligando se une a un antígeno autoinmune. En un aspecto, el antígeno se encuentra en la

superficie de una célula implicada en una dolencia autoinmune.

En otro ejemplo, la unidad de ligando se une a un antígeno autoinmune que se encuentra en la superficie de una célula.

En un ejemplo, la unidad de ligando se une a linfocitos activados que están asociados con la patología autoinmune.

En un ejemplo adicional, el conjugado de ligando enlazador de fármaco o compuesto enlazador de fármaco destruye o inhibe la multiplicación de células que producen un anticuerpo autoinmune asociado con una enfermedad autoinmune concreta.

los tipos concretos de enfermedades autoinmunes que se pueden tratar con los conjugados de ligando enlazador de fármaco y los compuestos enlazadores de fármacos incluyen, pero sin limitación, trastornos relacionados con linfocitos Th2 (*por ejemplo*, dermatitis atópica, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, y enfermedad de injerto contra hospedador); trastornos relacionados con linfocitos Th1 (*por ejemplo*, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, y tuberculosis); trastornos relacionados con linfocitos B activados (*por ejemplo*, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide, y diabetes tipo I); y los descritos en la Tabla 2.

Tabla 2

Hepatitis crónica activa, Enfermedad de Addison, Alveolitis alérgica, Reacción alérgica, Rinitis alérgica, Síndrome de Alport, Anafilaxia, Espondilitis anquilosante, Síndrome anti-fosfolípidos, Artritis, Ascariasis, Aspergilosis, Alergia atópica, Dermatitis atópica, Rinitis atópica, Enfermedad de Behcet, Pulmón de Bird-Fancier Asma bronquial, Síndrome de Caplan Cardiomiopatía, Enfermedad celíaca, Enfermedad de Chagas, Glomerulonefritis crónica, Síndrome de Cogan, Enfermedad por crioaglutininas, Infección por rubeola congénita Síndrome CREST, Enfermedad de Crohn, Crioglobulinemia, Síndrome de Cushing, Dermatomiostitis, Lupus discoide, Síndrome de Dressler, Síndrome de Eaton-Lambert, Infección por Ecovirus, Encefalomielititis, Oftalmopatía endocrina, Infección por el virus Epstein-Barr Virus, Náuseas equinas, Eritematosi, Síndrome de Evan, Síndrome de Felty, Fibromialgia, Ciclitis de Fuch, Atrofia gástrica, Alergia gastrointestinal, Arteritis de células gigantes, Glomerulonefritis, Síndrome de Goodpasture, Enfermedad de injerto contra hospedador Enfermedad de Grave, Enfermedad de Guillain-Barre, Tiroiditis de Hashimoto, Anemia hemolítica, Púrpura de Henoch-Schonlein, Atrofia idiopática de las glándulas Suprarrenales, Fibrosis pulmonar idiopática, Nefropatía de IgA, Enfermedad inflamatoria del intestino, Diabetes mellitus insulino dependiente, Artritis juvenil, Diabetes mellitus juvenil, Síndrome de Lambert-Eaton, Laminitis, Liquen plano, Hepatitis lupoide, Lupus, Linfopenia, Enfermedad de Menière, Enfermedad del tejido conectivo mixto, Esclerosis múltiple, Miastenia grave, Anemia perniciosa, Síndromes poliglandulares, Demencia presenil, Agammaglobulinemia primaria, Cirrosis biliar primaria, Psoriasis, Artritis psoriática, Fenómeno de Raynauds, Aborto recurrente, Síndrome de Reiter, Fiebre reumática, Artritis reumatoide, Síndrome de Sampter, Esquistosomiasis, Síndrome de Schmidt, Escleroderma, Síndrome de Shulman, Síndrome de Sjorgen, Síndrome de Stiff-Man, Oftalmía simpática, Lupus sistémico eritematoso, Arteritis de Takayasu, Arteritis temporal, Tiroiditis, Trombocitopenia, Tirotoxicosis, Necrosis epidérmica tóxica, Resistencia a la insulina de tipo B, Diabetes mellitus Tipo 1, Colitis ulcerosa, Uveítis, Vitíligo, Macroglobulinemia de Waldenstrom, Granulomatosis de Wegener,

Tratamiento multifármaco de enfermedades autoinmunes

Se describen métodos para tratar una enfermedad autoinmune que incluyen la administración a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado de ligando enlazador de fármaco o compuesto enlazador de fármaco y otro agente terapéutico conocido para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

Tratamiento de enfermedades infecciosas

Los conjugados de ligando enlazador de fármaco y compuestos enlazadores de fármacos son útiles para destruir o inhibir la multiplicación de una célula que produce una enfermedad infecciosa o para tratar una enfermedad infecciosa. Los conjugados de ligando enlazador de fármaco y los compuestos enlazadores de fármacos se pueden usar de acuerdo con esto en varios escenarios para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente. Los conjugados de ligando enlazador de fármaco se pueden utilizar para suministrar una unidad de fármaco a una célula diana. En un ejemplo, la unidad de ligando se une a la célula de la enfermedad infecciosa.

En un ejemplo, los conjugados destruyen o inhiben la multiplicación de células que producen una enfermedad infecciosa concreta.

Los tipos concretos de enfermedades infecciosas que se pueden tratar con los conjugados de ligando enlazador de fármaco incluyen, pero sin limitación, los descritos en la Tabla 3:

Tabla 3

Enfermedades bacterianas:

5 Difteria, Tosferina, Bacteremia oculta, Infección del tracto urinario Gastroenteritis, Celulitis, Epiglotitis, Traqueítis, Hipertrofia de adenoides, Absceso retrofaringeo, Impétigo, Ectima, Neumonía, Endocarditis, Artritis séptica Neumococo, Peritonitis, Bacteremia, Meningitis, Meningitis purulenta aguda, Uretritis, Cervicitis, Proctitis, Faringitis, Salpingitis, Epididimitis, Gonorrea, Sífilis, Listeriosis, Ántrax, Nocardiosis, Salmonela, Fiebre tifoidea, Disentería, Conjuntivitis, Sinusitis, Brucelosis, Tularemia, Cólera, Plaga bubónica, Tétanos, Enteritis necrosante, Actinomycosis, Infecciones anaerobias mixtas, Sífilis, Fiebre recurrente, Leptospirosis, Enfermedad de Lyme, Fiebre por mordedura de rata, Tuberculosis, Linfadenitis, Lepra, Clamidia, Neumonía por clamidia Tracoma, Conjuntivitis por inclusión,

Enfermedades fúngicas sistémicas:

Histoplasmosis, Coccidioidomicosis, Blastomicosis, Esporotricosis, Criptococosis, Candidiasis sistémica, Aspergilosis, Mucormycosis, Micetoma, Cromomicosis

15 Enfermedades por rickettsia:

Tifus, Fiebre con manchas de las Montañas Rocosas, Erliquiosis, Rickettsiosis transmitida por la pulga oriental de la rata, viruela por Rickettsia, Fiebre Q Enfermedades parasíticas (bartonelosis):

20 Malaria, Babesiosis, Enfermedad del sueño africana. Enfermedad de Chagas, Leishmaniosis, Fiebre Dum-Dum, Toxoplasmosis, Meningoencefalitis, Queratitis, Entamebiasis, Giardiasis, Criptosporidiasis, Isosporiasis, Ciclosporiasis, Microsporidiosis, Ascariasis, Tricuriasis, Anquilostomiasis, Estrongiloidiasis Larva Migrans ocular, Triquinosis, Dracunculiasis, Filariasis linfática, Loiasis, Oncocercosis, Dirofilariasis, Esquistosomiasis, Picadura de notonéctido, paragonimiasis, Clonorchiasis, Fascioliasis, Fasciolopsiasis,

Opistorquiasis, Infección por cestodos, Hidatiasis, Enfermedad hidatídica alveolar

25

Enfermedades víricas:

30 Sarampión, Panencefalitis esclerosante subaguda, Resfriado común, Paperas, Rubeola, Roseola, Eritema infeccioso, Viruela aviar, Infección por virus sincitial respiratorio, Laringotraqueobronquitis, Bronquiolitis, Mononucleosis infecciosa, Poliomielititis, Herpangina, Fiebre aftosa humana. Enfermedad de Bornholm, Herpes genital, Verrugas genitales, Meningitis aséptica, Miocarditis, Pericarditis, Gastroenteritis, Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), Síndrome de Reye, Síndrome de Kawasaki, Gripe, Bronquitis, Neumonía atípica, Síndrome paragripal, Fiebre faringoconjuntival aguda, Queratoconjuntivitis epidémica, Virus del herpes simplex 1 (HSV-1), Virus del herpes simplex 2 (HSV-1), Herpes zoster, Infección por citomegalovirus, Rabia, Leucoencefalopatía multifocal progresiva, Kuru, Insomnio familiar fatal, Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, Paraparesis espástica tropical, Encefalitis equina occidental, Encefalitis de California, Encefalitis de St. Louis, Fiebre amarilla, Dengue, Coriomeningitis linfocítica, Fiebre de Lasa, Fiebre hemorrágica, Síndrome pulmonar por hantavirus, Infecciones por el virus Marburg, Infecciones por el virus del Ébola, Viruela

40

Tratamiento multifármaco de enfermedades infecciosas

45 Se describen métodos para tratar una enfermedad infecciosa que incluyen la administración a un paciente que lo necesita un conjugado de ligando enlazador de fármaco o compuesto enlazador de fármaco y otro agente terapéutico que es un agente dirigido contra la enfermedad infecciosa.

La invención se describe con más detalla en los ejemplos siguientes, que no están previstos para limitar el alcance de la invención.

50 **Ejemplos****Ejemplos 1-9:**

55 Ejemplo 1 - Síntesis general de una biblioteca de AF-dipéptido mediante síntesis en fase sólida - Preparación de la resina de Fmoc-AA-diaminoetanotritilo (1, AA = Valina)



60 Condiciones de reacción (a): Fmoc-aminoácido (2-5 equiv), HATU (2-5 equiv) o HBTU/HOBT (5 equiv), DIEA (4-10 equiv)

En un recipiente de reacción en fase sólida de 10 ml (jeringa de plástico con PET fritado) se introdujeron 1,08 g de resina de 1,2-diaminoetanotritilo (1,62 mmol según la etiqueta del fabricante), seguido por una solución de 1,1 g de Fmoc-Valina (3,24 mmol), 1,24 g de HATU (3,24 mmol), y 1,13 ml de DIEA (6,48 mmol) en 3 ml de DMF. El recipiente

se agitó durante 4 h a continuación la resina se lavó 6 veces, cada una de ellas sucesivamente con DMF, DCM y dietil éter y se secó a vacío. La finalización de la reacción se confirmó por un resultado negativo en el ensayo de Kaiser. Carga = 0,5 mmol/g según la cuantificación de Fmoc.

5 **Ejemplo 2 - Preparación de Fmoc-(D)Valina-resina de diaminoetanotritilo (1a, AA = (D)Valina)**

Fmoc-(D)Valina-resina de diaminoetanotritilo (1a) se preparó de la misma forma que en 1. Carga = 0,6 mmol/g.

10 **Ejemplo 3 - Preparación de Fmoc-Prolina resina de diaminoetanotritilo (2, AA = Prolina)**

Fmoc-Prolina resina de diaminoetanotritilo (2) se preparó de la misma forma que en 1. Carga = 0,7 mmol/g.

15 **Ejemplo 4 - Preparación de Fmoc-(D)Ácido aspártico(terc-butilo)-resina de diaminoetanotritilo (3, AA = (D)Ácido aspártico(t-butilo))**

Fmoc-(D)Ácido aspártico(terc-butilo)-resina de diaminoetanotritilo (3) se preparó de la misma forma que en 1 con la siguiente excepción: HBTU/HOBT se utilizó en lugar de HATU. Carga = 0,6 mmol/g.

20 **Ejemplo 5 - Preparación de Fmoc-(D)Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4, AA = (D)Lisina(boc))**

Fmoc-(D)Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4) se preparó de la misma manera que en 1. Carga = 0,6 mmol/g.

25 **Ejemplo 6 - Preparación de Fmoc-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4a, AA = Lisina(boc))**

Fmoc-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4a) se preparó de la misma manera que en 1. Carga = 0,6 mmol/g.

30 **Ejemplo 7 - Preparación de Fmoc-Asparagina(tritilo)-resina de diaminoetanotritilo (4b, AA = Asparagina)**

Fmoc-Asparagina(tritilo)-resina de diaminoetanotritilo (4b) se preparó de la misma manera que en 1. Carga = 0,5 mmol/g.

35 **Ejemplo 8 - Preparación de Fmoc-Metionina resina de diaminoetanotritilo (4c, AA = Metionina)**

Fmoc-Metionina resina de diaminoetanotritilo (4c) se preparó de la misma manera que en 1. Carga = 0,6 mmol/g.

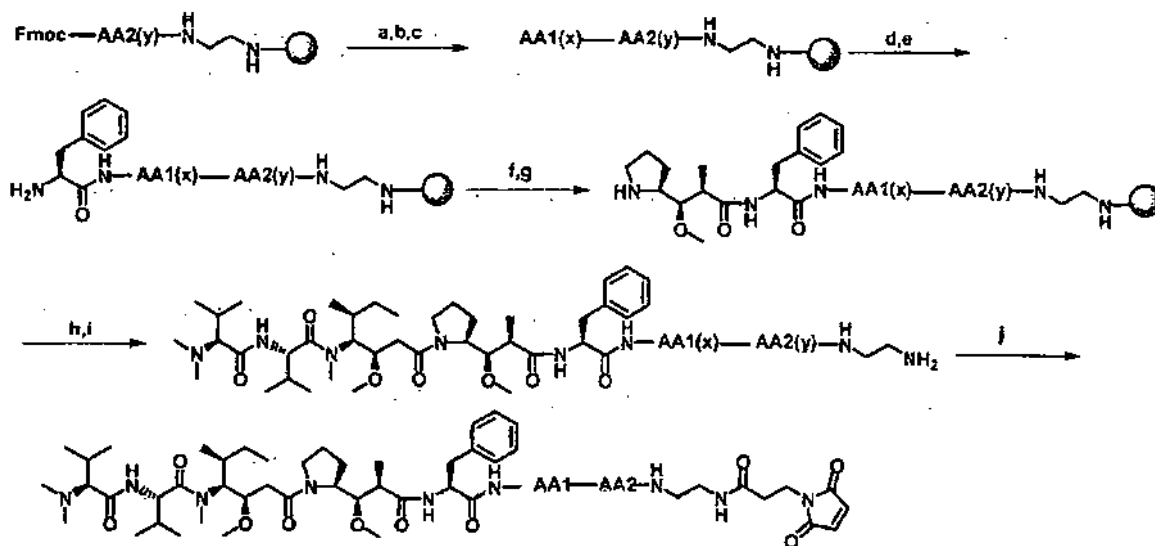
40 **Ejemplo 9 - Preparación de Fmoc-(D)Metionina resina de diaminoetanotritilo (4d, AA = (D)Metionina)**

Fmoc-(D)Metionina resina de diaminoetanotritilo (4d) se preparó de la misma manera que en 1. Carga = 0,5 mmol/g.

45 **Ejemplos 10 -32**

Preparación general de AF-AA1-AA2-diaminoetano-propionil-1-maleimida (Ejemplos 10-32) mediante una combinación de síntesis en fase sólida y en disolución:

Ejemplo 10: AF-Ácido aspártico-Valina-diaminoetano-propionil-maleimida (5a, AA1-AA2 = Ácido Aspártico-Valina).



Condiciones de reacción (a): piperidina al 20 %/DMF, (b) Fmoc-aminoácido (2-5 equiv), HATU (2-5 equiv), y DIEA (4-10 equiv), (c) piperidina al 20 %/DMF, (d) Fmoc-Phe (2 equiv), HATU (2 equiv), y DEEA (4 equiv), (e) piperidina al 20 %/DMF, (f) Fmoc-Dap (2 equiv.), HATU (2 equiv), y DIEA (4 equiv), (g) piperidina al 20 %/DMF, (h) Dov-Val-Dil-OH (2 equiv.), HATU (2 equiv), y DIEA (4 equiv), (i) TFA al 95 %/diclorometano, (j) BMPS (2 equiv), DIEA (2 equiv).

200 mg de la resina 1 (0,1 mmol) en una jeringa de 10 ml con PET fritado se trató con una solución de piperidina al 20 % en DMF (3 ml) y se agitó durante 1 h, y a continuación la resina se lavó 6 veces, cada una de ellas sucesivamente con DMF, DCM y dietil éter y se secó a vacío durante 2 h. Una solución de Fmoc-Asp(OtBu)-OH (82 mg, 0,2 mmol), HATU (76 mg, 0,2 mmol) y DIEA (70 μ l, 0,4 mmol) en DMF anhidro (4 ml) se añadió a continuación a la resina, que se agitó durante aproximadamente 4 h, se lavó 6 veces, cada una de ellas sucesivamente con DMF, DCM y dietil éter, y se secó a vacío durante 2 h. Una solución de piperidina al 20 % en DMF (3 ml) se añadió a la jeringa, y la mezcla se agitó durante aproximadamente 2 h. A continuación, la resina se filtró, se lavó 6 veces, cada una de ellas sucesivamente con DMF, DCM y dietil éter, y se secó a vacío durante 2 h. En un matraz separado, Fmoc-Phe (0,2 mmol) y HATU (0,2 mmol) se disolvieron en DMF anhidro (4 ml) seguido por la adición de DIEA (0,4 mmol). A continuación la solución se transfirió a la jeringa que contenía la resina, y la mezcla se agitó durante 4 h. El análisis por LC-MS del material escindido de una pequeña cantidad de la resina se utilizó para determinar que la reacción había finalizado. La resina se filtró, se lavó 6 veces, cada una de ellas sucesivamente con DMF, DCM y dietil éter, y se secó a vacío durante 2 h. De esta forma, después de la desprotección de Fmoc con piperidina al 20 % en DMF, Fmoc-Dap se acopló, seguido por una desprotección adicional de Fmoc y un acoplamiento final de Dov-Val-Dil-OH. A continuación, la resina se trató con una solución de TFA al 95 %/diclorometano (3 ml), y se lavó 3 veces más con TFA al 95 %/diclorometano (3 ml). El filtrado combinado se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min, después se concentró a sequedad. La mitad de este material (0,05 mmol) y éster NHS del ácido 3-maleimidopropiónico (25 mg, 0,1 mmol) se disolvieron en diclorometano (1 ml) con DIEA (70 μ l, 0,1 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. El disolvente se eliminó en vacío y el producto se purificó mediante HPLC preparativa en fase invertida. Rendimiento: 15 mg (26 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: > 90 % a 6,95 min; ESMS m/z = 1153,50 (M+H)+.

25 Ejemplo 11 - Preparación de AF-Isoleucina-Valina-diaminoetano-propionil-maleimida (5b, AA1-AA2 = Isoleucina-Valina)

AF-Isoleucina-Valina-diaminoetano-propionil-maleimida (5b) se preparó de la misma manera que en 5a, usando Fmoc-Ile como AA1. Rendimiento: 21 mg (33 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: > 95 % a 9,2 min; ESMS m/z = 1151,68 (M+H)+.

30 Ejemplo 12 - Preparación de AF-Asparagina-Valina-diaminoetano-propionil-maleimida (5c, AA1-AA2 = Asparagina-Valina)

AF-Asparagina-Valina-diaminoetano-propionil-maleimida (5c) se preparó de la misma manera que en 5a usando Fmoc-Asn(trt), pero el material escindido de la resina se purificó mediante HPLC preparativa antes del acoplamiento con el éster NHS del ácido 3-maleimidopropiónico. Rendimiento: 56 mg (63 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: > 95 % a 8,5 min; ESMS m/z = 1152,96 (M+H)+.

Ejemplo 13 - Preparación de AF-Tirosina-Valina-diaminoetano-propionil-maleimida (5d, AA1-AA2 = Tirosina-Valina)

5 AF-Tirosina-Valina-diaminoetano-propionil-maleimida (5d) se preparó de la misma manera que en 5c, usando Fmoc-Tyr para AA1. Rendimiento: 36 mg (68 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 7,8 min; ESMS m/z = 1201,67 (M+H)+.

Ejemplo 14 - Preparación de AF-TrimetilLisina-Prolina-diaminoetano-propionil-maleimida (6a, AA1-AA2 = TrimetilLisina-Prolina)

10 AF-TrimetilLisina-Prolina-diaminoetano-propionil-maleimida (6a) se preparó con el mismo procedimiento que 5a partiendo de 284 mg de Fmoc-Prolina-resina de diaminoetanotritilo (2) y usando Fmoc-TrimetilLisina como AA1. Rendimiento: 6 mg (21 %), ESMS m/z = 1207,027 (M+H)+.

Ejemplo 15 - Preparación de AF-Isoleucina-Prolina-diaminoetano-propionil maleimida (6b, AA1-AA2 = Isoleucina- Prolina)

15 AF-Isoleucina-Prolina-diaminoetano-propionil maleimida (6b) se preparó con el mismo método que 5a partiendo de 378 mg de Fmoc-Prolina-resina de diaminoetanotritilo (2) y usando Fmoc-Ile como AA1. Rendimiento: 36 mg (19 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RIP-HPLC: >95 % a 9,2 min; ESMS m/z = 1149,379 (M+H)+.

Ejemplo 16 - Preparación de AF-Asparagina-Prolina-diaminoetano-propionil maleimida (6c, AA1-AA2 = Asparagina- Prolina)

25 AF-Asparagina-Prolina-diaminoetano-propionil maleimida (6c) se preparó con el mismo método que 5c partiendo de 150 mg de Fmoc-Prolina-resina de diaminoetanotritilo (2) y usando Fmoc-Asn como AA1. Rendimiento: 21,8 mg (19 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 10,95 min; ESMS m/z = 1150,320 (M+H)+.

Ejemplo 17 - Preparación de AF-Metionina-Prolina-diaminoetano-propionil maleimida (6d, AA1-AA2 = Metionina- Prolina)

30 AF-Metionina-Prolina-diaminoetano-propionil maleimida (6d) se preparó con el mismo método que 5a partiendo de 150 mg de Fmoc-Prolina-resina de diaminoetanotritilo (2) y usando Fmoc-Met como AA1. Rendimiento: 20,6 mg (18,4 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 11,2 min; ESMS m/z = 1167,047 (M+H)+.

Ejemplo 18 - Preparación de AF-Tirosina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7a, AA1-AA2 = Tyro- sine-(D)Ácido Aspártico)

35 AF-Tirosina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7a) se preparó con el mismo método que 5c partiendo de 224 mg de Fmoc-(D)Asp(OtBu)-resina de diaminoetanotritilo (3), y usando Fmoc-Tyr(OtBu) como AA1. Rendimiento: 19 mg (11 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 6,2 min; ESMS m/z = 1217,789 (M+H)+.

Ejemplo 19 - Preparación de AF-NorValina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7b, AA1-AA2 = Nor- Valina-(D)Ácido Aspártico)

45 AF-NorValina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7b) se preparó con el mismo método que 5c partiendo de Fmoc-(D)Asp(OtBu)-resina de diaminoetanotritilo (3) y usando Fmoc-NVal como AA1. Rendimiento 10 mg (6 %). Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 6,3 min; ESMS m/z = 1153,955 (M+H)+.

Ejemplo 20 - Preparación de AF-β-alanina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7c, AA1 -AA2 =β- alanina-(D)Ácido Aspártico)

50 AF-β-alanina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7c) se preparó con el mismo método que 5c partiendo de 198 mg de Fmoc-(D)Asp(OtBu)-resina de diaminoetanotritilo (3), y usando Fmoc-β-Ala como AA1. Rendimiento: 12 mg (8 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 6,3 min; ESMS m/z = 1125,709 (M+H)+.

Ejemplo 21 - Preparación de AF-Metionina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7d, AA1-AA2 = Me- tionina-(D)Ácido Aspártico)

55 AF-Metionina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7d) se preparó con el mismo método que 5c partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Asp(OtBu)-resina de diaminoetanotritilo (3), y usando Fmoc-Met como AA1. Rendimiento: 19,4 mg (25 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 10,97 min; ESMS m/z = 1185,195(M+H)+.

60

65

Ejemplo 22 - Preparación de AF-Homo-β-fenilalanina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7e, AA1- AA2 = Homo-β-fenilalanina-(D)Ácido Aspártico)

5 AF-Homo-β-fenilalanina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7e) se preparó con el mismo método que 5c partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Asp(OtBu)-resina de diaminoetanotritilo (3), y usando Fmoc-hPhe como AA1. Rendimiento: 19,10 mg (24 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,85 min; ESMS m/z = 1167,075 (M+H)+.

10 **Ejemplo 23 - Preparación de AF-Asparagina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7f, AA1-AA2 = Asparagina-(D)Ácido Aspártico)**

15 AF-Asparagina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (7f) se preparó con el mismo método que 5c partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Asp(OtBu)-resina de diaminoetanotritilo (3), y usando Fmoc-Asn(trt) como AA1. Rendimiento: 38 mg (49 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,85 min; ESMS m/z = 1167,075 (M+H)+.

Ejemplo 24 - Preparación de AF-Prolina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil-maleimida (8a, AA1-AA2= Prolina-(D)Lisina)

20 AF-Prolina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8a) se preparó de la misma manera que en 5a, partiendo de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4) y Fmoc-Prolina para AA1, pero solamente se utilizó HFIP (hexafluoroisopropanol) al 30 % en diclorometano para escindir el penúltimo péptido de diaminoetano procedente de la resina para conservar el grupo protector boc de la lisina. Tras el acoplamiento con el éster NHS del ácido maleimidoaminopropiónico, el grupo boc se eliminó por tratamiento con TFA/ diclorometano 1:1 (1 ml) y el producto se aisló mediante HPLC preparativa. Rendimiento: 33 mg (40 %) de sólido de color blanco. ESMS m/z =1181,720 (M+H)+.

30 **Ejemplo 25 - Preparación de AF-Fenilglicina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8b, AA1-AA2 = Fenilglicina-(D)Lisina)**

AF-fenilglicina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8b) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 232 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Phg para AA1. Rendimiento: 10 mg (11 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,21 min; ESMS m/z = 1200,656 (M+H)+.

35 **Ejemplo 26 - Preparación de AF-Metionina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8c, AA1-AA2 = Metionina-(D)Lisina)**

40 AF-Metionina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8c) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 236 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Met para AA1. Rendimiento: 46 mg (49 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,48 min; ESMS m/z = 1198,804 (M+H)+.

Ejemplo 27 - Preparación de AF-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8d, AA1-AA2 = Asparagina-(D)Lisina)

45 AF-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8d) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 236 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Asn(trt) para AA1. Tras el acoplamiento con el éster NHS del ácido maleimidoaminopropiónico, los grupos protectores de cadena secundaria se eliminaron por tratamiento con TFA al 95 %/diclorometano (1 ml) durante 1 h, y a continuación el producto se aisló mediante HPLC preparativa. Rendimiento: 64 mg (62 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 10,34 min; ESMS m/z =1181,699 (M+H)+.

Ejemplo 28 - Preparación de AF-Glutamina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8e, AA1-AA2 = Glutamina-(D)Lisina)

55 AF-Glutamina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8e) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 98 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Gln para AA1. Rendimiento: 15 mg (19,7 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,07 min; ESMS m/z =1195,813 (M+H)+.

60 **Ejemplo 29 - Preparación de AF-Arginina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8f, AA1-AA2 = Arginina-(D)Lisina)**

65 AF-Arginina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8f) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 101 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Arg(Pbf) para AA1. Rendimiento: 13 mg (18 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % pureza según el área del pico a 9,80 min; ESMS m/z =1223,908 (M+H)+.

Ejemplo 30 - Preparación de AF-Citrulina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8g, AA1-AA2 =Citrulina-(D)Lisina)

5 AF-Citrulina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8g) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 102 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Cit para AA1. Rendimiento: 26 mg (33 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % pureza a 10,45 min; ESMS m/z =1223,933 (M+H)+.

Ejemplo 31 - Preparación de AF-Tirosina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8h, AA1-AA2 = Tirosina-(D)Lisina)

10 AF-Tirosina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8h) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 101 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Tyr(OtBu) para AA1. Rendimiento: 26 mg (34 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 10,05 min; ESMS m/z =1230,707 (M+H)+.

Ejemplo 32 - Preparación de AF-Lisina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8i, AA1-AA2 = Lisina-(D)Lisina)

20 AF-Lisina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8i) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 106 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Lys para AA1. Rendimiento: 13,6 mg (34 %), Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 11,32 min; ESMS m/z = 1281,238 (M+H)+.

Ejemplo general 33: Preparación general de AF-AA1-AA2-AA3-diaminoetano-propionil-1-maleimida (34-35) por una combinación de síntesis en fase sólida y en disolución:

25 Los enlazadores de fármacos que contienen más de 2 aminoácidos en la unidad enlazadora se prepararon como se describe en el Ejemplo 10 incorporando etapas adicionales (b) y (c) con un Fmoc-AA1 adicional.

Ejemplo 34 - Preparación de AF-Asparagina -(D)Lisina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8j, AA1-AA2- AA3 = Asparagina-(D)Lisina-(D)Lisina)

30 AF-Asparagina-(D)Lisina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8j) se preparó de la misma manera que en 8a, tal como se describe en el Ejemplo 33, partiendo de 102 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-(D)Lys para AA2 y Fmoc-Asn(trt) para AA1. Rendimiento: 20,5 mg (23 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,41 min; ESMS m/z = 1309,320 (M+H)+.

Ejemplo 35 - Preparación de AF-Metionina-Lisina-Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8k, AA1-AA2-AA3=Metionina-(D)Lisina-(D)Lisina)

40 AF-Metionina-(D)Lisina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8k) se preparó de la misma manera que en 8a, tal como se describe en el Ejemplo 33, partiendo de 107 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-(D)Lys para AA2 y Fmoc-Met para AA1. Rendimiento: 22 mg (24 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,33 min; ESMS m/z = 1326,008 (M+H)+.

Ejemplos 36-38:**Ejemplo 36 - Preparación de MMAF-AA1-AA2-diaminoetano-propionil maleimida**

50 Las versiones monometilo de los enlazadores del fármaco Auristatina F (MMAF) se prepararon sustituyendo la etapa (h) del Ejemplo 10 Fmoc-MeVal-Val-Dil-OH for Dov-Val-Dil-OH por Fmoc se eliminó mediante tratamiento con piperidina al 20 %/DMF, antes de escindir el compuesto de la resina (etapa i).

Ejemplo 37 - Preparación de MMAF-Metionina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8l, AA1-AA2 = Metionina-(D)Lisina)

55 MMAF-Metionina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8l) se preparó de la misma manera que en 8a como se describe en el Ejemplo 36, partiendo de 179 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Met para AA1. Fmoc-MeVal-Val-Dil se utilizó en lugar de Dov-Val-Dil, y el Fmoc se eliminó con piperidina al 20 %/DMF antes de la escisión compuesto de la resina. Rendimiento: 30,6 mg (22 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,69 min; ESMS m/z = 1184,554 (M+H)+.

Ejemplo 38 - Preparación de MMAF-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8m, AA1-AA2 = Asparagina-(D)Lisina)

65 MMAF-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8m) se preparó de la misma manera que en 8l como se describe en el Ejemplo 36, partiendo de 144 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando

Fmoc-Asn(trt) para AA1. Rendimiento: 19,2 mg (16 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % pureza a 19,2 min; ESMS m/z = 1167,169 (M+H)+.

Ejemplos 39-42:

5 **Ejemplo 39 - Preparación de AF-Metionina-(L)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8n, AA1-AA2 = Metionina-(L)Lisina)**

10 AF-Metionina-(L)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8n) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 168 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4a), y usando Fmoc-Met para AA1. Rendimiento: 22,1 mg (15,3 %) de sólido de color blanco. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,42 min; ESMS m/z = 1181,985 (M+H)+.

15 **Ejemplo 40 - Preparación de AF-Asparagina-(L)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8o, AA1-AA2 = Asparagina-(L)Lisina)**

20 AF-Asparagina-(L)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (8o) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 146 mg de Fmoc-(D)-Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4a), y usando Fmoc-Asn(trt) para AA1. Rendimiento: 19,9 mg (16 %), Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,32 min; ESMS m/z = 1198,985 (M+H)+.

25 **Ejemplo 41 - Preparación de AF-Metionina-(D)Metionina-diaminoetano-propionil maleimida (8r, AA1-AA2 = Metionina-(D)Metionina)**

30 AF-Metionina-(D)Metionina-diaminoetano-propionil maleimida (8r) se preparó de la misma manera que en 5c, partiendo de 146 mg de Fmoc-(D)Metionina-resina de diaminoetanotritilo (4d), y usando Fmoc-Met para AA1. Rendimiento: 6 mg (6,3 %), Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 11,45 min; ESMS m/z = 1201,172 (M+H)+.

35 **Ejemplo 42 - Preparación de AF-Metionina-(D)Valina-diaminoetano-propionil maleimida (8s, AA1-AA2 = Metionina-(D)Valina)**

40 AF-Metionina-(D)Valina-diaminoetano-propionil maleimida (8s) se preparó de la misma manera que en 5c, partiendo de 156 mg de Fmoc-(D)Valina-resina de diaminoetanotritilo (1a), y usando Fmoc-Met para AA1. Rendimiento: 13 mg (13 %), Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 11,18 min; ESMS m/z = 1169,52 (M+H)+.

Ejemplos 43-45:

45 **Ejemplo 43 - Preparación de AF-AA1-diaminoetano-propionil maleimida**

AF-AA1-diaminoetano-propionil maleimida se preparó como se describe en el Ejemplo 10 omitiendo las etapas (b) y (c).

50 **Ejemplo 44 - Preparación de AF-Asparagina-diaminoetano-propionil maleimida (8p, AA1-Asparagina)**

AF-Asparagina-diaminoetano-propionil maleimida (8p) se preparó de la misma manera que en 5c, como se modifica en el Ejemplo 43, partiendo de 217 mg de Fmoc-Asparagina(trt)-resina de diaminoetanotritilo (4b). Rendimiento: 22,9 mg (18 %), análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,85 min; ESMS m/z = 1053,838 (M+H)+.

55 **Ejemplo 45 - Preparación de AF-Metionina-diaminoetano-propionil maleimida (8q, AA1-Asparagina)**

AF-Metionina-diaminoetano-propionil maleimida (8q) se preparó de la misma manera que en 5c, como se modifica en el Ejemplo 43, partiendo de 177 mg de Fmoc-Metionina-resina de diaminoetanotritilo (4c). Rendimiento: 19,6 mg (15,5 %), Análisis por RP-HPLC, >90 % a 10,6 min; ESMS m/z = 1070,594 (M+H)+.

Ejemplos 46-54:

60 **Ejemplo 46 - Preparación de otras Auristatina-AA1-AA2-diaminoetano-propionil maleimida**

Las auristinas que contienen aminoácidos diferentes a fenilalanina en el extremo C se prepararon con el correspondiente Fmoc-aminoácido en la etapa (d) del Ejemplo 10 (o el Ejemplo 24, si se utiliza la resina 4). Por ejemplo, Fmoc-fenilalanina para auristatina F (AF) se puede sustituir por Fmoc-Metionina para auristatina M (AM) o Fmoc-Tryptophan para auristatina W (AW).

65 **Ejemplo 47 - Preparación de AM-Tirosina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (9a, AA1-AA2 = Tyro- sine-(D)Ácido Aspártico)**

AM-Tirosina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (9a) se preparó de la misma manera que en 8a, partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Asp(OtBu)-resina de diaminoetanotritilo (3), y usando Fmoc-Tirosina(tBu) for AA1 y

Fmoc-Metionina como Fmoc-NH-CH(X)-COOH en la etapa (d). Rendimiento: 16,6 mg. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,35 min; ESMS m/z = 1201,430 (M+H)+.

5 **Ejemplo 48 - Preparación de AM-Metionina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (9b, AA1-AA2 = Metionina-(D)Lisina)**

10 AM-Metionina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (9b) se preparó de la misma manera que en 9a, partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Lys(Boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Metionina para AA1 y Fmoc-Metionina como Fmoc-NH-CH(X)-COOH. Una solución de HFIP al 30 % HFIP en diclorometano para escindir el penúltimo péptido de diaminoetano procedente de la resina para conservar el grupo protector boc de la lisina. Tras el acoplamiento con el éster NHS del ácido maleimidoaminopropiónico, el grupo boc se eliminó por tratamiento con TFA/diclorometano 1:1 (1 ml) y el producto se aisló mediante HPLC preparativa. Rendimiento: 18,5 mg. Análisis mediante RP-HPLC: >90 % a 10,05 min; ESMS m/z = 1182,555 (M+H)+.

15 **Ejemplo 49 - Preparación de AM-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (9c, AA1-AA2 = Asparagina-(D)Lisina)**

20 AM-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (9c) se preparó de la misma manera que en 9a, partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Lys(Boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Metionina para AA1 y Fmoc-Metionina como Fmoc-NH-CH(X)-COOH. Rendimiento: 8,9 mg. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 9,89 min; ESMS m/z = 1165,818 (M+H)+.

Ejemplo 50 - Preparación de AM-Asparagina-diaminoetano-propionil maleimida (9d, AA1 = Asparagina)

25 AM-Asparagina-diaminoetano-propionil maleimida (9d) se obtuvo como producto secundario durante la síntesis de 9c debido al acoplamiento ineficiente de Fmoc-(D)Lisina con la resina de 1,2-diaminoetanotritilo. Rendimiento: 5,2 mg. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 10,32 min; ESMS m/z = 1037,581 (M+H)+.

30 **Ejemplo 51 - Preparación de AW-Tirosina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano maleimida (10a, AA1-AA2 = Tirosina-(D)Ácido Aspártico)**

35 AW-Tirosina-(D)Ácido Aspártico-diaminoetano-propionil maleimida (10a) se preparó de la misma manera que en 9a, partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Asp(OtBu)-resina de diaminoetanotritilo (3), y usando Fmoc-Tirosina para AA1 y Fmoc-Triptófano(Boc) como Fmoc-NH-CH(X)-COOH. Rendimiento: 19,7 mg. Análisis mediante RP-HPLC: >97 % a 10,85 min; ESMS m/z = 1256,840 (M+H)+.

Ejemplo 52 - Preparación de AW-Metionina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (10b, AA1-AA2 = Metionina-(D)Lisina)

40 AW-Metionina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (10b) se preparó de la misma manera que en 9a, partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Lys(Boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Metionina para AA1 y Fmoc-Triptófano(Boc) como Fmoc-NH-CH(X)-COOH. Se utilizó una solución de HFIP al 30 % HFIP en diclorometano para escindir el penúltimo péptido de diaminoetano procedente de la resina para conservar el grupo protector boc de la lisina. Tras el acoplamiento con el ácido maleimidoaminopropiónico, el grupo Boc se eliminó por tratamiento con TFA/diclorometano 1:1 (1 ml) y el producto se aisló mediante HPLC preparativa. Rendimiento: 21 mg. Análisis mediante RP-HPLC: >97 % a 10,25 min; ESMS m/z = 1238,043 (M+H)+.

50 **Ejemplo 53 - Preparación de AW-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (10c, AA1-AA2 = Asparagina-(D)Lisina)**

55 AW-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-propionil maleimida (10c) se preparó de la misma manera que en 9a, partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Lys(Boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y usando Fmoc-Asparagina(OtBu) para AA1 y Fmoc-Triptófano(Boc) como Fmoc-NH-CH(X)-COOH. Rendimiento: 16 mg. Análisis mediante RP-HPLC: >97 % a 10,0 min; ESMS m/z = 611,098 (M+H)+.

Ejemplo 54 - Preparación de AW-Asparagina-diaminoetano-propionil maleimida (10d, AA1 = Asparagina)

60 AW-Asparagina-diaminoetano-propionil maleimida (10d) se preparó de la misma manera que en 10c debido al acoplamiento ineficaz de Fmoc-(D)Lys(Boc) a la resina de 1,2-diaminoetanotritilo. Rendimiento: 12,4 mg. Análisis mediante RP-HPLC: >95 % a 10,51 min; ESMS m/z = 1097,740 (M+H)+.

Ejemplo 55 - Preparación de Dov-Val-Dil-Dap-Phe (AF)

65 Una mezcla de Fmoc-Dap (986 mg, 2,4 mmol), HATU (846 mg, 2,4 mmol) y DIEA (842 µl, 4,8 mmol) en DMF (20 ml) se añadió a un recipiente de 50 ml que contenía fenilalanina unida a la resina de 2-clorotritilo (3,0 g, 2,4 mmol), y la mezcla se agitó intensamente durante 16 h a temperatura ambiente. La finalización de la reacción se confirmó por un resultado

negativo en el ensayo de Kaiser, y el producto correcto se confirmó mediante LCMS ($m/z = 410,39$). La resina se lavó 6 veces, cada una de ellas sucesivamente con DMF, CH_2CH_2 , y etil éter, y se secó a alto vacío.

La resina anterior se trató con 20 ml de una solución de piperidina al 20 % en DMF y se agitó intensamente durante 2 h. La resina se lavó 6 veces, cada una de ellas sucesivamente con DMF, CH_2CH_2 , y etil éter, y se secó a alto vacío. Una mezcla de Dov-Val-Dil-OH (2,4 mmol), HATU (864 mg, 2,4 mmol) y DIEA (873 μl , 5 mmol) en DMF (20 ml) se añadió a lo anterior, y el recipiente se agitó durante 16 h. La resina se lavó 6 veces, cada una de ellas sucesivamente con DMF, CH_2CH_2 , y etil éter, y se secó a alto vacío. El producto se escindió de la resina con una solución de TFA al 2 % en CH_2Cl_2 y se purificó mediante HPLC preparativa en fase invertida. Rendimiento: 1,6 g (89 %), MS $m/z = 746,59$.

10 **Ejemplo 56 - Preparación general de conjugados de anticuerpo Auristatina-Péptido**

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

20 El reactivo del compuesto enlazador de fármaco, auristatina-aminoácido(s)-diaminoetano-propionil maleimida (Auristatina-Péptido), disuelto en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a concentración conocida, y se añade al anticuerpo reducido intensamente enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para desactivar la reacción y proteger todos los grupos tIol del anticuerpo sin reaccionar. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga, y el conjugado de anticuerpo Auristatina-Péptido se purifica y se desala por elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 μm en condiciones estériles, y se congela para su almacenamiento.

30 Siguiendo este procedimiento, se prepararon los conjugados de anticuerpo Auristatina-Péptido usando el anticuerpo humanizado 1F6 (véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional WO 06/113909, para una descripción del 1F6 humanizado).

35 **Ejemplo 57 - Determinación de la citotoxicidad de compuestos seleccionados**

La actividad citotóxica de los conjugados de anticuerpo Auristatina-Péptido se evaluó en líneas celulares positivas para CD70+, por ejemplo, 786O, un carcinoma de células renales, Caki-1, un carcinoma de células renales, L428, una línea celular de enfermedad de Hodgkin; UMRC-3, un carcinoma de células renales, LP-1, una línea celular de mieloma humano; y U251, una línea celular de glioblastoma. Además, una línea celular CD70⁻, como HCT-116, se usó como control. Para evaluar la citotoxicidad de los compuestos, las células se pueden sembrar a aproximadamente 5-10.000 por pocillo en 150 μl de medio de cultivo, a continuación se trató con dosis escalonadas de los compuestos por cuadruplicado al principio del ensayo. Los ensayos de citotoxicidad se llevan a cabo habitualmente en las 96 horas posteriores a la adición de los compuestos de ensayo. Cincuenta μl de colorante resazurina se pueden añadir a cada pocillo en las últimas 4 a 6 horas finales de la incubación para evaluar las células viables al final del cultivo. La reducción del colorante se puede determinar mediante espectrometría de fluorescencia usando longitudes de onda de excitación y emisión de 535 nm y 590 nm, respectivamente. Para el análisis, la medida de la reducción de resazurina por las células tratadas se puede comparar con las células del control sin tratar.

45 Ensayo de proliferación celular *in vitro*

La eficacia de un conjugado se puede medir mediante un ensayo de proliferación celular que utiliza el siguiente protocolo (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al., 2002, Cancer Res. 62:5485-5488):

1. Una alícuota de 100 μl de cultivo celular que contiene aproximadamente 10^4 células (por ejemplo, SKBR-3, BT474, MCF7 o MDA-MB-468) en medio se deposita en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de paredes opacas.
2. Los pocillos de control se preparan con medio y sin células.
3. Se añade el conjugado a los pocillos experimentales y se incuba durante 3-5 días.
4. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se añadió un volumen del reactivo CellTiter-Glo igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
6. El contenido se mezcla durante 2 minutos en un agitador orbital e inducir la lisis celular.
7. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar el la señal de luminiscencia.
8. La luminiscencia se registra y se notifica en gráficas como URL = unidades relativas de luminiscencia.

60 **Ejemplo 58 - Determinación de la citotoxicidad de compuestos seleccionados**

65 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 57, se evaluaron los conjugados de Auristatina-Péptido-Anticuerpo

(ligando enlazador de fármaco) en líneas celulares positivas para CD70+, 786O, Caki-1, L428, UMRC-3, LP-1, U251, y una línea celular CDR70⁺, HCT- 116, como control. Además, el conjugado h1F6-vc-PABC-MMAF se utilizó como control. Las Tablas 4 y 5 muestran la actividad *in vitro* de conjugados Auristatina-Dipéptido-h1F6 seleccionados (el péptido tiene dos aminoácidos) comparada con el conjugado de h1F6- vc-PABC-MMAF de control. Los conjugados contienen aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo.

Tabla 4: Valores de CI50 (ng/ml) para los conjugados Auristatina-Dipéptido-h1F6 (~4 fármacos/anticuerpo) con células CD70+

Enlazador de fármaco en el conjugado+	786-0	Caki-1	L428	UMRC-3	LP-1	U251	HCT-116 (CD70-)
AF-Ile-Val	3,4	3,7	2,5	19,5	19	44,6	>1000
AF-Asp-Val	18	25	18	54	234	407	>1000
AF-Tyr-Val	3,7	7,0	3,0	19,5	34	46,8	>1000
AF-Asn-Val	12,6	22,3	11,7	46,8	174	251	>1000
AF-His-Val	5,6	11,2	5,9	38	77,6	81,2	>1000
AF-Ile-Pro	9,8	9	5	16	219	45	>1000
AF-Me ₃ Lys-Pro	20	11	24	30	298	78	>1000
AF-Tyr-(D)Asp	24	9	27	32	398	72	>1000
AF-NorVal-(D)Asp	28	12	24	25	537	78	>1000
AF-β-Ala-(D)Asp	525	1585	1096	132	>10.000	93	>1000
AF-PhenylGly-(D)Lys	339	44	275	1096	>10.000	98	>1000
AF-Met-(D)Lys	55	25	1698	132	>10.000	98	>1000
AF-Pro-(D)Lys	NT	>10.000	>10.000	NT	NT	5012	>1000
AF-Asn-(D)Lys	19	10	24	28	417	60	>1000
vc-PABC-MMAF	7	3	7	14	22	10	>1000

AF = Auristatina F; NT = no ensayado.
 + La unidad ensanchadora de la unidad enlazadora es como se indica en los Ejemplos anteriores.

Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla 4. En este ejemplo, los conjugados Auristatina F-dipéptido con el anticuerpo h1F6 muestran por lo general una actividad comparable a la del control, un conjugado h1F6-vc-PABC-MMAF. Estos resultados demuestran que las auristatinas se pueden conjugar a través del grupo carboxilo del extremo C con un enlazador que comprende unidades de aminoácido para generar ADC activos. La potencia de dichos conjugados varía dependiendo de la secuencia de los aminoácidos de los enlazadores. Los conjugados con enlazadores de fármaco que comprenden aminoácidos no naturales como β-alanina y fenilglicina unidos a la fenilalanina de la auristatina demostraron una actividad reducida, debido potencialmente a la escisión enzimática ineficaz de dichos sustratos. El enlazador de fármaco AF-Prolina-(D)Lisina proporcionó un ADC fuertemente inactivo, muy probablemente debido a la imposibilidad, o dificultar extrema, de la escisión proteolítica del enlace amida secundario entre la fenilalanina y la prolina.

Tabla 5: Resumen de los valores de CI50 (ng/ml) para los conjugados Auristatina-Péptido-h1F6 (~4 fármacos/anticuerpo) con células CD70+

Enlazador de fármaco en el conjugado+	CI50 (ng/ml)				
	786-O	Caki-1	Caki-2	L428	HCT-116 (CD70-)
AF-Gln-(D)Lys	12	11	14	209	>1000
AF-Arg-(D)Lys	8	10	8	47	>1000
AF-Cit-(D)Lys	10	11	16	47	>1000
AF-Tyr-(D)Lys	9	11	12	10	>1000
AF-Lys-(D)Lys	9	8	9	37	>1000
AF-Asn-Pro	11	12	32	23	>1000
AF-Met-Pro	8	15	25	8	>1000
AF-Met-(D)Met	4	5	13	4	>1000
AF-Met-(D)Val	5	6	32	8	>1000
AF-Met-(D)Asp	8	10	35	11	>1000
AF-hPhe-(D)Asp	10	>1000	>1000	29	>1000
AF-Asn-(D)Asp	7	7	71	14	>1000
AF-Asn-(D)Lys-(D)Lys	9	10	30	22	>1000
AF-Met-(D)Lys-(D)Lys	8	12	25	>1000	>1000
AM-Tyr-(D)Asp	32	23	71	30	>1000
AM-Met-(D)Lys	56	39	251	1000	>1000
AM-Asn-(D)Lys	20	20	47	26	>1000
AM-Asn	30	31	63	32	>1000
AW-Tyr-(D)Asp	18	16	33	21	>1000

AW-Asn-(D)Lys	16	15	26	19	>1000
AW-Met-(D)Lys	20	22	37	>1000	>1000
AW-Asn	18	15	30	22	>1000
vc-PABC-MMAF	5	12	11	4	>1000
AF = Auristatina F; AM = auristatina que tiene Metionina en el extremo C; AW = auristatina que tiene triptófano en el extremo C;					
+ La unidad ensanchadora de la unidad enlazadora es como se indica en los Ejemplos anteriores.					

La Tabla 5 muestra la actividad de otro conjunto de ADC de Auristatina-Dipéptido-h1F6 en líneas celulares CD70+ y CD70-. La mayoría de conjugados son muy activos en células CDR70+, mientras que no muestran actividad en la línea celular CD70- (HCT-116). La Tabla también incluye datos de los ADC producidos con compuestos enlazadores de fármacos que solo tienen un aminoácido en la unidad enlazadora, así como con compuestos enlazadores de fármacos que contienen Auristatinas M y W (que tienen Metionina y Triptófano en el extremo C del Fármaco, respectivamente). Los conjugados que contienen Auristatina M y W fueron activos en estos estudios.

Ejemplo 59 - Determinación de la citotoxicidad de compuestos seleccionados usando

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 57, los conjugados de Auristatina-Dipéptido-anticuerpo cAC10 se evaluaron en líneas celulares positivas para CD30+, Carpas 299, L428 y L540cy. Además, se utilizó un conjugado de control, cAC10-vc-PABC- MMAF. La Tabla 6 muestra la actividad *in vitro* de conjugados Auristatina-Dipéptido-cAC10 en comparación con un conjugado de control cAC10-vc-PABC-MMAF. Los conjugados contienen aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo.

Tabla 6: Valores de $Cl_{50}S$ (ng/ml) para los conjugados Auristatina-Dipéptido-anticuerpo cAC10 (~4 fármacos/anticuerpo) con células CD30+

Enlazador de fármaco+ en el conjugado	Carpas 299	L428	L540cy
AF-Ile-Pro	0,6	0,1	0,7
AF-Me ₃ Lys-Pro	0,6	0,09	0,8
AF-Tyr-(D)Asp	0,6	0,06	0,7
AF-NorVal-(D)Asp	0,5	0,09	0,6
AF-β-Ala-(D)Asp	371	0,5	1,6
AF-PhenylGly-(D)Lys	21	2	6
AF-Met-(D)Lys	2	1,5	3
AF-Asn-(D)Lys	44	0,1	4
vc-PABC-MMAF	3	0,5	3

+ La unidad ensanchadora de la unidad enlazadora es como se indica en los Ejemplos anteriores.

Los datos de la Tabla 6 muestran que los enlazadores de fármaco de Auristatina-dipéptido proporcionan ADC cAC10 potentes. Los datos muestran que el uso de estos enlazadores de fármaco no se limita a h1F6, sino que pueden tener una aplicación más amplia para la administración dirigida de fármacos.

Ejemplo 60 - Eficacia *in vivo* sobre el volumen tumoral en explantes de ratones transgénicos

Los animales adecuados para los experimentos transgénicos se pueden obtener de fuentes comerciales convencionales tales como Taconic (Gennantown, N.Y.). Muchas cepas son adecuadas, pero se prefieren ratones hembra FVB debido a su elevada susceptibilidad a la formación de tumores. Los machos FVB se pueden utilizar para el emparejamiento, y los machos CD.1 vasectomizados se pueden utilizar para estimular el pseudoembarazo. Los ratones vasectomizados se pueden obtener de cualquier proveedor comercial. Las hembras fértiles se pueden reproducir tanto con ratones FVB o con ratones heterocigóticos 129/BL6 x FVB p53. Los ratones con el alelo p53 heterocigótico se pueden utilizar para aumentar potencialmente la formación de tumores. Algunos tumores F1 son cepas mixtas. Los tumores fundadores solamente pueden ser FVB.

Los animales que tienen tumores (propagados por aloinjerto a partir de ratones transgénicos Fo5 mmtv) se pueden tratar con una dosis simple o múltiple mediante inyección IV de ADC. El volumen del tumor se puede evaluar en varios puntos temporales después de la inyección.

Ejemplo 61 - Eficacia *in vivo* de los conjugados de Auristatina F-Dipéptido-h1F6 en un modelo de xenoinjerto de células renales

La eficacia de conjugados AF-Dipéptido-h1F6 se evaluó en xenoinjertos de 786-O (células renales). Se utilizaron conjugados AF-Dipéptido-h1F6 con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo. Las células 786-O se implantaron de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes (5×10^5 células por ratón). Los volúmenes tumorales se calcularon mediante la fórmula $(0,5 \times L \times W^2)$ donde L y W son la longitud y la más corta de las dos mediciones bidimensionales. En la Figura 1 se muestran los resultados de este estudio. La mayoría de los ADC de

AF-Dipéptido-h1F6de-h1F6 mostró su eficacia en el modelo *in vivo* dando como resultado una reducción en el volumen tumoral o irradiación total de los tumores establecidos. La eficacia *in vivo* de los ADC ensayados se correlacionó con su potencia *in vitro*. El conjugado AF-Pro-(D)Lys era inactivo en el modelo de ratón (no se muestran los datos). Numerosos conjugados AF-Dipéptido-h1F6 fueron más activos que el correspondiente h1F6-vc-PABC-MMAF.

En un segundo estudio, las eficacias de conjugados Auristatina-Dipéptido-h1F6 se evaluaron en xenoinjertos de 786-O (células renales). Se utilizaron conjugados Auristatina-Dipéptido-h1F6 con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo. Las células 786-O se implantaron de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes (5×10^6 células por ratón). Los volúmenes tumorales se calcularon mediante la fórmula $(0,5 \times L \times W^2)$, donde L y W son la longitud y la más corta de las dos mediciones bidimensionales. En la Figura 2 se muestran los resultados de este estudio. Los conjugados de anticuerpo con Auristatina-Dipéptido ocasionaron regresiones tumorales y curaciones a dosis bien toleradas.

Ejemplo 62 - Eficacia *in vivo* de los conjugados de Auristatina F-Dipéptido-h1F6 en un modelo de xenoinjerto de glioblastoma

Las eficacias de los conjugados Auristatina F-Dipéptido-h1F6 se evaluaron en un modelo de glioblastoma subcutáneo DBTRG05-MG. Se utilizaron conjugados Auristatina F-Dipéptido-h1F6 con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo. Las células DBTRG05-MG se implantaron de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes (5×10^6 células por ratón). Los volúmenes tumorales se calcularon mediante la fórmula $(0,5 \times L \times W^2)$ donde L y W son la longitud y la más corta de las dos mediciones bidimensionales. En la Figura 3 se muestran los resultados de este estudio. Los conjugados Auristatina F-Dipéptido-h1F6 mostraron eficacia superior en comparación con el correspondiente conjugado vc-PABC-MMAF unido al extremo N, dando como resultado numerosas curaciones a una dosis baja de 3 mg/kg como tratamiento de los tumores establecidos.

Ejemplo 63 - Eficacia *in vivo* de los conjugados de Auristatina F-Dipéptido-cAC10

La eficacia de Auristatina F-Dipéptido-cAC10 se evaluó en xenoinjertos de Karpas-299 ALCL. Se utilizaron conjugados Auristatina F-Dipéptido-cAC10 con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo. Las células Karpas-299 ALCL humanas se implantaron de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes C.B-17 SCID (5×10^6 células por ratón). Los volúmenes tumorales se calcularon mediante la fórmula $(0,5 \times L \times W^2)$, donde L y W son la longitud y la más corta de las dos mediciones bidimensionales. Los resultados se muestran en la Figura 4.

El tratamiento de los tumores establecidos con una sola dosis de únicamente 0,5 mg/kg de los conjugados AF-Dipéptido-cAC10 dio como resultado regresiones tumorales y curaciones.

Ejemplo 64 - Tolerabilidad de los conjugados Auristatina-Dipéptido-h1F6 en ratones

La tolerabilidad, medida como la dosis máxima tolerada (MTD), se determinó en ratones en función de la pérdida después del tratamiento. Los animales se vigilaron normalmente durante 14 días. Se considera que un conjugado es tolerado a una determinada dosis si un único tratamiento iv a dicha dosis da como resultado una pérdida de peso transitoria no superior al 20 % de peso corporal inicial de los animales, y no se observan otros signos de toxicidad. Los resultados se muestran en las Figuras 5-9. Se descubrió que la tolerabilidad de los conjugados Auristatina-Dipéptido-h1F6 con un promedio de 4 unidades de fármaco por anticuerpo era dependiente de la secuencia del dipéptido del enlazador y de la auristatina. Los conjugados AF-Met-(D)Lys y AF-Asn-(D)Lys se toleraron a dosis tan elevadas como 100 mg/kg (Figure 7). Los correspondientes conjugados de auristatinas que contenían Metionina (AM) y Triptófano (AW) en la posición del extremo C del fármaco se toleraron incluso mejor, hasta 150 mg/kg (Figura 8). estas dosis son significativamente más elevadas que las dosis consideradas eficaces *in vivo* (50+ veces más). De esta manera, los enlazadores de fármaco de Auristatina-Dipéptido proporcionan ADC con una ventana terapéutica significativa para el tratamiento terapéutico (*por ejemplo*, cáncer).

Ejemplo 65 - Comparación entre la eficacia y la tolerabilidad de conjugados Auristatina-Dipéptido-Anticuerpo seleccionados

Las eficacias y tolerabilidades (MTD) de los correspondientes conjugados Auristatina-Dipéptido-Anticuerpo se compararon para dos fármacos diferentes, Auristatina F (AF) o MMAF, usando el enlazador que contiene dipéptido Asn-(D)Lys o Met-(D)Lys. Los estudios de eficacia y tolerabilidad se llevaron a cabo de manera general como se describe en los Ejemplos 58 y 64, respectivamente. Los resultados que se muestran en la siguiente Tabla 7 y en las Figuras 10-11.

Tabla 7: Resumen de los valores de CI50 (ng/ml) para conjugados Auristatina-Dipéptido-h1F6 seleccionados

Fármaco	Enlazador+	Valores de CI50 (ng/ml)				
		786-O	Caki-1	L-428	UMRC-3	LP-1
AF,	Met-(D)Lys	12	9	158	182	>1000
MMAF		10	8	123	100	>1000

AF,	Asn-(D)Lys	10	6	9	32	479
MMAF		9	7	7	19	110
+ La unidad ensanchadora de la unidad enlazadora es como se indica en los Ejemplos anteriores.						

Los datos muestran que los ADC de MMAF y AF tienen una potencia *in vitro* e *in vivo* similar independiente de qué fármaco se utilizó con los enlazadores que contienen dipéptido. Los conjugados que contienen MMAF parecen ser menos bien tolerados que los correspondientes ADC que contienen Auristatina F. Ambos conjugados MMAF-Met-(D)Lys y MMAF-Asn-(D)Lys-h1F6 dieron como resultado pérdidas de animales a dosis de 100 mg/kg mientras que los correspondientes conjugados AF fueron bien tolerados a esta dosis.

Ejemplo 66 - Comparación entre la eficacia y la tolerabilidad de conjugados Auristatina-Dipéptido-Anticuerpo seleccionados

La eficacia y tolerabilidad (MTD) de los conjugados Auristatina-Dipéptido-Anticuerpo se compararon usando diferentes enlazadores, que tenían aminoácidos D o L en la segunda posición de aminoácido de la unidad enlazadora. Los estudios de eficacia y tolerabilidad se llevaron a cabo de manera general como se describe en los Ejemplos 58 y 64, respectivamente. Los resultados que se muestran en la siguiente Tabla 8 y en las Figuras 12-13.

Tabla 8. Resumen de los valores de CI50 (ng/ml) para conjugados Auristatina-Dipéptido-h1F6 seleccionados

Fármaco	Enlazador+	Valores de CI50 (ng/ml)				
		786-O	Caki-1	L-428	UMRC-3	LP-1
AF,	Met-(D)Lys	12	9	158	182	>1000
	Met-(L)Lys	7	4	3	22	95
AF,	Asn-(D)Lys	10	6	9	32	479
	Asn-(L)Lys	9	8	8	26	501
La unidad ensanchadora de la unidad enlazadora es como se indica en los Ejemplos anteriores.						

Los enlazadores de fármacos con un L-aminoácido en la segunda posición proporciona los ADC mejor tolerados para ambos enlazadores ensayados, como se muestra en la Figura 13, aunque la potencia *in vitro* e *in vivo* de estos conjugados fue comparable.

Ejemplo 67 - Comparación entre la eficacia y la tolerabilidad de conjugados Auristatina-Péptido-Anticuerpo con enlazadores de monopéptido o dipéptido.

Las eficacias y tolerabilidades (MTD) de los conjugados Auristatina-Dipéptido-Anticuerpo se compararon usando enlazadores de monopéptido o dipéptido. Los estudios de eficacia y tolerabilidad se llevaron a cabo de manera general como se describe en los Ejemplos 58 y 64, respectivamente. Los resultados que se muestran en la siguiente Tabla 9 y en las Figuras 14-15.

Tabla 9. Resumen de los valores de CI50 (ng/ml) para conjugados h1F6-fármaco(4) seleccionados

Fármaco	Enlazador ⁺	Valores de CI50 (ng/ml)				
		786-O	Caki-1	L-428	UMRC-3	LP-1
AF,	Met-(D)Lys	12	9	158	182	>1000
	Met	8	6	3	17	110
AF,	Asn-(D)Lys	10	6	9	32	479
	Asn	10	6	9	28	209
+ La unidad ensanchadora de la unidad enlazadora es como se indica en los Ejemplos anteriores.						

Los resultados de los estudios muestran que los conjugados que solamente tienen un aminoácido en el enlazador eran significativamente menos bien tolerados en comparación con los correspondientes conjugados que tienen enlazadores dipéptidos (Figura 15). AF-Asn-h1F6 y AF-Met-h1F6 fueron tóxicos a una dosis de 50 mg/kg mientras que los correspondientes AF-Asn-(D)Lys y AF-Met-(D)Lys fueron tolerados a 100 mg/kg. Estos datos respaldan el uso de al menos dos aminoácidos en los enlazadores de péptidos para los conjugados Auristatina-Péptido-Anticuerpo unidos por el extremo C.

Ejemplo general 68 - Preparación de enlazadores de fármacos de Auristatina-AA1-AA2 con aril-maleimidias

Los enlazadores de fármacos de Auristatina-péptido con aril-maleimidias en la unidad ensanchadora se prepararon por sustitución del éster de NHS del ácido 3-maleimidopropiónico en la etapa (j) del Ejemplo 10, como se modifica en el Ejemplo 24, por el éster de NHS de p-maleimidobenzoilo.

Ejemplo 69 - Preparación de AM-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-benzoil maleimida (10e, AA1-AA2 = Asparagina-(D)Lisina)

5 AM-Asparagina-(D)Lisina-diaminoetano-benzoil maleimida (10e) se preparó de la misma manera que en 9c, partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Lisina(boc)resina de diaminoetanotritilo (4), y utilizando el éster de NHS de p-maleimidobenzoilo en lugar del éster de NHS del ácido 3-maleimidopropiónico. Rendimiento: 24 mg. Análisis por RP-HPLC >95 % a 10,30 min; ESMS m/z = 1212,84 (M+H)+.

Ejemplo 70 - Preparación de AW-Metionina(D)Lisina-diaminoetano-benzoil maleimida (10f, AA2-AA1 = Metionina-(D)Lisina)

10 AW-Metionina-(D)Lisina-diaminoetano-benzoil maleimida se preparó de la misma manera que en 10b, partiendo de 100 mg de Fmoc-(D)Lisina(boc)-resina de diaminoetanotritilo (4), y utilizando el éster de NHS de p-maleimidobenzoilo en lugar del éster de NHS del ácido 3-maleimidopropiónico. Rendimiento: 8 mg. Análisis por RP-HPLC >95 % a 10,81 min; ESMS m/z =1285,64 (M+H)+.

Ejemplo 71- Comparación de la potencia de conjugados de aril y alquil Auristatina-Péptido seleccionados sobre células CD70+.

20 Siguiendo el procedimiento descrito en los Ejemplos 57 y 58, los conjugados Auristatina-Péptido-h1F6 se evaluaron en células CD70+, tal como 786-0, Caki-1, Caki-2, y L428. Los conjugados contienen aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo. En referencia a la siguiente Tabla 10, los respectivos enlazadores de fármaco que contienen aril y alquil-maleimida dieron como resultado conjugados con actividades similares.

25 **Tabla 10. Resumen de valores de CI50 (ng/ml) para los conjugados h1F6-Fármaco(4) que utilizan arilmaleimididas o alquil maleimididas**

Enlazador ⁺ de fármaco	CI50 (ng/ml)			
	786-O	Caki-1	Caki-2	L428
AW-Met-(D)Lys-aril-maleimida	12	15	12	>1000
AW-Met-(D)Lys-propionil-maleimida	17	19	18	>1000
AM-Asn-(D)Lys-aril maleimida	16	10	17	23
AM-Asn-(D)Lys-propionil-maleimida	18	16	26	29

AM = auristatina que tiene Metionina en el extremo C; AW = auristatina que tiene triptófano en el extremo C
+ La unidad ensanchadora de la unidad enlazadora es como se indica en los Ejemplos anteriores.

Ejemplo 72 - Actividad de los conjugados AM-Asn-(D)Lys yd AW-Met-(D)Lys con los anticuerpos cAC10 (anti-CD30), hBU12 (anti-CD19), Anti-LIV-1, y BR96 (anti-Le^y) in vitro

30 Siguiendo el procedimiento descrito en los Ejemplos 57 y 58, las actividades de los conjugados Auristatina-Péptido-cAC10 se evaluaron en células CD30+, como Carpas 299, L428, y L540cy. Las actividades de los conjugados Auristatina-Péptido-hBU12 se evaluaron en células CD19+ como Ramos, SUDHL-4, y ARH-77. Las actividades de los conjugados Auristatina-Péptido-anti-LIV-1 se evaluaron con las líneas celulares MCF-7 y SKOV-3
35 positivas para LIV-1. Las actividades los conjugados Auristatina-Péptido- BR96 se evaluaron con las células H3396, RCA y L2987 positivas para Le^y. Todos los conjugados contienen aproximadamente 4 fármacos por anticuerpo. En referencia a la Tabla 11, se muestran los resultados. Los conjugados AM-Asn-(D)Lys tuvieron una potencia in vitro similar a los correspondientes conjugados MC-MMAF. Los conjugados AW-Met-(D)Lys parecen ser menos activos.

Tabla 11. Resumen de los valores de CI50 (ng/ml) para conjugados Auristatina-peptido seleccionados con los anticuerpos cAC10, hBIM2, Anti-LIV-1, y BR96.

Enlazador de fármaco	cAC10			hBLU2		Anti-LIV-1			BR96		
	Carpas 299	L428	L54Ocy	Ramos	SUDHL-4	ARH-77	MCF-7	SKOV-3	H3396	RCA	L2987
AM-Asn-(D)Lys	11	0,6	31	1	>10.000	49	24	7600	37	8362	506
AW-Met-(D)Lys	11	-10,0 00	17	>10,00	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	146	5217	422
MC-MMAF	3	1	7	7	-10.000	255	3	2450	42	7400	626

AM = auristatina que tiene Metionina en el extremo C; AW = auristatina que tiene triptófano en el extremo C; MC-MMAF = Maleimidocaproil-mono-metilauristatina F.

Ejemplo 73 - Eficacia in vivo de los conjugados de Auristatina-Dipéptido-hBU12 seleccionados en un modelo de xenoinjerto de linfoma

5 Las eficacias de los conjugados Auristatina-Dipéptido hBU12 con las unidades ensanchadoras de aril-maleimida y alquil-maleimida se evaluaron en un modelo de linfoma folicular de linfocitos B DoHH-2 subcutáneo. Se utilizaron conjugados Auristatina-Dipéptido-hBU12 con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo. Las células DoHH-2 se implantaron de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes SCID (5×10^6 células por ratón). Los volúmenes tumorales se calcularon mediante la fórmula ($0,5 \times L \times W^2$) donde L y W son la longitud y la más corta de las dos mediciones bidimensionales. El tratamiento se inició cuando el tamaño promedio de los tumores alcanzó 100 mm^3 ; el programa de tratamiento fue cuatro dosis de 3 mg/kg administradas en cuatro días. En la Figura 16 se muestran los resultados de este estudio.

15 Los conjugados de análogos de aril-maleimida y alquil-maleimida de los correspondientes Auristatina-Dipéptidos mostraron eficacias similares. Los ADC AM-Asn-(D)Lys fueron más potentes que los correspondientes conjugados AW-Met-(D)Lys.

Ejemplo 74 - Eficacia in vivo de los conjugados Auristatina-Dipéptido-cAC10 en un modelo de xenoinjerto de linfoma

20 La eficacia de conjugados Auristatina-Dipéptido-cAC10 seleccionados con unidades ensanchadoras con aril-maleimida y alquil-maleimida se evaluó en un modelo de linfoma de Hodgkin L540cy subcutáneo. Se utilizaron conjugados Auristatina-Dipéptido-cAC10 con un promedio de 4 restos de fármaco por anticuerpo. Las células L540cy se implantaron de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes SCID (5×10^6 células por ratón). Los volúmenes tumorales se calcularon mediante la fórmula ($0,5 \times L \times W^2$), donde L y W son la longitud y la más corta de las dos mediciones bidimensionales. El tratamiento se inició cuando el tamaño promedio de los tumores alcanzó 100 mm^3 . El programa de tratamiento fue cuatro dosis de 1 mg/kg administradas en tres días. En la Figura 17 se muestran los resultados de este estudio. Los conjugados mostraron eficacia similar. En este estudio, los ADC AM-Asn-(D)Lys fueron más potentes que los correspondientes conjugados AW-Met-(D)Lys.

Ejemplo 75 - Aclaramiento del plasma en ratas

35 La farmacocinética del aclaramiento en plasma de los conjugados anticuerpo-fármaco se estudió en ratas Sprague-Dawley (por ejemplo, de Charles River Laboratories, 250-275 gramos cada una). Los animales recibieron una dosis en bolo en la vena de la cola (IV Push). Se extrajeron 300 μl de sangre completa mediante una cánula insertada en la yugular, o por un corte de la cola, en recipientes con anticoagulante de litio/heparina en cada punto temporal: 0 (predosis), 10, y 30 minutos; 1,2, 4, 8, 24 y 36 horas; y 2, 3,4, 7,14, 21, y 28 días después de la dosis. El anticuerpo total se midió mediante ELISA, por ejemplo, por revestimiento con el dominio extracelular de la proteína diana y posterior detección con un conjugado de anticuerpo dirigido contra Fc- HRP humano (ECD/GxhuFc-HRP). El conjugado de anticuerpo-fármaco se determinó mediante ELISA, por ejemplo, por revestimiento con un anticuerpo dirigido contra el fármaco o contra Fc y posterior detección con un conjugado dominio extracelular-biotina y un conjugado estreptavidina-peroxidasa de rábano picante.

Ejemplo 76 - Aclaramiento del plasma en monos

45 La farmacocinética del aclaramiento en plasma de los conjugados anticuerpo-fármaco y los anticuerpos totales se estudiaron en macacos utilizando un procedimiento similar al descrito anteriormente en el Ejemplo 75.

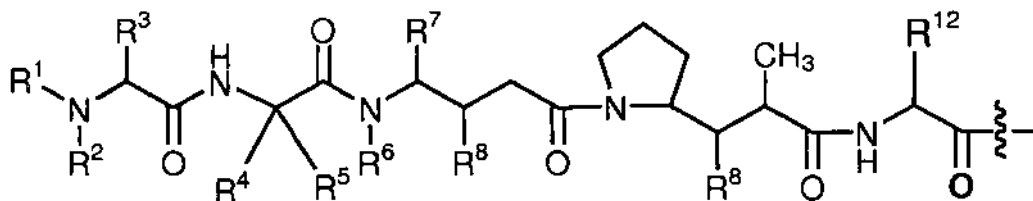
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

10 en la que L es la unidad de ligando, LU es una unidad enlazadora y D es una unidad de fármaco,
L es un péptido, un polipéptido o una proteína que se unen específicamente a una población de células diana;
LU tiene la fórmula -A_a-W_w-,
W_w es una secuencia de w seleccionada independientemente de aminoácidos dirradicales, que comprende un
15 aminoácido natural unido a un aminoácido no natural, en donde el W proximal a la unidad de fármaco (W₁) está
unido mediante un enlace peptídico a la unidad de fármaco, con la condición de que W₁ no pueda formar una
amida secundaria con el aminoácido del extremo C de D y que el enlace peptídico pueda escindirse mediante
una proteasa intracelular,
w es un número entero comprendido entre 2 y 12,
A es una unidad ensanchadora, y
a es 1 o 2;
20 p es un número entero de 1 a 20; y
D tiene la fórmula:



en la que la línea ondulada indica el enlace peptídico con LU;

25 R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H y alquilo-C₁-C₈, con la condición
de que ambos R¹ y R² no sean -H;
R³ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo-C₃-C₈, -arilo, -alquil C₁-C₈ arilo,
-X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);
30 R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, -carbociclo C₃-C₈, -arilo,
-X¹-arilo, -alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);
R⁵ se selecciona entre el grupo que consiste en -H y metilo;
o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tiene la fórmula -(CR^aR^b)_n- en la que R^a y R^b se
seleccionan independientemente entre el grupo que consiste de -H y -alquilo C₁-C₈ y n se selecciona del grupo
que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;
35 R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en -H y alquilo C₁-C₈;
R⁷ se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, -arilo,
-X¹-arilo, -X¹-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);
cada R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, -OH, -alquilo C₁-C₈,
-carbociclo C₃-C₈ y -O-(alquilo C₁-C₈);
40 R¹² se selecciona entre H, -alquilo C₁-C₈, arilo, -X¹-arilo, carbociclo C₃-C₈, -X¹-(heterociclo C₃-C₈), -alquileno
C₁-C₈, NH₂, -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈), y
cada X₁ es independientemente -alquileno C₁-C₁₀.

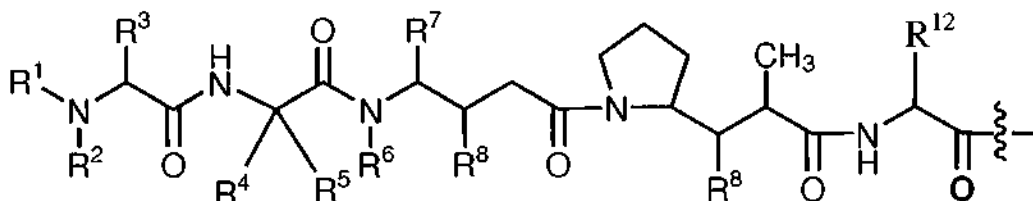
2. Un compuesto que tiene la fórmula:



o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

50 en la que LU- es una unidad enlazadora y D es una unidad de fármaco;
LU tiene la fórmula A_a-W_w-,
W_w es una secuencia de w seleccionada independientemente de aminoácidos dirradicales, que comprende un
aminoácido natural unido a un aminoácido no natural, en donde el W proximal a la unidad de fármaco (W₁) está
unido mediante un enlace peptídico a la unidad de fármaco, con la condición de que W₁ no pueda formar una
55 amida secundaria con el aminoácido del extremo C de D y que el enlace peptídico pueda escindirse mediante
una proteasa intracelular,
w es un número entero comprendido entre 2 y 12,
A es una unidad ensanchadora, y

a es 1 o 2; y
D tiene la fórmula:

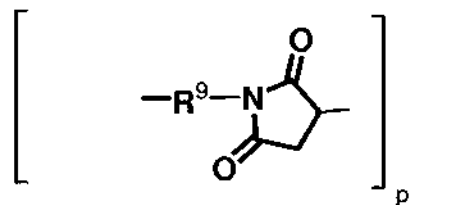


en la que la línea ondulada indica el enlace peptídico con LU;

- 5
10
15
20
- R^1 y R^2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H y alquilo-C₁-C₈;
 - R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, -arilo, alquilarilo C₁-C₈, -X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y -X¹- (heterociclo C₃-C₈);
 - R^4 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, -carbociclo C₃-C₈, -arilo, -X¹-arilo, -alquil C₁-C₈-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y -X¹- (heterociclo C₃-C₈);
 - R^5 se selecciona entre el grupo que consiste H y metilo;
 - o R^4 y R^5 forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tiene la fórmula $-(CR^aR^b)_n-$ en donde R^a y R^b se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste de -H y -alquilo C₁-C₈ y n se selecciona del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;
 - R^a se selecciona entre el grupo que consiste en -H y alquilo C₁-C₈;
 - R^7 se selecciona entre el grupo que consiste en -H, -alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, -arilo, -X¹-arilo, -X¹-(carbociclo C₃-C₈), -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈);
 - cada R^8 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, -OH, -alquilo C₁-C₈, -carbociclo C₃-C₈ y -O-(alquilo C₁-C₈);
 - R^{12} se selecciona entre H, -alquilo C₁-C₈, arilo, -X¹-arilo, carbociclo C₃-C₈, -X¹-(heterociclo C₃-C₈), -alquilenos C₁-C₈, NH₂, -heterociclo C₃-C₈ y -X¹-(heterociclo C₃-C₈), y cada X¹ es independientemente -alquilenos C₁-C₁₀.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde a es 1.

4. El compuesto de la reivindicación 3, donde A tiene la fórmula -NH-R⁹-R¹¹ y R⁹-R¹¹ tienen la fórmula:

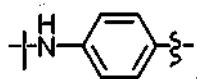


en la que R⁹ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilenos C₁-C₁₀, -carbociclo C₃-C₈, -arileno-, -heteroalquilenos C₁-C₃₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquilenos C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀ alquilenos-, alquilenos -C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquilenos C₁-C₁₀-, -alquilenos C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)- y -(heterociclo C₃-C₈)-alquilenos C₁-C₁₀-.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en donde -NH-R⁹ se selecciona del grupo que consiste en -NH-alquilenos C₁-C₁₀-, -NH-alquilenos C₁-C₁₀-alquilenos NH-C(O)-C₁-C₁₀-, -NH-alquilenos C₁-C₁₀-C(O)-NH-alquilenos C₁-C₁₀-, -NH-(CH₂CH₂O)_r-, -NH-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, -NH-alquilenos C₁-C₁₀-, -O-alquilenos C₁-C₁₀-, -NH-alquilenos C₁-C₁₀-NH(O)-alquilenos C₁-C₁₀-, -NH-(carbociclo C₃-C₈)-, -NH-(arileno)-, -NH-alquilenos C₁-C₁₀-NH(O)-(arileno)- y -NH-(heterociclo C₃-C₈)-, donde r es un número entero de 1 a 10, por ejemplo, en donde -NH-R⁹ se selecciona del grupo que consiste en:



o por ejemplo en donde -NH-R⁹ es:

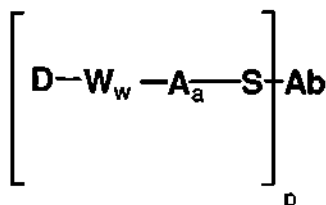


6. El compuesto de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que Ww se selecciona entre el grupo que consiste en -ε-N-trimetilisina-prolina, Norvalina-ácido aspártico y Fenilglicina-lisina-,

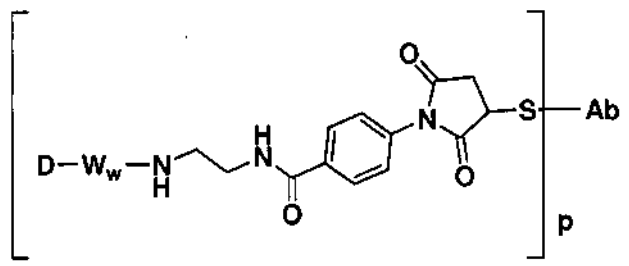
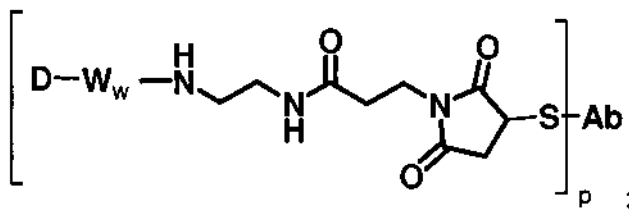
7. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que w es 2.

5 8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que L es un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo.

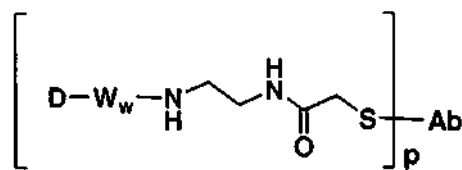
9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo (Ab) se une a la unidad de aminoácido (W_w) a través de un resto cisteína del anticuerpo y el compuesto tiene la siguiente fórmula:



10 y en donde opcionalmente el compuesto tiene una de las siguientes fórmulas:



o



15 10. El compuesto de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo se une específicamente a un antígeno de linfocitos B o se une específicamente a CD19, CD20, CD30, CD33, CD70, BCMA o un antígeno Lewis Y.

20 11. El compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, que está en forma aislada y purificada.

25 12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto de la reivindicación 1, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables, comprendiendo la composición farmacéutica de manera opcional y adicional una cantidad terapéuticamente eficaz de agente quimioterapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en un inhibidor de la formación de tubulina, un inhibidor de la topoisomerasa y un ligando de ADN.

13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un método de tratamiento.

30 14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un método de tratamiento del cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa,

en donde de manera opcional

- 5 (a) el compuesto está en una formulación que comprende un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables;
- (b) el compuesto está formulado como dosis unitaria inyectable;
- (c) la cantidad de compuesto administrado a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg del peso del paciente; o
- 10 (d) el compuesto se administra por vía intravenosa.

15. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en donde el compuesto inhibe el crecimiento de las células tumorales que expresan en exceso un antígeno asociado a un tumor y donde el anticuerpo se une a dicho antígeno asociado al tumor, comprendiendo el método adicionalmente de manera opcional administrar un agente quimioterapéutico;
- 15 y en donde el cáncer se selecciona de manera opcional entre el grupo que consiste en cáncer de mama, de ovario, de estómago, endometrial, de glándulas salivares, de pulmón, de riñón, de colon, colorrectal, de tiroides, pancreático, de próstata y de vejiga.

Figura 1

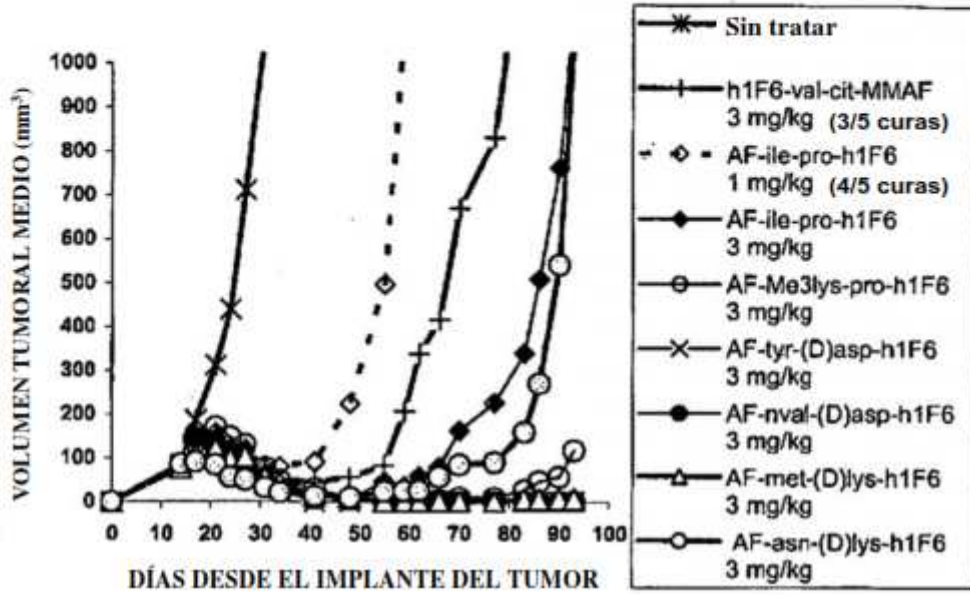


Figura 2

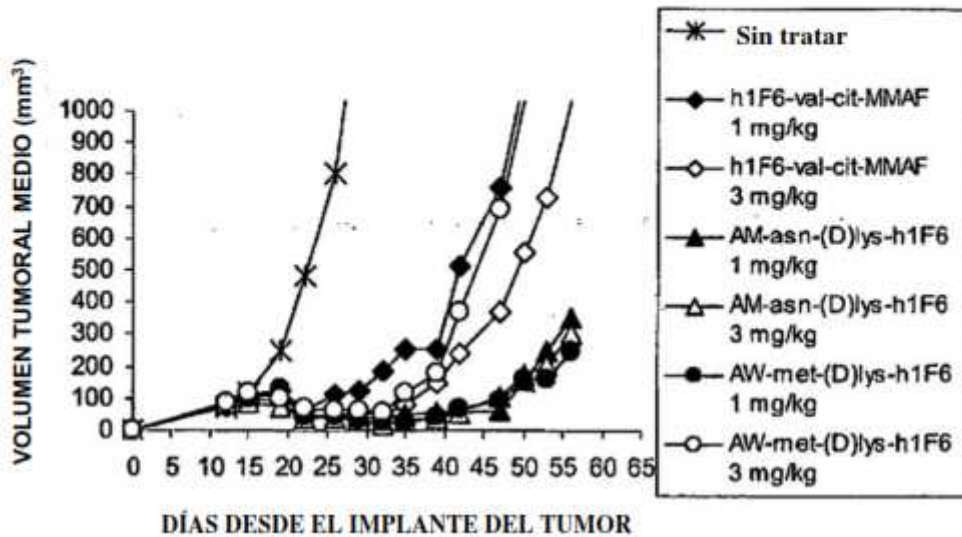


Figura 3

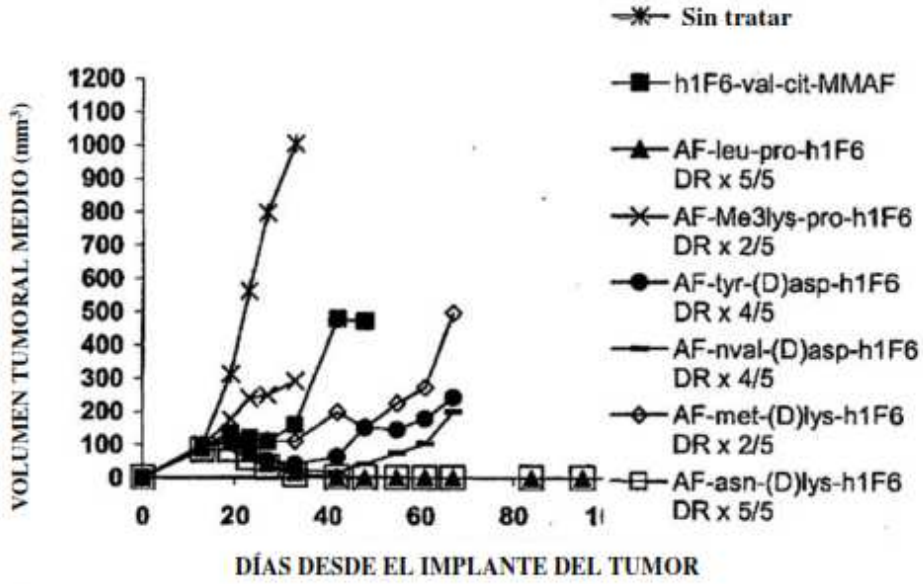


Figura 4

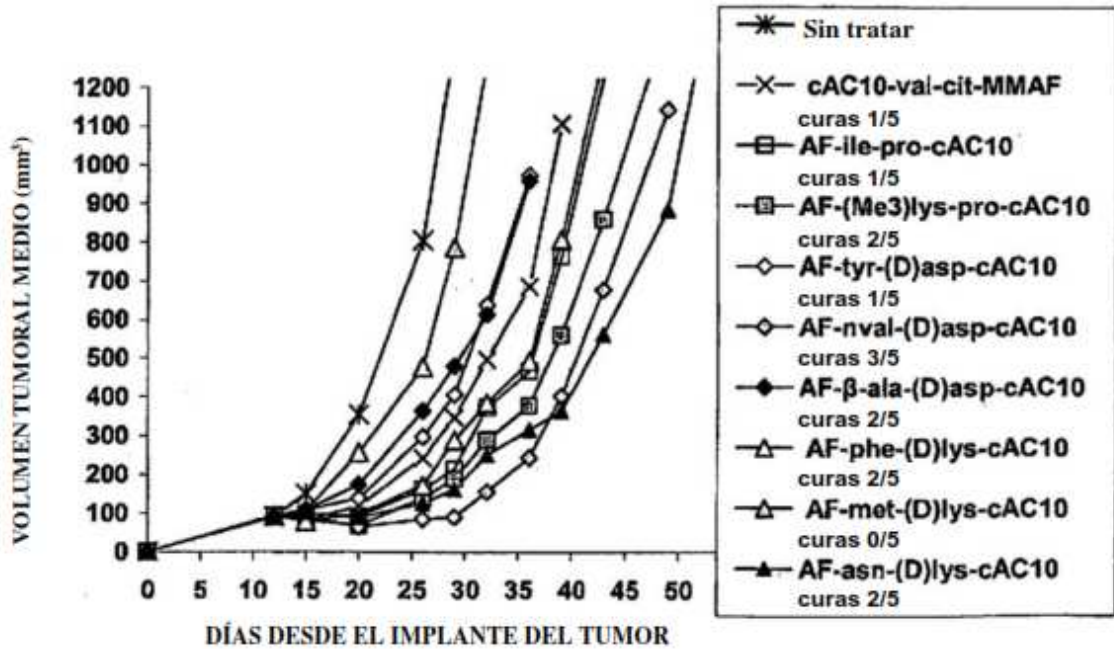


Figura 5

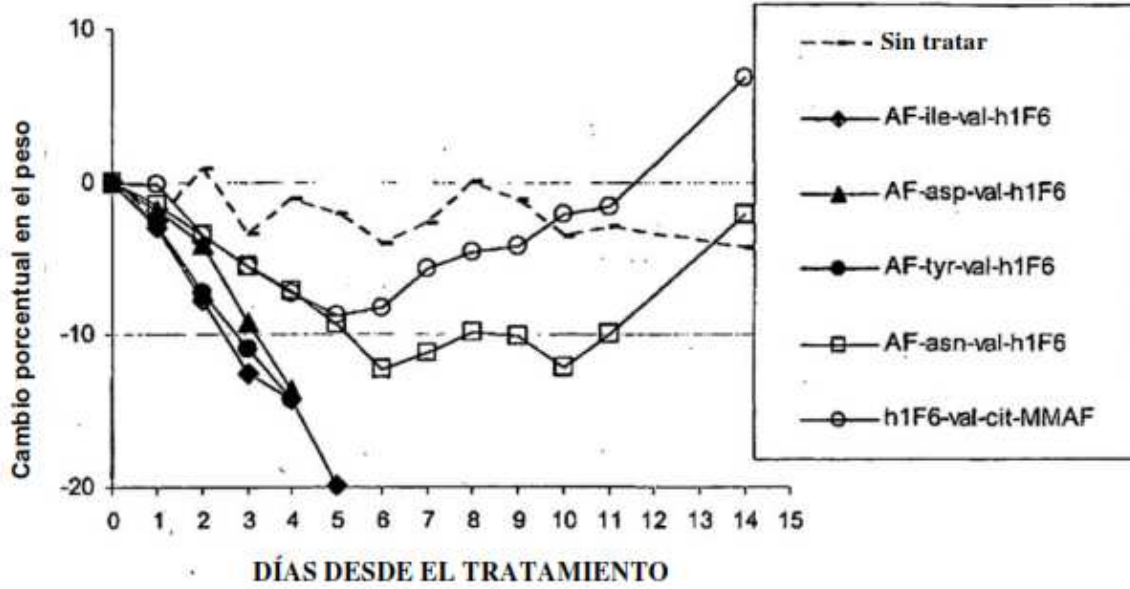


Figura 6

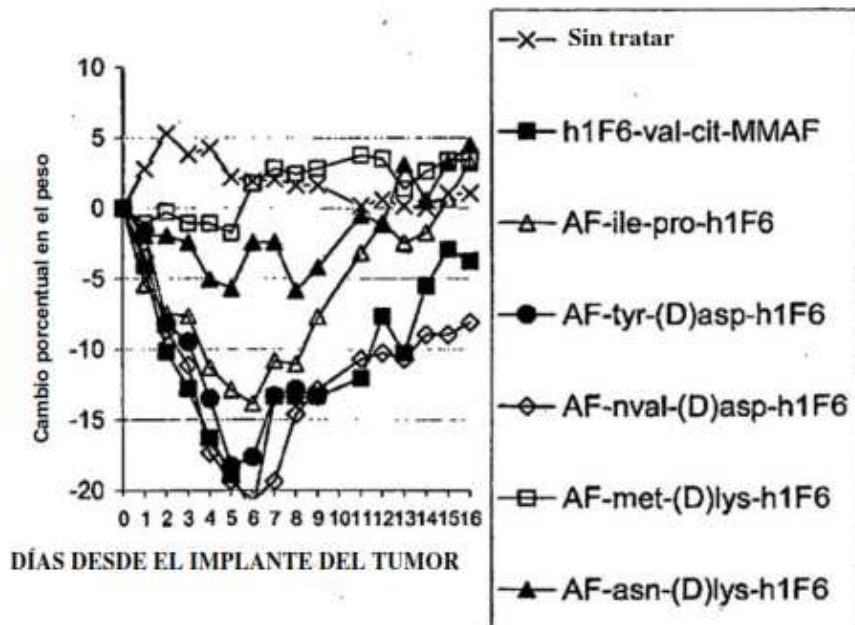


Figura 7

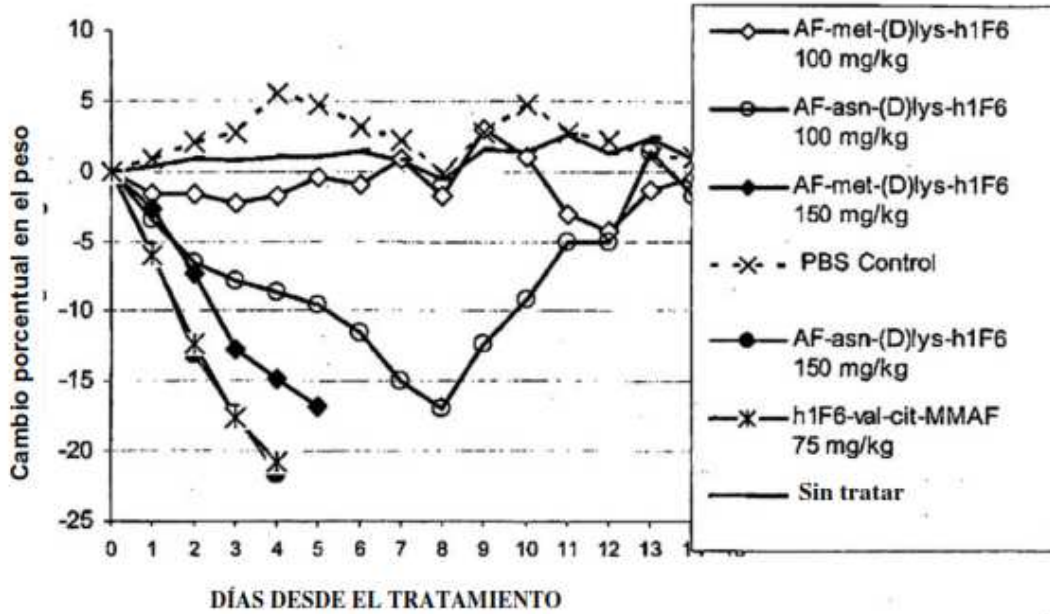


Figura 8

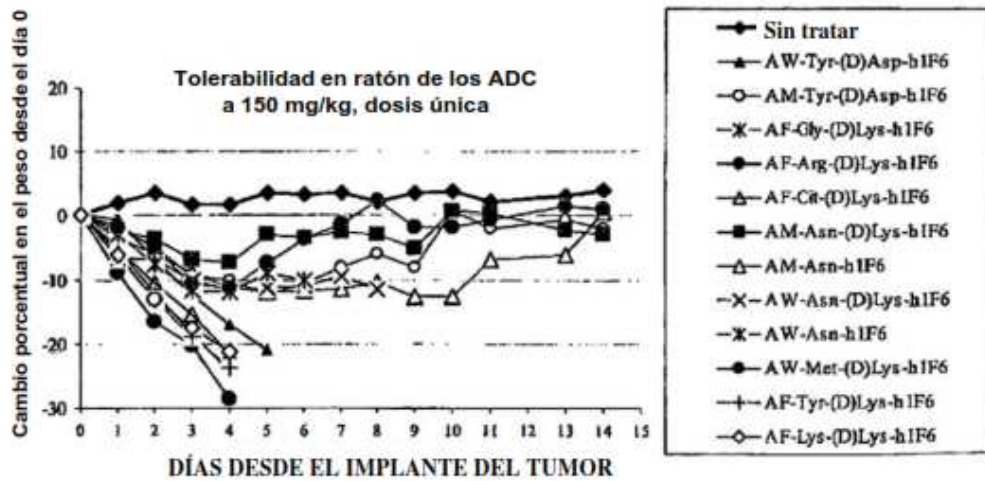


Figura 9

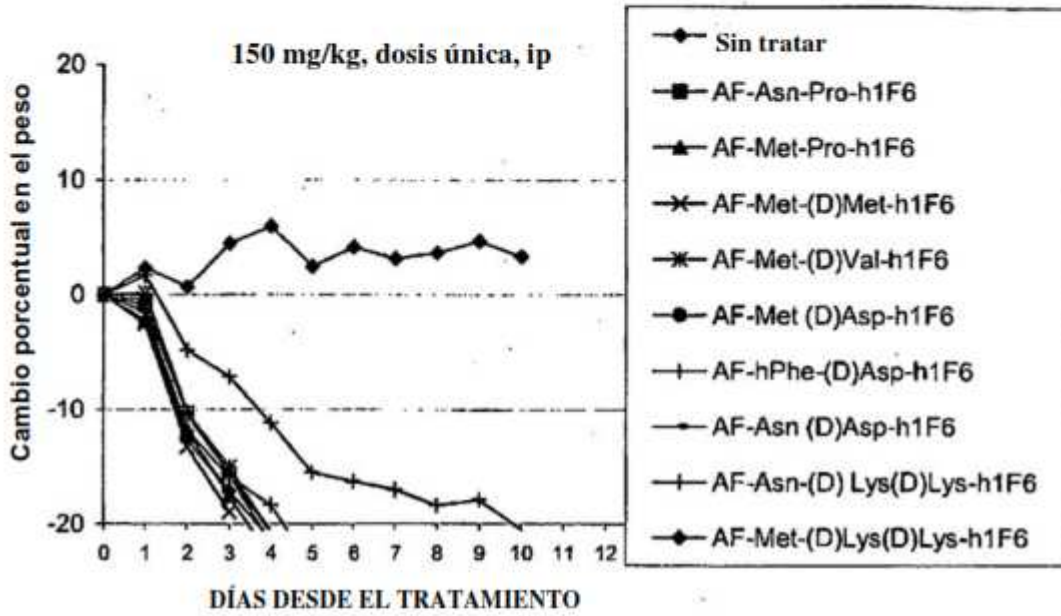


Figura 10

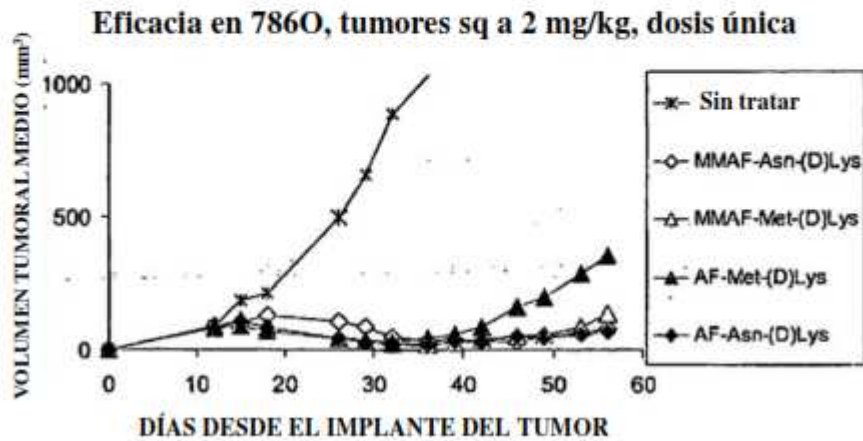


Figura 11

Tolerabilidad en ratón de los ADC a 100 mg/kg, dosis única

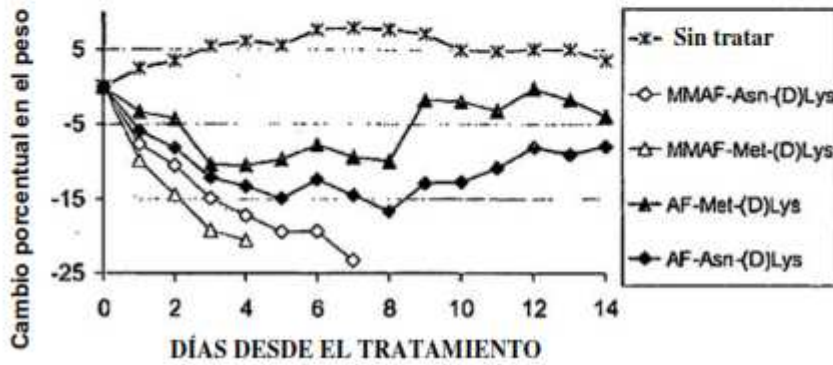


Figura 12

Eficacia de los ADC en 786O a 2 mg/kg, dosis única

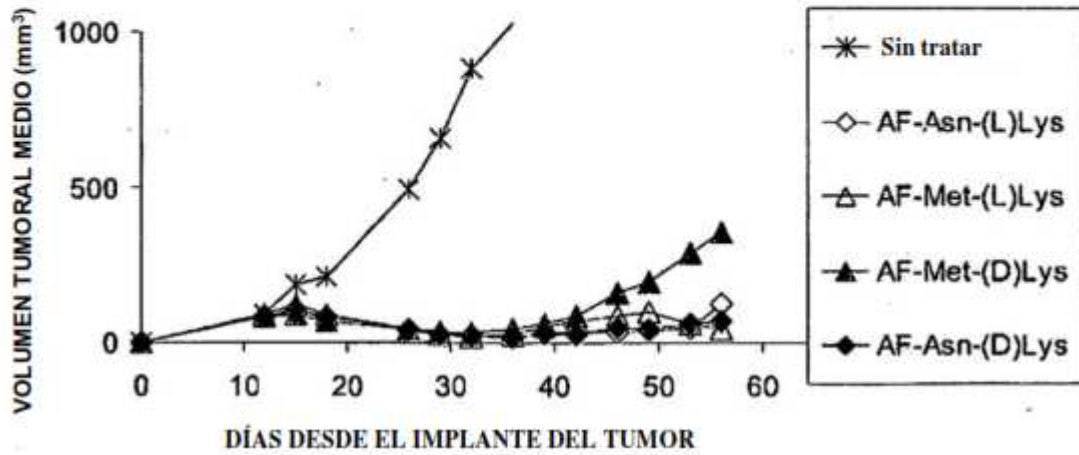


Figura 13

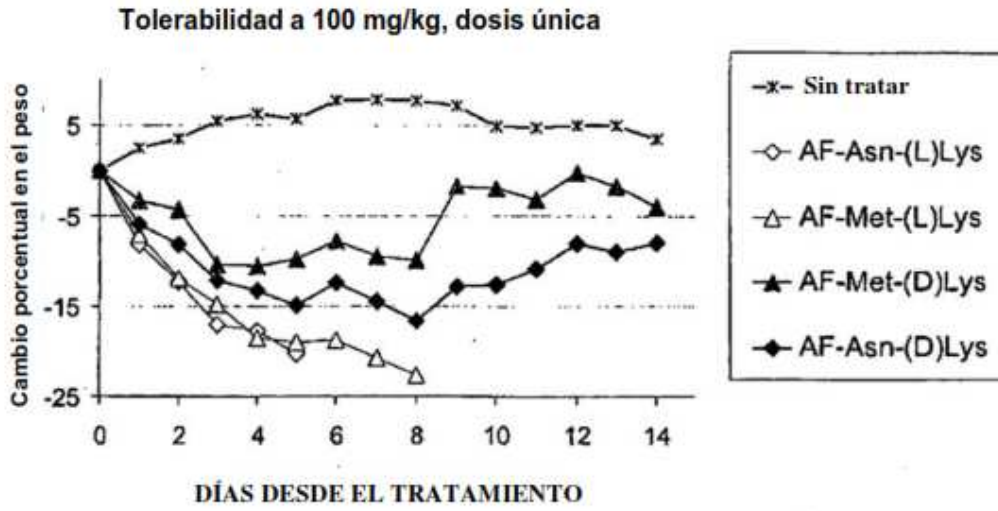


Figura 14

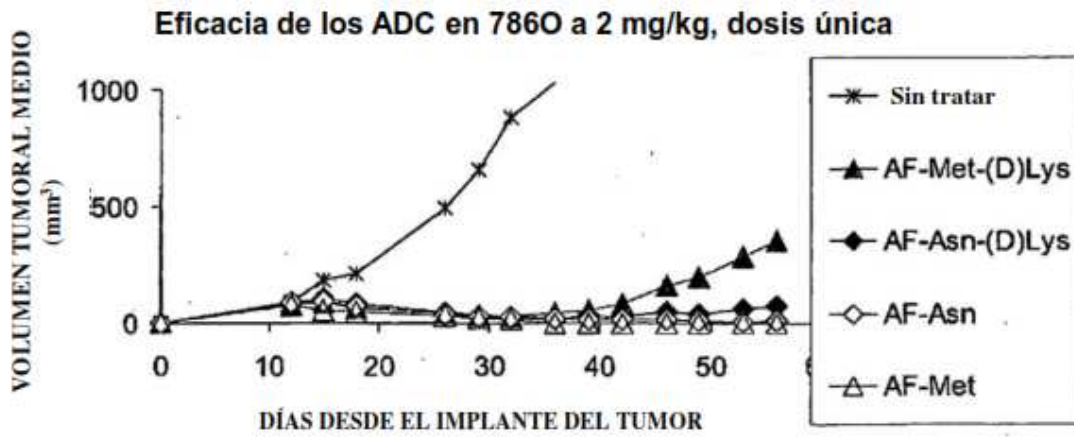


Figura 15

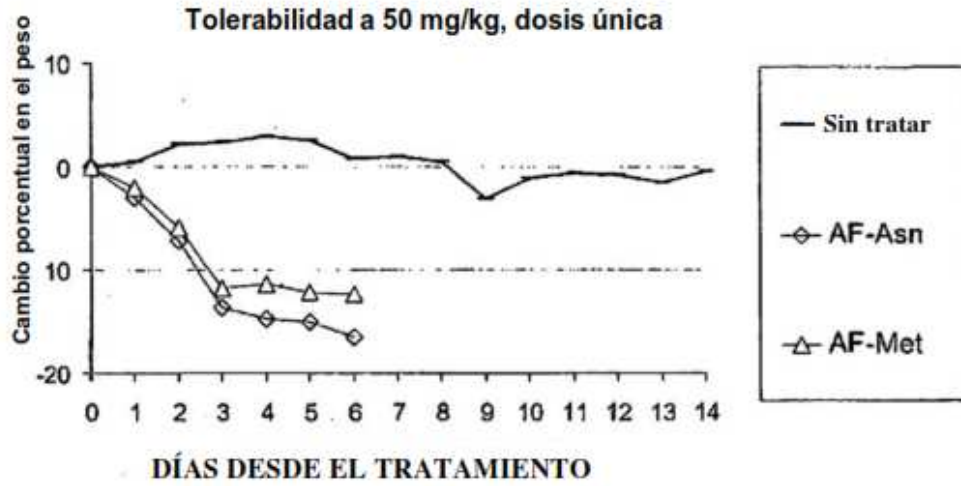


Figura 16

**Eficacia de los ADC de hBU12 en xenoinjertos de tumor DoHH-2
3 mg/kg, cuatro dosis en cuatro días**

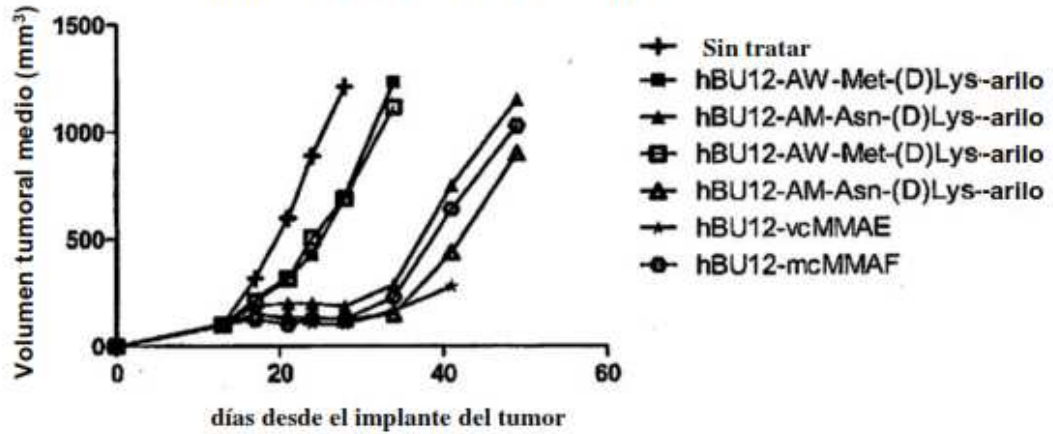


Figura 17

Eficacia de los ADC de cAC10 de análogos de maleimida de AM-Asn-(D)Lys y AW-Met-(D)Lys en xenoinjertos de tumor L540cy 1 mg/kg, cuatro dosis en tres días

