

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 648**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2013 PCT/US2013/046669**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13192360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2013 E 13732069 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2861262**

54 Título: **Conjugados de fármaco de anticuerpo anti-CD70**

30 Prioridad:

19.06.2012 US 201261661782 P

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

14.05.2019

73 Titular/es:

**AMBRX, INC. (100.0%)
10975 North Torrey Pines Road, Suite 100La Jolla
CA 92037 / US
La Jolla, US**

72 Inventor/es:

**BARNETT, RICHARD, S.;
KNUDSEN, NICK;
SUN, YING;
BIROC, SANDRA;
BUSS, TIMOTHY;
JAVAHISHVILI, TSOTNE;
BRESSON, DAMIEN;
SRINAGESH, SHAILAJA;
HEWET, AMHA y
PINKSTAFF, JASON, K.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 712 648 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de fármaco de anticuerpo anti-CD70

5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] Esta invención se refiere a anticuerpos anti-CD70 y conjugados de fármaco de anticuerpo que comprenden al menos un aminoácido no codificado de forma natural. En el presente documento se describen los anticuerpos α CD70 con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y se describen adicionalmente los conjugados de fármaco de anticuerpo en los que los anticuerpos α CD70 de la invención se conjugan con una o más toxinas. Además, se describen métodos para usar dichos conjugados de fármacos de anticuerpos de aminoácidos no naturales, incluidos los usos terapéuticos, de diagnóstico y otros de biotecnología.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 [0002] CD70 es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) de moléculas unidas a la membrana celular y secretadas que se expresan por una variedad de tipos de células normales y malignas. La secuencia de aminoácidos primarios (AA) de CD70 predice una proteína transmembrana de tipo II con su extremo carboxilo expuesto al exterior de las células y su extremo amino encontrado en el lado citosólico de la membrana plasmática (Bowman et al., 1994, J Immunol 152): 1756-61; Goodwin et al., 1993, Cell 73: 447-56). El CD70 humano está compuesto por un dominio citoplásmico de 20 AA, un dominio transmembrana de 18 AA y un dominio extracitoplásmico de 155 AA con dos sitios potenciales de glicosilación unidos a N (Bowman et al., Supra; Goodwin et al., Supra). La inmunoprecipitación específica de células que expresan CD70 marcadas con radioisótopos por anticuerpos anti-CD70 produce polipéptidos de 29 y 50 kDa (Goodwin et al., Supra; Hintzen et al., 1994, J Immunol 152: 1762-73). Basándose en su homología con TNF-alfa y TNF-beta, especialmente en las cadenas estructurales C, D, h y l, se predice una estructura trimérica para CD70 (Petsch et al., 1995, Mol Immunol 32: 761-72).

30 [0003] Los estudios inmunohistológicos originales revelaron que CD70 se expresa en células B del centro germinal y células T raras en amígdalas, piel y tripas (Hintzen et al., 1994, Int Immunol 6: 477-80). Posteriormente, se informó que CD70 se expresaba en la superficie celular de los linfocitos T y B recientemente activados por antígeno, y su expresión disminuye después de la eliminación de la estimulación antigénica (Lens et al., 1996, Eur J Immunol 26: 2964-71; Lens et al., 1997, Immunology 90: 38-45). Dentro del sistema linfóide, las células asesinas naturales (Orengo et al., 1997, Clin Exp Immunol 107: 608-13) y las células dendríticas periféricas maduras de ratón (Akiba et al., 2000, J Exp Med 191: 375-80) también se expresan CD70. En linajes no linfoides, se ha detectado CD70 en células epiteliales medulares del timo (Hintzen et al., 1994, supra; Hishima et al., 2000, Am J Surg Pathol 24: 742-46).

40 [0004] Además de la expresión en células normales, la expresión de CD70 se ha informado en diferentes tipos de cáncer, incluidos linfomas, carcinomas y tumores de origen neural. En células B malignas, el 71% de los linfomas difusos de células B grandes, el 33% de los linfomas del centro del folículo, el 25% de los linfomas del manto y el 50% de las B-CLL expresan CD70 (Lens et al., 1999, Br J Haematol 106: 491-503). CD70 se expresa frecuentemente junto con otros marcadores de activación linfoides en las células malignas de Hodgkin y Reed-Sternberg de la enfermedad de Hodgkin (Gruss y Kadin, 1996, Baillieres Clin Haematol 9: 417-46). Un informe demuestra la expresión de CD70 en 88% (7 de 8 casos) de carcinomas tímicos y 20% (1 de 5 casos) de timomas atípicos (Hishima et al., 2000, supra). El segundo tipo de carcinoma en el que se ha detectado CD70 es el carcinoma nasofaríngeo. Un estudio informa la presencia de CD70 en el 80% (16 de 20 casos) de biopsias de tumores congelados obtenidos a partir de carcinomas nasofaríngeos indiferenciados (Agathangelou et al., 1995, Am J Pathol 147: 1152-60). CD70 también se ha detectado en células de tumores cerebrales, especialmente líneas celulares de glioma, gliomas humanos sólidos y meningiomas (Held-Feindt y Mentlein, 2002, Int J Cancer 98: 352-56; Wischusen et al., 2002, Can Res 62: 2592-99).

55 [0005] Se ha propuesto que los virus de transformación que incluyen el virus de Epstein-Barr (EBV) y el virus de leucemia T humano 1 (HTLV-1) pueden inducir CD70 en células como las células epiteliales que normalmente no expresan CD70 (Agathangelou et al., supra; Stein et al., 1989, Oxford University Press, p. 446). Por lo tanto, la expresión de CD70 en células B malignas podría ser un reflejo de la transformación oncogénica (Lens et al., 1999, supra). Además, dado que la expresión de CD70 se induce en las células B después del encuentro con el antígeno (Maurer et al., 1990, Eur J Immunol 20: 2679-84; Lens et al., 1996, supra), la expresión estable de CD70 podría reflejar una estimulación antigénica prolongada. Se ha postulado que esto ocurre en linfomas foliculares no Hodgkin basados en hipermutación somática en curso (Bahler y otros, 1992, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89: 6770-74; Bahler y otros, 1992, Cancer Res 52: suppl. 5547S -51S).

65 [0006] El receptor para CD70 es CD27, una proteína transmembrana de tipo I glicosilada de aproximadamente 55 kDa (Goodwin et al., 1993, Cell 73: 447-56; Hintzen et al., 1994, supra). CD70 se refiere a veces como CD27L. CD27. que existe como un homodímero en la superficie celular (Gravestain et al., 1993, Eur J Immunol 23: 943-50), es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF como se define en las repeticiones ricas en cisteína de aproximadamente 40 aminoácidos en el dominio extracelular (Smith et al., 1990, Science 248: 1019-23; Locksley et

al., 2001, Cell 104: 487-501). La CD27 se expresa típicamente por timocitos, células NK, T y B (Hintzen et al., 1994, Immunol Today 15: 307-11; Lens et al., 1998, Semin Immunol 10: 491-99). En las células T en reposo, CD27 se expresa de forma constitutiva, pero el desencadenante antigénico regula aún más la expresión de CD27 (de Jong et al., 1991, J Immunol 146: 2488-94; Hintzen et al., 1993, J Immunol. 151: 2426-35). Además, la activación de las células T a través de su complejo de receptor de antígeno de células T solo o en combinación con la molécula accesoria CD28 libera CD27 soluble de células T activadas (Hintzen et al., 1991, J Immunol 147: 29-35). Las células B naive no expresan CD27, pero su expresión se induce y, a diferencia de CD70, se mantiene después del desencadenante antigénico de las células B (Jacquot S et al., 1997 J Immunol 159: 2652-57; Kobata T et al., 1995, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 92: 11249-53).

[0007] En marcado contraste con la expresión restringida de CD27 y CD70 en células de linaje B normal, tanto CD27 como CD70 se expresan frecuentemente en muchos linfomas y leucemias de células B no Hodgkin. Esto podría potencialmente conducir a interacciones CD27-CD70 funcionales en estas células en forma de un bucle autocrino, dando como resultado la señalización de CD27 y la proliferación inducida por CD70, proporcionando así una ventaja de crecimiento para las células malignas (Lens et al., 1999, supra).

[0008] Los datos disponibles apoyan un modelo en el que la ligadura de CD27 en linfocitos activados por CD70 emite señales a las células que expresan CD27, incluidas señales coestimuladoras en células T, B y NK. (Ver, por ejemplo, Goodwin y otros, supra; Hintzen y otros, 1995, J Immunol 154: 2612-23; Oshina y otros, 1998, Int Immunol 10: 517-26; Smith y otros, supra; Van Lier et al., 1987, J Immunol 139: 1589-96; Gravestien et al., 1995, Int Immunol 7: 551-7; Tesselaar et al., 1997, J Immunol 159: 4959-65; Jacquot et al. supra; Agematsu et al., 1998, Blood 91: 173-80; Kobata et al., supra; Agematsu et al., 1997, Eur J Immunol 27: 2073-79; Sugita et al., 1992, J Immunol 149: 1199-1203; Orengo et al., 1997, Clin Exp Immunol 107: 608-13). Se ha demostrado que los anticuerpos contra CD70 murino y humano inhiben tales actividades, probablemente al bloquear la interacción CD70/CD27 (Hintzen et al., 1994, supra; Hintzen et al., 1995, supra; Oshima et al., Supra).

[0009] Se dispone de información limitada sobre la modulación de las funciones celulares a través de la señalización de CD70 en la interacción CD70/CD27, es decir, "señalización inversa". Algunos anticuerpos CD70 tienen la capacidad de aumentar la proliferación de células T cuando se presentan a células T que expresan CD70, ya sea reticuladas con un anticuerpo secundario o inmovilizadas en placas de cultivo de tejidos (Bowman et al., 1994, J Immunol 152: 1756-61); Brugnoli, 1997, Immunol Lett 55: 99-104). Dicha "señalización inversa" también se ha descrito en un subconjunto de células de leucemia linfocítica crónica B (B-CLL), y el CD70 puede funcionar como un receptor para transducir señales para facilitar la proliferación de células B-CLL purificadas estimuladas con PMA (Lens et al., 1999, supra). Estas observaciones sugieren situaciones en las que el compromiso de CD27 y CD70 puede resultar en la administración de señales agonísticas a las células que expresan CD27 y CD70.

[0010] El papel de la coestimulación con CD70/CD27 en enfermedades autoinmunes mediadas por células se ha investigado en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Nakajima et al., 2000, J Neuroimmunol 109: 188-96). La administración *in vivo* de un mAb CD70 anti-ratón particular (clon FR-70) suprimió notablemente la aparición de EAE al inhibir la producción de TNF-alfa inducida por antígeno sin afectar el cebado de las células T, la producción de Ig o el equilibrio celular T_{H1}/T_{H2} . Sin embargo, tal tratamiento tuvo poca eficacia en la enfermedad establecida. Se ha informado de que la expresión de CD70 en las células T se mejoró con TNF-alfa e IL-12 y se regula a la baja por IL4 (Lens et al., 1998, supra). Por lo tanto, las interacciones de las células t-T mediadas por CD70/CD27 pueden jugar un papel en la mejora de las respuestas inmunes mediadas por T_{H1} en lugar de las respuestas mediadas por T_{H2} . Apoyando esta hipótesis, el anti-ratón CD70 mAb FR-70 también es eficaz para inhibir la artritis inducida por colágeno mediada por T_{H1} (Nakajima et al., 2000, supra). En contraste, el mismo mAb CD70 anti-ratón no mostró ninguna eficacia en la modulación del lupus en ratones NZB/NZW F1 y en Leishmania mayor infección experimental en ratones BALB/c susceptibles, los cuales son predominantemente respuesta autoinmune mediada por T_{H2} (Nakajima et al., 1997, J Immunol 158, 1466-72; Akiba et al., 2000, J Exp Med 191: 375-380).

[0011] El papel de CD70 aún no se ha investigado en la enfermedad aguda de injerto contra huésped (aGVHD), otra respuesta inmune mediada por T_{H1} . La GVHD es una consecuencia importante y a menudo letal de la terapia alogénica de trasplante de médula ósea (TMO) que ocurre cuando hay diferencias de antígeno de histocompatibilidad entre el donante de MO y el receptor del trasplante (den Haan et al., 1995, Science 268: 1476). La GVHD es causada por células T maduras presentes en la médula transplantada, así como por otras poblaciones celulares menores (Giralat y Champlin, 1994, Blood 84: 3603). Cabe destacar que CD70 se ha detectado *in vivo* en células CD4⁺ en condiciones caracterizadas por una reacción alogénica, como en los casos de injerto de células T maternas en pacientes con deficiencia inmunitaria combinada grave (Brugnoli et al., Immunol Lett 55: 99-104). La profilaxis de la GVHD se logra mediante agentes inmunosupresores de células pan-T, como ciclosporina, corticosteroides o metotrexato. Además de la falta de especificidad, estos agentes también están asociados con efectos secundarios adversos significativos. Para limitar estos efectos indeseables y la interrupción de las funciones normales de las células T, es muy necesario realizar otras intervenciones terapéuticas basadas en la selección selectiva de las células T que participan directamente en el reconocimiento y el rechazo del injerto.

[0012] El CD70 es un objetivo potencialmente útil para la inmunoterapia dirigida por anticuerpos. Como se indicó

anteriormente, CD70 tiene un patrón de expresión restringido en células normales: la expresión de CD70 se restringe principalmente a las células T y B activadas por antígeno en condiciones fisiológicas, y su expresión se regula a la baja cuando cesa la estimulación antigénica. Se cree que el papel clave de CD70 es facilitar la diferenciación de las células plasmáticas y contribuir a la generación y mantenimiento de la memoria de células T a largo plazo. Además, la evidencia de modelos animales sugiere que la interacción no regulada de CD70/CD27 puede contribuir a los trastornos inmunológicos y, en humanos, los datos experimentales también apuntan hacia una posible regulación anormal de la vía de CD70/CD27 en los trastornos inmunitarios mediados por T_{H1} como, por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis y esclerosis múltiple. Es de particular interés que CD70 se exprese en una variedad de células transformadas que incluyen linfoma B, células Hodgkin y Reed-Sternberg, células malignas de origen neural y varios carcinomas.

[0013] Varios grupos han demostrado el efecto inhibitorio de mAb anti-CD70 tanto en modelos *in vitro* de activación de linfocitos como en modelos animales de respuestas mediadas por T_{H1}. El enfoque se ha centrado en el uso de anticuerpos para bloquear la vía de coestimulación de CD70/CD27 para lograr una eficacia terapéutica. Sin embargo, una deficiencia principal de tal enfoque es el gran número de receptores de señalización, por ejemplo, la vía co-estimuladora CD28/CD80/CD86, conocida por participar en enfermedades inmunológicas. En consecuencia, el bloqueo de una vía de señalización específica solo puede tener un impacto mínimo en el desarrollo de la enfermedad. Esto está respaldado por las observaciones de que el mAb anti-CD70 solo puede inhibir parcialmente la activación de células T *in vitro* inducida por células estimuladoras alogénicas (Hintzen et al., 1995, *supra*) y un mAb anti-CD70 no mostró eficacia terapéutica en EAE una vez que la enfermedad está establecida (Nakajima et al., 2000, *supra*).

[0014] Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de desarrollar un enfoque para agotar o inhibir el crecimiento de células que expresan CD70 implicadas en cánceres y/o enfermedades inmunológicas por medios distintos o además de bloquear la interacción CD70/CD27. Al expresarse CD70 en la superficie del antígeno maduro que presenta células dendríticas, células T activadas y células B activadas, los agentes que pueden atacar e inhibir o agotar las células CD70 + pueden demostrar ser efectivos en la eliminación de células presentadoras de antígenos que presentan autoantígenos y autorreactivos. Las células T o B activadas, así como las células tumorales que expresan CD70.

[0015] Los enfoques que se han usado para aumentar la eficacia terapéutica de los anticuerpos son radiomarcaje y combinación con quimioterapia; sin embargo, estos enfoques incluyen asociados con efectos secundarios indeseables. Por ejemplo, la terapia isotópica está asociada con la mielosupresión (Witzig, 2001, *Cancer Chemother Pharmacol* 48 (Suppl 1): S91-5), y la combinación de terapia con anticuerpos y quimioterapéuticos está asociada con la inmunosupresión. Además, las sustancias marcadas con isótopos son difíciles de producir, y los pacientes a menudo experimentan recaídas después del tratamiento inicial con sustancias marcadas con isótopos.

[0016] El documento WO2004/073656 describe anticuerpos anti-CD70 conjugados con un agente citotóxico, en particular dolastatinas. El conjugado se forma mediante la unión covalente de un compuesto citotóxico de maleimida a una cisteína del anticuerpo.

[0017] Por consiguiente, existe la necesidad de ADC anti-CD70 que se construyan de tal manera que sean capaces de ejercer un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor clínicamente útil sobre células que expresan CD70, particularmente sin ejercer efectos indeseables sobre células que expresan CD70. Tales compuestos serían agentes terapéuticos útiles contra los cánceres que expresan CD70 o trastornos inmunitarios que están mediados por las células que expresan CD70. Más recientemente, se han identificado MAbs como 2H5. Por lo tanto, se necesitan conjugados de anticuerpo-fármaco de anti-CD70 que pueden utilizarse para imágenes, diagnósticos y/o usos terapéuticos. La presente invención proporciona dichos conjugados anticuerpo-fármaco para uso en inmunología y oncología.

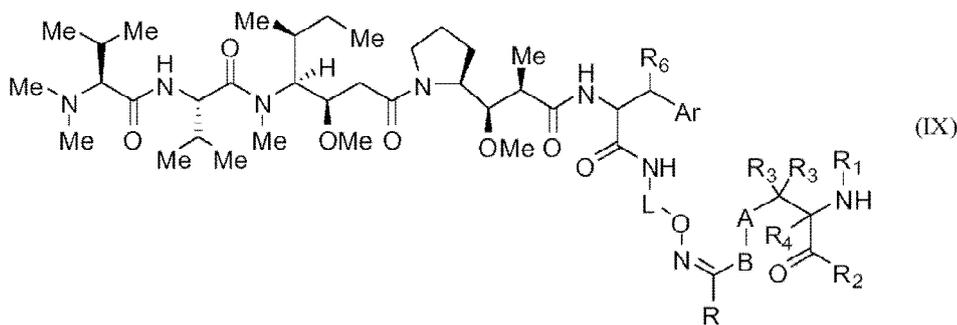
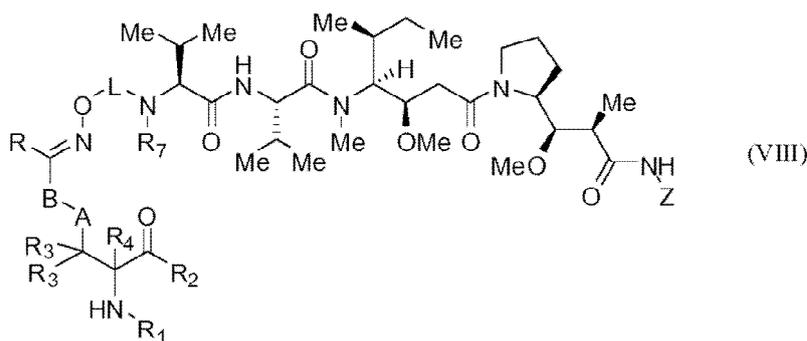
RESUMEN DE LA INVENCION

[0018] En el presente documento se describen anticuerpos anti-CD70 unidos a restos tóxicos a través de uno o más aminoácidos no naturales con uno o más enlazadores, y métodos para elaborar tales aminoácidos y polipéptidos no naturales.

[0019] Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un anticuerpo anti-CD70 que comprende uno o más aminoácidos no codificados de forma natural. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 comprende un aminoácido no codificado de forma natural. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 comprende dos aminoácidos no codificados de forma natural. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 comprende dos o más aminoácidos no codificados de forma natural. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 comprende 3, 4, 5 o 6 aminoácidos más codificados de forma no natural o más modificaciones postraduccionales. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 comprende la secuencia de la cadena pesada dada en la SEQ ID NO. 1. En algunas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo anti-CD70 comprende las SEQ ID NO. 1 y 2. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 está unido a un enlazador, polímero o molécula biológicamente activa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD70 está unido a un enlazador, polímero o molécula

biológicamente activa a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo anti-CD70.

[0020] La presente invención proporciona un compuesto que comprende la Fórmula (VIII) o (IX) en donde el compuesto es un anticuerpo aCD70 conjugado con una dolastatina, en donde la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, en donde Fórmula (VIII) y (IX) corresponden a:



en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, cicloalquilenos inferior, cicloalquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, heteroalquilenos inferior, heterocicloalquilenos sustituido, heterocicloalquilenos inferior, heterocicloalquilenos inferior sustituido, arileno, arileno; heterarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenos o aralquilenos sustituido;

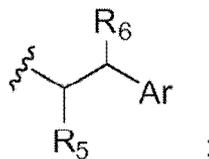
B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, alquilenos inferior, alquilenos inferior sustituido, heteroalquilenos inferior, heteroalquilenos inferior sustituido, -O-, -O-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S-, -S-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -S(O)_k- donde K es 1, 2 o 3, -S(O)_k-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')CO-(alquilenos o alquilenos sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂=N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
R₁ y/o R₂ es un anticuerpo anti-CD70 (aCD70),

en donde el anticuerpo aCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o en donde el anticuerpo aCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o en donde el anticuerpo aCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

R³ y R⁴ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R³ y R⁴ o dos grupos R³ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;
Z tiene la estructura de:

5



10

R⁵ es H, CO₂H, Alquilo C₁-C₆ o tiazol;

R⁶ es OH o H;

R^A es fenilo o piridina;

15

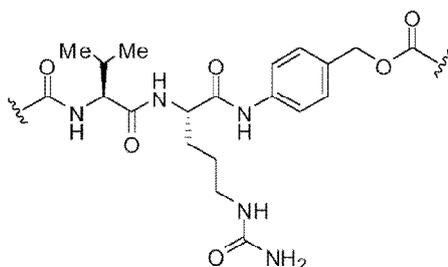
R⁷ es Alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en -alquileo-, -alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_{n'''}-NHC(O)-(alquileo-O)_{n''''}-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-C(O)-, y -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-;

20

W tiene la estructura de:

25

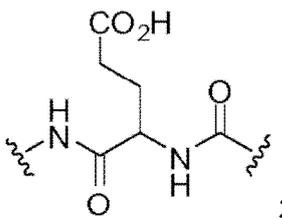


30

35

U tiene la estructura de:

40



45

y

50

cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno;

o un metabolito activo, o un profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

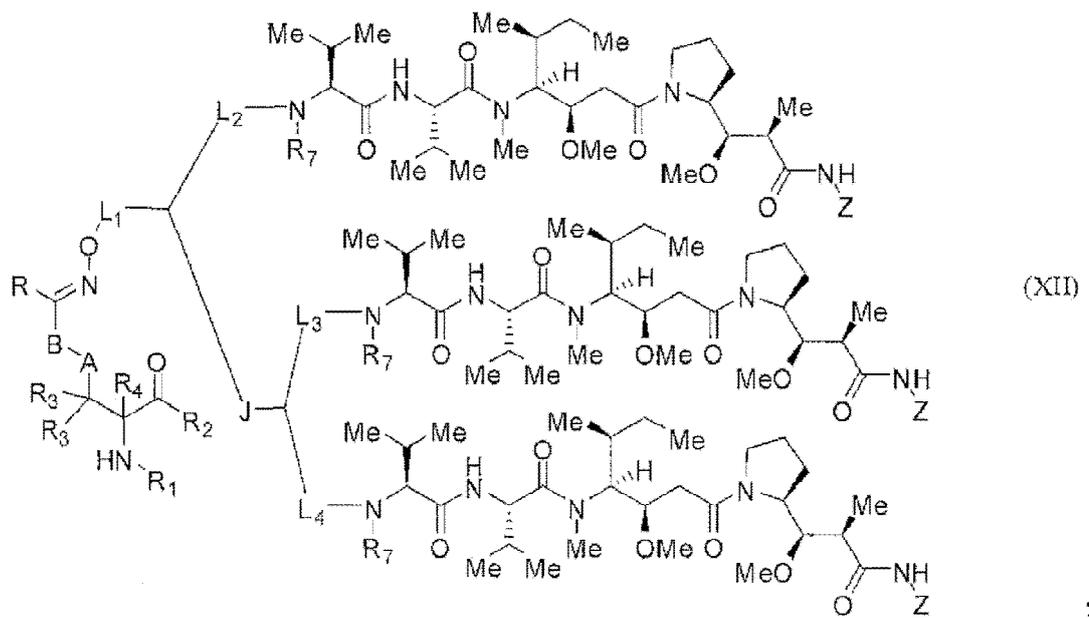
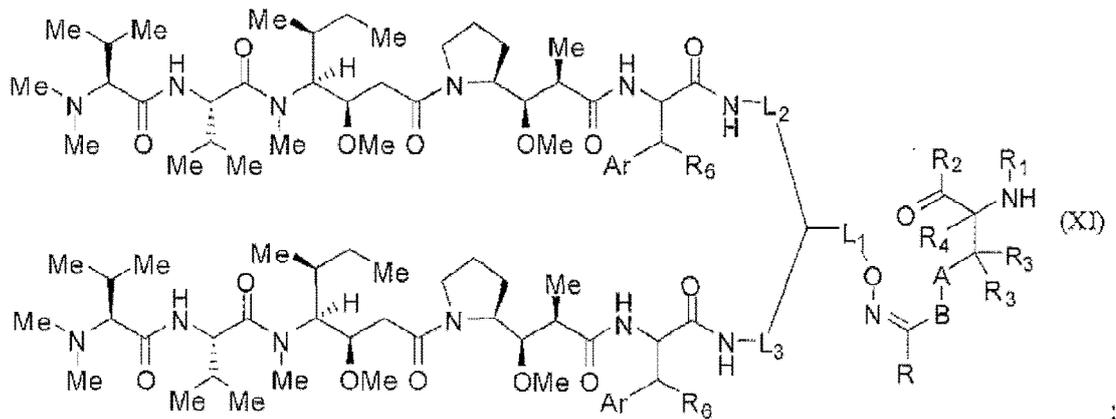
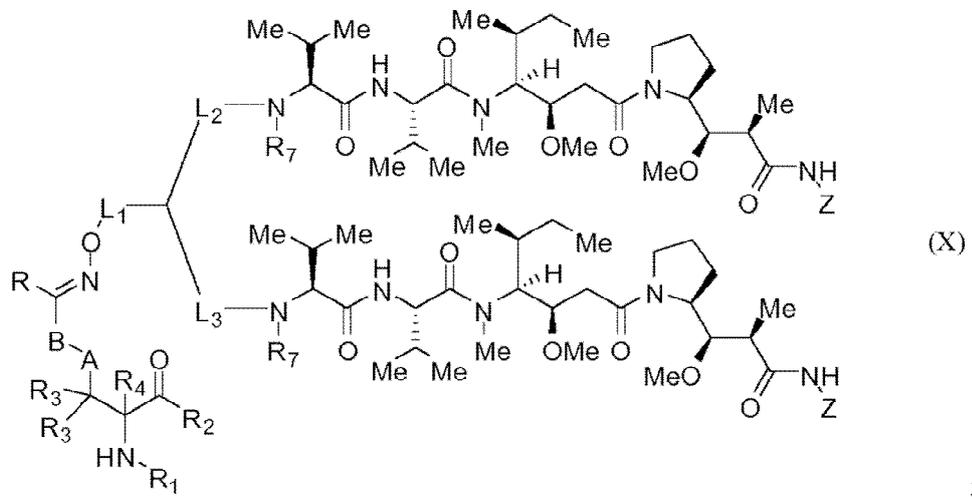
55

[0021] En algunas realizaciones, R₁ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es anti-CD70. En otras realizaciones, R₂ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo anti-CD70. En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo es CD70-2H5-HA119-NCA1.

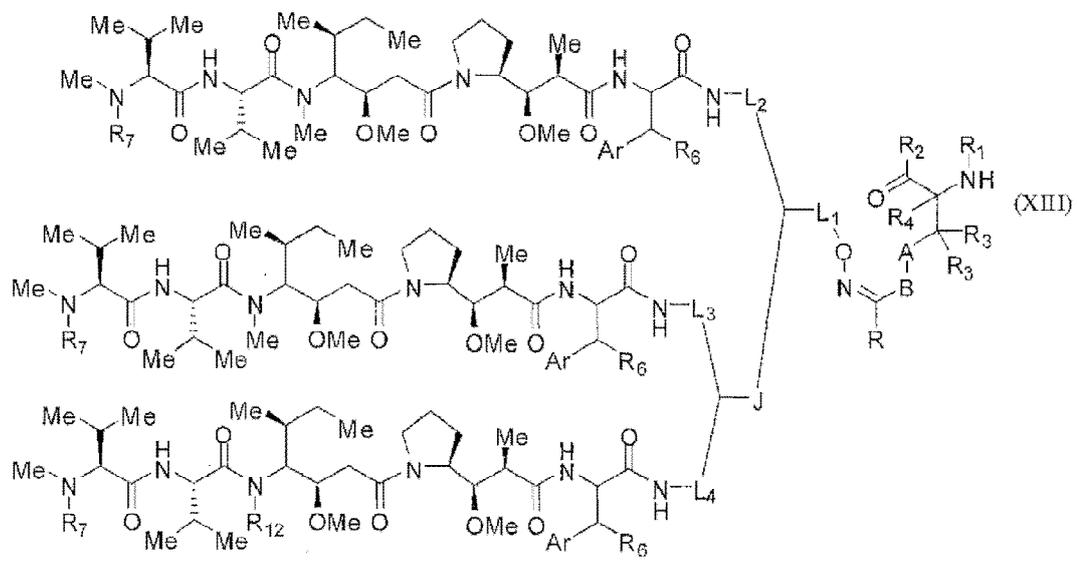
60

[0022] La presente invención también proporciona un compuesto, o sal del mismo, que comprende la Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), en donde el compuesto es un anticuerpo aCD70 conjugado con una dolastatina, en donde la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo en el que las fórmulas (X), (XI), (XII) y (XIII) corresponden a:

65



5
10
15
20
25

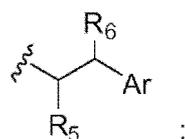


en donde:

30
35
40
45
50
55

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;
 B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_K- donde K es 1, 2 o 3, -S(O)_K (alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;
 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
 R₁ y/o R₂ es un anticuerpo aCD70,
 en donde el anticuerpo aCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o en donde el anticuerpo aCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o en donde el anticuerpo aCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;
 Z tiene la estructura de:

60



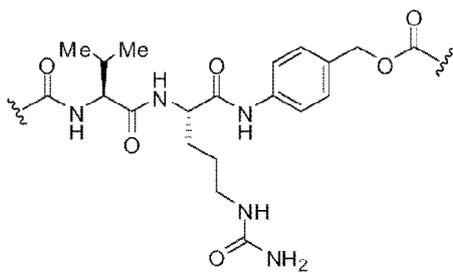
65

R₅ es H, CO₂H, alquilo C₁-C₆ o tiazol;
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

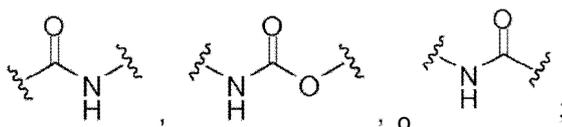
R₇ es Alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de ellos enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, alquileo, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-, alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n-alquileo-J'-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo'-, -W-, -alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-alquileo-NMe-alquileo'-NMe-alquileo'-W-, y -alquileo-J-alquileo'-NMe-alquileo'-NMe-alquileo'''-W-;

W tiene la estructura de:



cada J y J' independientemente tienen la estructura de:

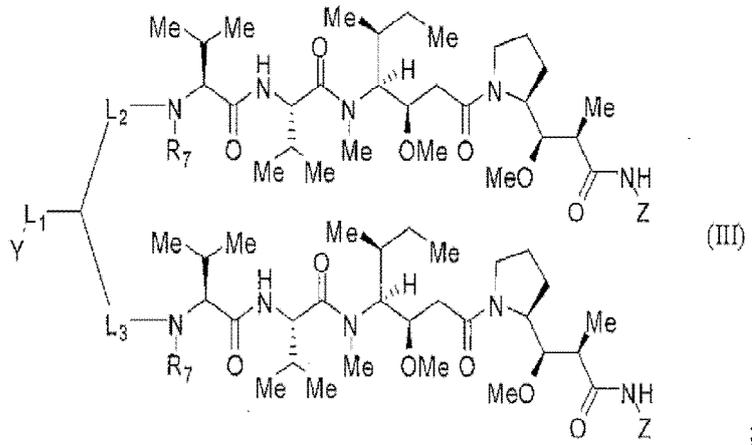
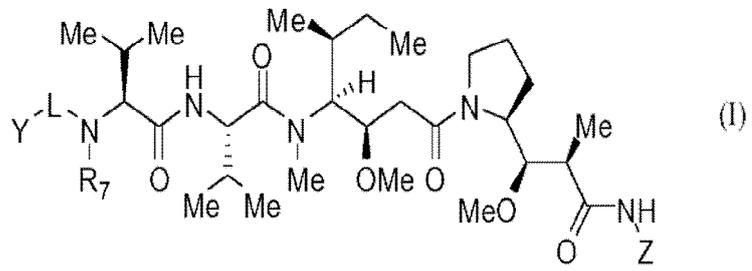


y

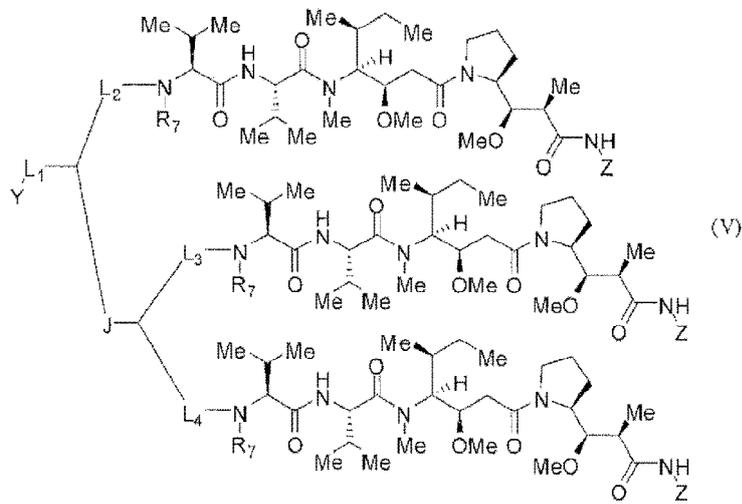
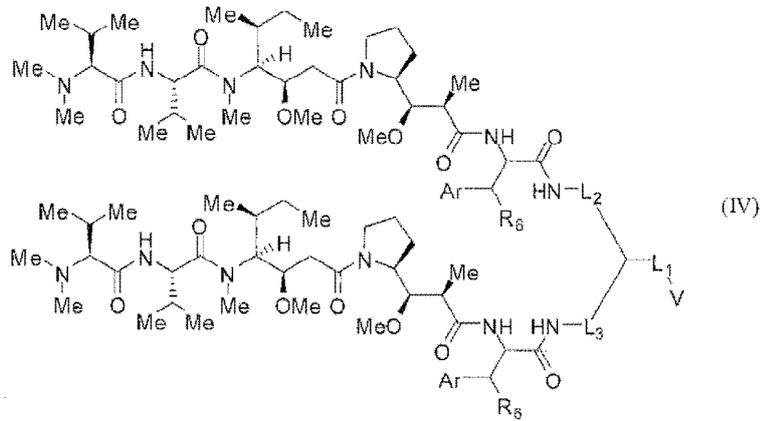
cada n y n' son independientemente números enteros mayores o iguales a uno.

[0023] En algunas realizaciones, R₁ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo es herceptina. En otras realizaciones, R₂ es un polipéptido. En realizaciones específicas, el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es aCD70. En algunas realizaciones, el anticuerpo se deriva de cualquier anticuerpo aCD70 conocido. En ciertas realizaciones específicas, el anticuerpo es ARX-aCD70.

[0024] La invención también proporciona un método para derivar un análogo de dolastatina que comprende la Fórmula (I), (III), (IV), (V) o (VI), en donde el análogo de dolastatina derivatizado es un anticuerpo aCD70 conjugado con una dolastatina, en donde la conjugación ocurre a través de un aminoácido no codificado naturalmente en el anticuerpo, en donde el método comprende poner en contacto el análogo de dolastatina con un reactivo de Fórmula (XXXVII), en donde la Fórmula (I), (III), (IV), (V), o (VI) corresponden a:



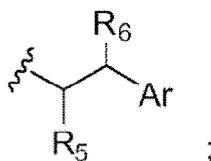
;



en donde:

Z tiene la estructura de:

5



10

R₅ es H, CORs, alquilo C₁-C₆ o tiazol;

R_s es OH o -NH-(alquileo-O)_n-NH₂;

R₆ es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

15

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

Y es NH₂-O- y V es NH₂-O-;

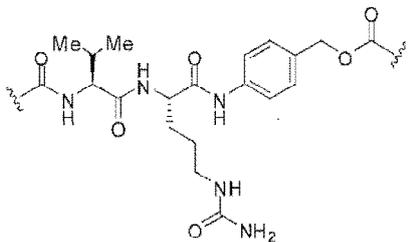
20

L, L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, alquileo, alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo) O)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-, alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo', -J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n-alquileo-J'-, -W-, alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, y J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-; -J-alquileo-NMe-alquileo'-NMe-alquileo'-W- y alquileo-J-alquileo'-NMe-alquileo'-NMe-alquileo'-W-;

25

W tiene la estructura de:

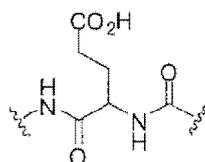
30



35

U tiene la estructura de:

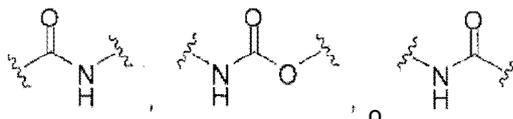
40



45

cada J y J' independientemente tienen la estructura de:

50



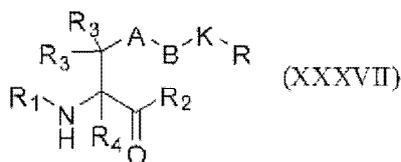
55

o L está ausente, Y es metilo, R₅ es COR₈ y R_g es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂; y cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno;

60

en donde Formula (XXXVII) corresponde a:

65

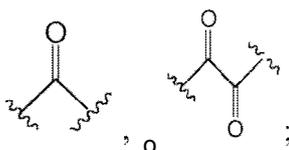


10 en donde:

15 A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

20 B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k (alquileno o sustituido alquileno)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

25 K es



35 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo aCD70,

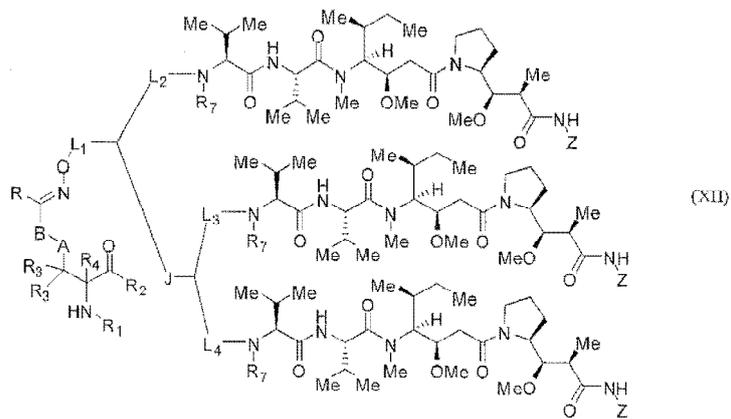
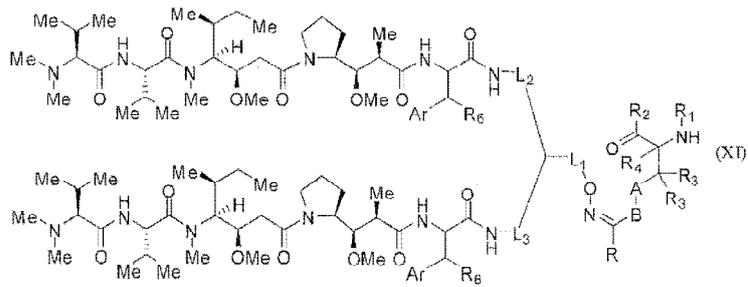
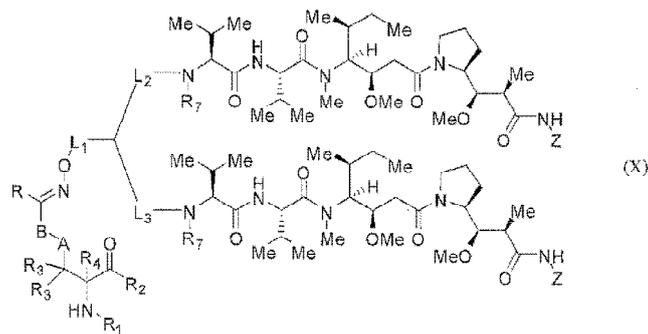
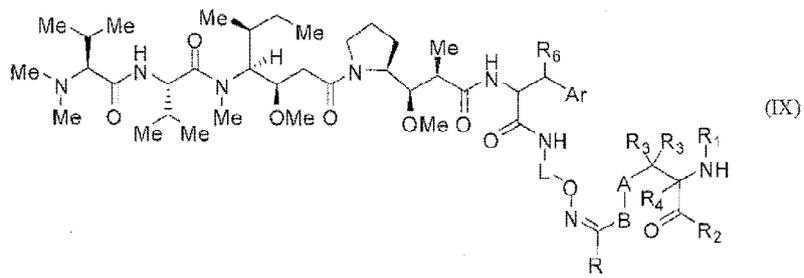
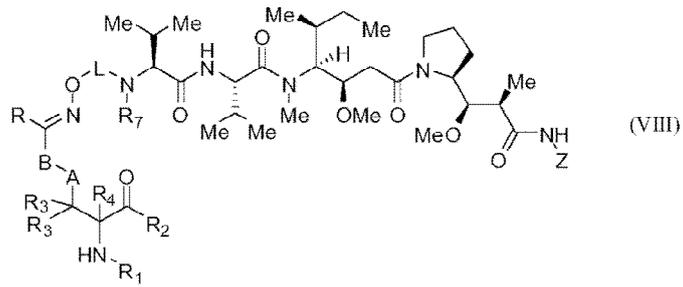
en donde el anticuerpo aCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

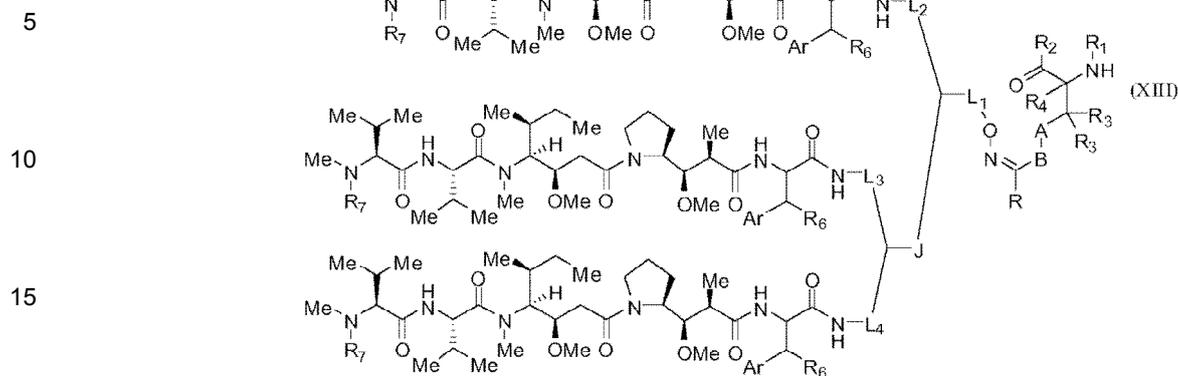
40 en donde el anticuerpo aCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo aCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; y

45 R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo.

[0025] En algunas realizaciones, el análogo de dolastatina derivatizado comprende al menos un aminoácido que contiene oxima que tiene la estructura de Fórmula (VIII), (IX), (X), (XI), (XII) o (XIII):





En realizaciones específicas, el análogo de dolastatina se pone en contacto con el reactivo de Fórmula (XXXVII) en solución acuosa en condiciones ligeramente ácidas.

25 **[0026]** En ciertas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los compuestos descritos y un vehículo, excipiente o aglutinante farmacéuticamente aceptable.

30 **[0027]** En realizaciones adicionales o alternativas se encuentran métodos para detectar la presencia de un polipéptido en un paciente, el método que comprende administrar un polipéptido que comprende al menos un aminoácido no natural que contiene heterociclo y el polipéptido de aminoácido no natural que contiene heterociclo resultante modula la inmunogenicidad del polipéptido en relación con el polipéptido de aminoácido de origen natural homólogo.

35 **[0028]** Debe entenderse que los métodos y composiciones descritas en este documento no se limitan a la metodología, protocolos, líneas celulares, construcciones y reactivos particulares descritos en este documento y, como tales, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de los métodos y composiciones descritas en este documento, que estarán limitados solo por las reivindicaciones adjuntas.

40 **[0029]** Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

45 **[0030]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenecen las invenciones descritas en el presente documento. Aunque cualquier método, dispositivo y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o en el ensayo de las invenciones aquí descritas, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

50 **[0031]** Las expresiones "enlace basado en aldol" o "enlace basado en aldol mixto" se refieren a la condensación catalizada por ácido o base de un compuesto carbonilo con el enolato/enol de otro compuesto carbonilo, que puede o no ser lo mismo, para generar un compuesto β-hidroxicarbonilo-un aldol.

55 **[0032]** El término "etiqueta de afinidad", como se usa en este documento, se refiere a una etiqueta que se une de forma reversible o irreversible a otra molécula, ya sea para modificarla, destruirla o formar un compuesto con ella. A modo de ejemplo, las etiquetas de afinidad incluyen enzimas y sus sustratos, o anticuerpos y sus antígenos.

60 **[0033]** Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional, y se refieren a aquellos grupos alquilo unidos a moléculas a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

65 **[0034]** El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otra molécula, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical de hidrocarburo cíclico o de cadena lineal o ramificada, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono o poliinsaturado y puede incluir radicales di y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designados (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-Butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexilo)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e

isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butenilo y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también pretende incluir aquellos derivados de alquilo definidos con más detalle en el presente documento, tales como "heteroalquilo", "haloalquilo" y "homoalquilo".

[0035] El término "alquilenos" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ejemplifica, por $(-CH_2-)_n$, en donde n puede ser de 1 a aproximadamente 24. Solo a modo de ejemplo, tales grupos incluyen, pero no se limitan a, grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono tales como las estructuras $-CH_2CH_2-$ y $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$. Un "alquilo inferior" o "alquilenos inferior" es un grupo alquilo o alquilenos de cadena más corta, que generalmente tiene ocho o menos átomos de carbono.

[0036] El término "alquilenos", a menos que se indique lo contrario, también pretende incluir aquellos grupos descritos en el presente documento como "heteroalquilenos". El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados naturalmente son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y prolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, solo a modo de ejemplo, un α -carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (a modo de ejemplo, norleucina) o pueden tener esqueletos peptídicos modificados mientras aún conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los ejemplos no limitantes de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, sulfonio de metilo de metionina.

[0037] Se puede hacer referencia a los aminoácidos en el presente documento ya sea por su nombre, sus símbolos de tres letras conocidos comúnmente o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Además, los nucleótidos pueden ser referidos por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

[0038] Un "grupo de modificación del término amino" se refiere a cualquier molécula que puede unirse a un grupo amino terminal. A modo de ejemplo, dichos grupos amino terminales pueden estar en el extremo de las moléculas poliméricas, en donde tales moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos. Los grupos de modificación del término incluyen, pero no se limitan a, diversos polímeros, péptidos o proteínas solubles en agua. Solo a modo de ejemplo, los grupos de modificación terminal incluyen polietilenglicol o albúmina sérica. Los grupos de modificación terminal se pueden usar para modificar las características terapéuticas de la molécula polimérica, que incluyen, entre otros, el aumento de la vida media en suero de los péptidos.

[0039] Por "anticuerpo" en el presente documento se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por la totalidad o parte de los genes del anticuerpo. Los genes de inmunoglobulina incluyen, pero no se limitan a, los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), delta, épsilon y mu, así como los innumerables genes de la región variable de inmunoglobulina. El anticuerpo en este documento pretende incluir anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos, e incluye anticuerpos que existen naturalmente en cualquier organismo o están diseñados (por ejemplo, son variantes).

[0040] El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos intactos, anticuerpos monoclonales o policlonales. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos humanos generalmente están formados por dos cadenas ligeras y dos pesadas que comprenden regiones variables y regiones constantes. La región variable de la cadena ligera comprende 3 CDR, identificadas aquí como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 flanqueadas por regiones marco. La región variable de la cadena pesada comprende 3 CDR, identificadas aquí como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 flanqueadas por regiones marco.

[0041] Los anticuerpos anti-CD70 conocidos en la técnica son adecuados para uso con esta invención. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos incluyen los anticuerpos monoclonales 2H5, 10B4, 8B5, 18E7, 69A7, 69A7Y y 1F4, y las secuencias de aminoácidos se dan en la solicitud de patente publicada de EE.UU. 20100150950. Las secuencias de aminoácidos VH de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7, 69A7, 69A7Y y 1F4 se muestran en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 73 y 6, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos VL de 2H5, 10B4, 8B5, 18E7, 69A7, 69A7Y y 1F4 se muestran en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 11 y 12, respectivamente, de la solicitud de patente publicada de EE.UU. 20100150950 (con 69A7 y 69A7Y que tienen la secuencia de aminoácidos VL de la SEQ ID NO: 11). Cualquier secuencia de cadena pesada conocida puede combinarse con secuencias de cadena ligera y en algunas realizaciones de la presente invención hay un aminoácido no codificado de forma natural en la región constante de los anticuerpos. En algunas realizaciones de la presente invención, hay dos o más aminoácidos no codificados de forma natural en la región constante de los anticuerpos. Por consiguiente, en un aspecto, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o parte de unión a antígeno del mismo que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 73; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 y 12; y

5 (c) un aminoácido no codificado de forma natural; en el que el anticuerpo se une específicamente a CD70.

[0042] Los anticuerpos anti-CD70 (aCD70) conocidos en la técnica son adecuados para su uso en la presente invención. Por ejemplo, las secuencias para el anticuerpo 2H5 se dan en la patente de EE.UU. 8.124.738.

10 **[0043]** El término "fragmento de unión a antígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo incluye (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR), por ejemplo, V_H CDR3 que comprende o no una secuencia adicional (enlazador, región(es) marco etc.) y (v) una combinación de dos a seis CDR aisladas que comprenden o no una secuencia adicional (enlazador, región(s) marco, etc.). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permita fabricarse como una sola cadena polipeptídica en la que V_L y V_H se unen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); ver, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl Acad Sci. EE.UU. 85: 5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena única estén abarcados dentro del término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (como una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera o una región variable de cadena pesada fusionada a una región variable de cadena ligera a través de un péptido enlazador) que se fusiona a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH_2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH_3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH_2 . La región bisagra puede modificarse reemplazando uno o más residuos de cisteína con residuos de serina para evitar la dimerización. Dichas proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se examinan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

40 **[0044]** Un sitio de unión a antígeno típico comprende las regiones variables formadas por el emparejamiento de una inmunoglobulina de cadena ligera y una inmunoglobulina de cadena pesada. La estructura de las regiones variables del anticuerpo es muy consistente y exhibe estructuras muy similares. Estas regiones variables están compuestas típicamente por regiones marco relativamente homólogas (FR) interpuestas con tres regiones hipervariables denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). La actividad de unión global del fragmento de unión a antígeno a menudo está dictada por la secuencia de las CDR. Los FR a menudo desempeñan un papel en el posicionamiento y la alineación adecuados en tres dimensiones de las CDR para la unión óptima del antígeno.

45 **[0045]** De hecho, debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que muestran las propiedades de los anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (ver, por ejemplo, Riechmann, L. et al., 1998, Nature 332: 323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321: 522-525; y Queen, C, et al., 1989, Proc. Natl. Acad. See. EE.UU. 86: 10029-10033). Dichas secuencias marco se pueden obtener a partir de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de líneas germinales diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por la unión de V(D)J durante la maduración de células B. Las secuencias de genes de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad que contiene mutaciones en todo el gen variable, pero generalmente se agrupan en las CDR. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la porción amino terminal de la región estructural 1 y en la porción carboxi terminal de la región estructural 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia completa de ADN de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original. La secuencia parcial de las cadenas pesada y ligera que abarca las regiones CDR suele ser suficiente para este propósito. La secuencia parcial se usa para determinar qué variable de la línea germinal y qué segmentos de genes de unión contribuyeron a los genes de la variable del anticuerpo recombinado. La secuencia de la línea germinal se usa para completar las partes faltantes de las regiones variables. Las secuencias líder de las cadenas pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para agregar secuencias

faltantes, las secuencias de ADNc clonadas se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable completa se puede sintetizar para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas, como la eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

[0046] Por supuesto, la totalidad o las porciones de la región marco del anticuerpo descrito en el presente documento se pueden usar junto con las CDR para optimizar la afinidad, especificidad o cualquier otra propiedad deseada del anticuerpo. Por "anticuerpo" en el presente documento se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por la totalidad o parte de los genes del anticuerpo. Los genes de inmunoglobulina incluyen, pero no se limitan a, los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), delta, épsilon y mu, así como los innumerables genes de la región variable de inmunoglobulina. El anticuerpo en este documento pretende incluir anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos, e incluye anticuerpos que existen naturalmente en cualquier organismo o están diseñados (por ejemplo, son variantes).

[0047] Por "fragmento de anticuerpo" se entiende cualquier forma de un anticuerpo que no sea la forma de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpos en este documento incluyen anticuerpos que son componentes más pequeños que existen dentro de los anticuerpos de longitud completa, y los anticuerpos que se han diseñado. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, entre otros, Fv, Fc, Fab y (Fab')₂, Fv de cadena simple (scFv), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos híbridos bifuncionales, CDR1, CDR2, CDR3, combinaciones de CDR, regiones variables, regiones marco, regiones constantes, cadenas pesadas, cadenas ligeras y regiones variables, y moléculas de andamiaje alternativas sin anticuerpos, y anticuerpos biespecíficos (Maynard y Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2: 339-76; Hudson, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9: 395-402). Otra subestructura funcional es una Fv de una sola cadena (scFv), que comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, conectadas covalentemente por un conector peptídico (Sz Hu et al., 1996, Cancer Research, 56, 3055-3061). Estas proteínas pequeñas (Mr 25.000) generalmente retienen la especificidad y afinidad por el antígeno en un solo polipéptido y pueden proporcionar un bloque de construcción conveniente para moléculas más grandes, específicas de antígeno. A menos que se indique específicamente lo contrario, las declaraciones y afirmaciones que usan el término "anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen específicamente "fragmento de anticuerpo" y "fragmentos de anticuerpo".

[0048] Por "conjugado de anticuerpo-fármaco", o "ADC", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de anticuerpo, o fragmento de la misma, que está unida covalentemente a una o más moléculas biológicamente activas. La molécula biológicamente activa puede ser conjugada al anticuerpo a través de un enlazador, polímero u otro enlace covalente.

[0049] El término "aromático" o "arilo", como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura de anillo cerrado que tiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones pi conjugado e incluye grupos de arilo carbocíclico y arilo heterocíclico (o "heteroarilo" o "heteroaromáticos"). El grupo aromático carbocíclico o heterocíclico puede contener de 5 a 20 átomos en el anillo. El término incluye anillos monocíclicos unidos covalentemente o anillos policíclicos fusionados (es decir, anillos que comparten pares adyacentes de átomos de carbono). Un grupo aromático puede estar sin sustituir o sustituido. Los ejemplos no limitantes de grupos "aromáticos" o "arilo" incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, antraceno y fenantraceno. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos en el presente documento.

[0050] Para mayor brevedad, el término "aromático" o "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (incluidos, entre otros, ariloxi, ariltioxi, aralquilo) incluye anillos arilo y heteroarilo como se definió anteriormente. Por lo tanto, el término "aralquilo" o "alcarilo" pretende incluir aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (incluidos, entre otros, bencilo, fenetilo y piridilmetilo), incluidos los grupos alquilo en los que un átomo de carbono (incluyendo pero no limitado a, un grupo metileno) ha sido reemplazado por un heteroátomo, solo a modo de ejemplo, por un átomo de oxígeno. Los ejemplos de tales grupos arilo incluyen, pero no se limitan a, fenoximetilo, 2-piridilximetilo y 3-(1-naftiloxi)propilo.

[0051] El término "arileno", como se usa en el presente documento, se refiere a un radical arilo divalente. Los ejemplos no limitantes de "arileno" incluyen fenileno, piridinileno, pirimidinileno y tiofenileno. Los sustituyentes para grupos arileno se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos en el presente documento.

[0052] Un "polímero bifuncional", también denominado "enlazador bifuncional", se refiere a un polímero que comprende dos grupos funcionales que son capaces de reaccionar específicamente con otros restos para formar enlaces covalentes o no covalentes. Dichos restos pueden incluir, pero no se limitan a, los grupos laterales en aminoácidos naturales o no naturales o péptidos que contienen tales aminoácidos naturales o no naturales. Los otros restos que pueden estar enlazados al enlazador bifuncional o polímero bifuncional pueden ser restos iguales o diferentes. Solo a modo de ejemplo, un enlazador bifuncional puede tener un grupo funcional reactivo con un grupo en un primer péptido, y otro grupo funcional que es reactivo con un grupo en un segundo péptido, formando un conjugado que incluye el primer péptido, el bifuncional enlazador y el segundo péptido. Se conocen muchos

procedimientos y moléculas enlazadoras para la unión de diversos compuestos a péptidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea N° 188.256; las patentes de EE.UU. N° 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; y 4.569.789. Un "polímero multifuncional", también denominado "enlazador multifuncional", se refiere a un polímero que comprende dos o más grupos funcionales que son capaces de reaccionar con otros restos. Tales fracciones pueden incluir, pero

no se limitan a los grupos laterales en aminoácidos naturales o no naturales o péptidos que contienen tales aminoácidos naturales o no naturales (incluyendo pero no limitado a, grupos laterales de aminoácidos) para formar enlaces covalentes o no covalentes. Un polímero bifuncional o un polímero multifuncional puede tener cualquier longitud o peso molecular deseados, y puede seleccionarse para proporcionar una separación o conformación deseada particular entre una o más moléculas unidas a un compuesto y las moléculas a las que se une o al compuesto.

[0053] El término "biodisponibilidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad y el grado en que una sustancia o su resto activo se libera de una forma de dosificación farmacéutica y está disponible en el sitio de acción o en la circulación general. El aumento de la biodisponibilidad se refiere al aumento de la velocidad y el grado en que una sustancia o su resto activo se administra desde una forma de dosificación farmacéutica y está disponible en el sitio de acción o en la circulación general. A modo de ejemplo, un aumento en la biodisponibilidad se puede indicar como un aumento en la concentración de la sustancia o su resto activo en la sangre cuando se compara con otras sustancias o restos activos. Un ejemplo no limitativo de un método para evaluar los incrementos en la biodisponibilidad se da en los ejemplos 21-25. Este método se puede utilizar para evaluar la biodisponibilidad de cualquier polipéptido.

[0054] El término "molécula biológicamente activa", "grupo biológicamente activo" o "agente biológicamente activo" cuando se usa aquí significa cualquier sustancia que pueda afectar a cualquier propiedad física o bioquímica de un sistema biológico, vía, molécula o interacción relacionada con un organismo, incluidos, entre otros, virus, bacterias, bacteriófagos, transposones, priones, insectos, hongos, plantas, animales y seres humanos. En particular, como se usa en este documento, las moléculas biológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, cualquier sustancia destinada para el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en humanos u otros animales, o para mejorar el bienestar físico o mental de los humanos o animales. Los ejemplos de moléculas biológicamente activas incluyen, entre otros, péptidos, proteínas, enzimas, fármacos de moléculas pequeñas, fármacos duros, fármacos blandos, profármacos, hidratos de carbono, átomos o moléculas inorgánicos, colorantes, lípidos, nucleósidos, radionúclidos, oligonucleótidos, toxinas, células, virus, liposomas, micropartículas y micelas. Las clases de agentes biológicamente activos que son adecuados para su uso con los métodos y composiciones descritas en este documento incluyen, entre otros, medicamentos, profármacos, radionúclidos, agentes de imagen, polímeros, antibióticos, fungicidas, agentes antivirales, agentes antiinflamatorios, agentes antitumorales, agentes cardiovasculares, agentes contra la ansiedad, hormonas, factores de crecimiento, agentes esteroideos y toxinas derivadas de los microbios.

[0055] Por "actividad biológica moduladora" se entiende aumentar o disminuir la reactividad de un polipéptido, alterar la selectividad del polipéptido, aumentar o disminuir la selectividad del sustrato del polipéptido. El análisis de la actividad biológica modificada se puede realizar comparando la actividad biológica del polipéptido no natural con la del polipéptido natural.

[0056] El término "biomaterial", como se usa en el presente documento, se refiere a un material derivado biológicamente, que incluye, entre otros, material obtenido de biorreactores y/o métodos y técnicas recombinantes.

[0057] El término "sonda biofísica", como se usa en el presente documento, se refiere a las sondas que pueden detectar o monitorear cambios estructurales en las moléculas. Dichas moléculas incluyen, pero no se limitan a, proteínas y la "sonda biofísica" se puede usar para detectar o monitorear la interacción de proteínas con otras macromoléculas. Los ejemplos de sondas biofísicas incluyen, pero no se limitan a, marcadores de espín, fluoróforos y grupos fotoactivables.

[0058] El término "biosintéticamente", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier método que utiliza un sistema de traducción (celular o no celular), incluido el uso de al menos uno de los siguientes componentes: un polinucleótido, un codón, un ARNt y un ribosoma. A modo de ejemplo, los aminoácidos no naturales pueden ser "incorporados biosintéticamente" en polipéptidos de aminoácidos no naturales utilizando los métodos y técnicas descritos aquí, "Generación de polipéptidos *in vivo* que comprenden aminoácidos no naturales", y en ejemplo no limitativo 20. Además, los métodos para la selección de aminoácidos no naturales útiles que pueden ser "incorporados biosintéticamente" en polipéptidos de aminoácidos no naturales se describen en los ejemplos no limitativos 20.

[0059] El término "análogo de biotina", o también denominado "imitador de biotina", como se usa en este documento, es cualquier molécula, distinta de la biotina, que se une con alta afinidad a la avidina y/o estreptavidina.

[0060] El término "carbonilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que contiene un resto que selecciona del grupo que consiste en -C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂- y -C(S)-, incluidos, entre otros, grupos que

contienen al menos un grupo cetona y/o al menos un grupo aldehído, y/o al menos un grupo éster, y/o al menos un grupo ácido carboxílico, y/o al menos un grupo tioéster. Tales grupos carbonilo incluyen cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, ésteres y tioésteres. Además, dichos grupos pueden ser parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas.

5
[0061] El término "grupo de modificación del extremo carboxi" se refiere a cualquier molécula que puede unirse a un grupo carboxi terminal. A modo de ejemplo, dichos grupos carboxi terminales pueden estar en el extremo de las moléculas poliméricas, en donde dichas moléculas poliméricas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos y polisacáridos. Los grupos de modificación del término incluyen, pero no se limitan a, diversos polímeros, péptidos o proteínas solubles en agua. Solo a modo de ejemplo, los grupos de modificación terminal incluyen polietilenglicol o albúmina sérica. Los grupos de modificación terminal se pueden usar para modificar las características terapéuticas de la molécula polimérica, incluyendo, entre otros, aumentar la vida media en suero de los péptidos.

15
[0062] El término "grupo químicamente escindible", también denominado "químicamente lábil", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que se rompe o escinde tras la exposición a ácido, base, agentes oxidantes, agentes reductores, iniciadores químicos o iniciadores radicales.

20
[0063] El término "grupo quimioluminiscente", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que emite luz como resultado de una reacción química sin la adición de calor. Solo a modo de ejemplo, el luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinona) reacciona con oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de una base y un catalizador metálico para producir un producto en estado excitado (3-aminofalato, 3-APA).

25
[0064] El término "cromóforo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que absorbe luz de longitudes de onda visibles, longitudes de onda UV o longitudes de onda IR.

30
[0065] El término "cofactor", como se usa en el presente documento, se refiere a un átomo o molécula esencial para la acción de una molécula grande. Los cofactores incluyen, pero no se limitan a, iones inorgánicos, coenzimas, proteínas o algún otro factor necesario para la actividad de las enzimas. Los ejemplos incluyen hemo en hemoglobina, magnesio en clorofila e iones metálicos para proteínas.

35
[0066] "Coplegamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a procesos de replegamiento, reacciones o métodos que emplean al menos dos moléculas que interactúan entre sí y dan como resultado la transformación de moléculas desplegadas o plegadas incorrectamente en moléculas adecuadamente plegadas, por medio de solo el ejemplo, "coplegamiento", emplea al menos dos polipéptidos que interactúan entre sí y dan como resultado la transformación de polipéptidos desplegados o plegados incorrectamente en polipéptidos nativos, correctamente plegados. Dichos polipéptidos pueden contener aminoácidos naturales y/o al menos un aminoácido no natural.

40
[0067] Una "ventana de comparación", como se usa en este documento, se refiere a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas usadas para comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están alineadas de manera óptima. Dichas posiciones contiguas incluyen, pero no se limitan a un grupo que consta de aproximadamente 20 a aproximadamente 600 unidades secuenciales, incluidas aproximadamente 50 a aproximadamente 200 unidades secuenciales, y aproximadamente 100 a aproximadamente 150 unidades secuenciales. A modo de ejemplo, tales secuencias incluyen polipéptidos y polipéptidos que contienen aminoácidos no naturales, con las unidades secuenciales incluyen, pero no se limitan a aminoácidos naturales y no naturales. Además, solo a modo de ejemplo, tales secuencias incluyen polinucleótidos con nucleótidos que son las unidades secuenciales correspondientes. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar, entre otras, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482c, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineación manual e inspección visual (ver, por ejemplo, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (suplemento de 1995)).

55
[0068] A modo de ejemplo, un algoritmo que se puede usar para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res, 25: 3389-3402, y Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente, el software para realizar análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) o 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valor predeterminado una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10915) alineaciones (b) de 50, expectativa (e) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo

BLAST se realiza normalmente con el filtro de "baja complejidad" desactivado.

[0069] El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5873-5787), una medida de similitud proporcionada por El algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, o menor que aproximadamente 0,01, o menor que aproximadamente 0,001.

[0070] El término "variantes modificadas de manera conservativa" se aplica a aminoácidos tanto naturales como no naturales y a secuencias de ácidos nucleicos naturales y no naturales, y combinaciones de las mismas. Con respecto a las secuencias de ácido nucleico particulares, "variantes modificadas de manera conservativa" se refiere a aquellos ácidos nucleicos naturales y no naturales que codifican secuencias de aminoácidos naturales y no naturales idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico natural y no natural no codifica una secuencia de aminoácidos natural y no natural, a secuencias esencialmente idénticas. A modo de ejemplo, debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Así, a modo de ejemplo, cada secuencia de ácido nucleico natural o no natural en el presente documento que codifica un polipéptido natural o no natural también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico natural o no natural. Un experto en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico natural o no natural (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico natural y no natural que codifica un polipéptido natural y no natural está implícita en cada secuencia descrita.

[0071] En cuanto a las secuencias de aminoácidos, sustituciones individuales, deleciones o adiciones a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteína que altera, agrega o elimina un solo aminoácido natural y no natural o un pequeño porcentaje de y los aminoácidos no naturales en la secuencia codificada son una "variante modificada conservativamente" en la que la alteración produce la eliminación de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido natural y no natural por aminoácidos químicos similares. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos naturales funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de manera conservativa son además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de los métodos y composiciones descritas en este documento.

[0072] Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son conocidas por los expertos en la técnica. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W);
- 7) Serina(s), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(ver, por ejemplo, Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (WH Freeman & Co.; 2ª edición (diciembre de 1993).

[0073] Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, las versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Por lo tanto, un cicloalquilo o heterocicloalquilo incluyen enlaces anulares saturados, parcialmente insaturados y completamente insaturados. Además, para heterocicloalquilo, un heteratoma puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. El heteroátomo puede incluir, pero no se limita a, oxígeno, nitrógeno o azufre. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, y cicloheptilo. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofurano-2-ilo, tetrahidrofurano-3-ilo, tetrahidrotieno-2-ilo, tetrahidrotieno-3-ilo, 1-piperazinilo y 2-piperazinilo. Adicionalmente, el término abarca estructuras multicíclicas, que incluyen, entre otras, estructuras de anillos bicíclicos y tricíclicos. De manera similar, el término "heterocicloalquilenilo" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical

divalente derivado de heterocicloalquilo, y el término "cicloalquileno" por sí mismo o como parte de otra molécula significa un radical divalente derivado de cicloalquilo.

[0074] El término "ciclodextrina", como se usa en el presente documento, se refiere a carbohidratos cíclicos que consisten en al menos seis a ocho moléculas de glucosa en una formación de anillo. La parte exterior del anillo contiene grupos solubles en agua; en el centro del anillo hay una cavidad relativamente no polar capaz de acomodar moléculas pequeñas.

[0075] El término "citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que daña las células.

[0076] "Agente desnaturalizante" o "desnaturalizante", como se usa en este documento, se refiere a cualquier compuesto o material que causará un despliegue reversible de un polímero. Solo a modo de ejemplo, el "agente desnaturalizante" o "desnaturalizantes" puede causar un despliegue reversible de una proteína. La fuerza de un agente desnaturalizante o desnaturalizante se determinará tanto por las propiedades como por la concentración del agente desnaturalizante particular o desnaturalizante. A modo de ejemplo, los agentes desnaturalizantes o desnaturalizantes incluyen, pero no se limitan a, caótopos, detergentes, disolventes orgánicos, miscibles con agua, fosfolípidos, o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de caótopos incluyen, entre otros, urea, guanidina y tiocianato de sodio. Los ejemplos no limitantes de detergentes pueden incluir, entre otros, detergentes fuertes como el dodecilo sulfato de sodio o los éteres de polioxietileno (por ejemplo, detergentes Tween o Triton), Sarkosyl, detergentes suaves no iónicos (por ejemplo, digitonina), detergentes catiónicos suaves.

tales como N-> 2,3-(Dioleoyxi)-propilo-N,N,N-trimetilamonio, detergentes iónicos suaves (por ejemplo, colato de sodio o desoxicolato de sodio) o detergentes bipolares, que incluyen, entre otros, sulfobetaínas (Zwittergent), 3-(3-cloridopropilo)dimetilamonio-1-propano sulfato (CHAPS), y 3-(3-cloridopropilo)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propano sulfonato (CHAPSO). Los ejemplos no limitantes de disolventes orgánicos miscibles con agua incluyen, entre otros, acetonitrilo, alcoholes inferiores (especialmente alcoholes C2 - C4 como etanol o isopropanol), o alcandioles inferiores (alcandioles C2 - C4 como etilenglicol) pueden utilizarse como desnaturalizantes. Los ejemplos no limitantes de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos naturales, tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol o derivados de fosfolípidos sintéticos o variantes tales como dihexanoilfosfatidilcolina o diheptanoilfosfatidilcolina.

[0077] El término "funcionalidad deseada", como se usa en este documento, se refiere a cualquier grupo seleccionado de una etiqueta; un tinte, un polímero, un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; un reticulador fotográfico; un compuesto citotóxico; una droga; una etiqueta de afinidad; una etiqueta de fotoafinidad; un compuesto reactivo; una resina; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; un quelante de metal; un cofactor; un ácido graso; un carbohidrato; un polinucleótido; un ADN; un ARN; un polinucleótido antisentido; un sacárido, un dendrímero soluble en agua, una ciclodextrina, un biomaterial; una nanopartícula; una etiqueta de giro; un fluoróforo; un resto que contiene metal; una fracción radiactiva; un nuevo grupo funcional; un grupo que interactúa covalente o no covalentemente con otras moléculas; un resto fotocurado; una fracción excitable de radiación actínica; un ligando un resto fotoisomerizable; biotina un análogo de biotina; un resto que incorpora un átomo pesado; un grupo químicamente escindible; un grupo fotoescapable; una cadena lateral alargada; un azúcar ligado al carbono; un agente redox activo; un amino tioácido; un resto tóxico; un resto isotópicamente marcado; una sonda biofísica; un grupo fosforescente; un grupo quimioluminiscente; un grupo denso de electrones; un grupo magnético; un grupo intercalante; un cromóforo un agente de transferencia de energía; un agente biológicamente activo (en cuyo caso, el agente biológicamente activo puede incluir un agente con actividad terapéutica y el polipéptido de aminoácido no natural o aminoácido no natural modificado puede servir como agente co-terapéutico con el agente terapéutico adjunto o como un medio para administrar el agente terapéutico a un sitio deseado dentro de un organismo); una etiqueta detectable; una pequeña molécula; un inhibidor de ácido ribonucleico; un radionucleótido; un agente de captura de neutrones; un derivado de la biotina; puntos cuánticos); un nanotransmisor; un radiotransmisor, un abzima, un activador complejo activado, un virus, un adyuvante, un aglicano, un alergano, un angiostatina, un antihormona, un antioxidante, un aptámero, un ARN guía, una saponina, un vector lanzadera, una macromolécula, un mimotopo, un receptor, una micela inversa, y cualquier combinación de los mismos.

[0078] El término "diamina", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos/moléculas que comprenden al menos dos grupos funcionales amina, que incluyen, entre otros, un grupo hidrazina, un grupo amidina, un grupo imina, un grupo 1,1-diamina, un grupo 1,2-diamina, un grupo 1,3-diamina y un grupo 1,4-diamina. Además, dichos grupos pueden ser parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas.

[0079] El término "etiqueta detectable", como se usa en el presente documento, se refiere a una etiqueta que puede observarse utilizando técnicas analíticas que incluyen, entre otras, fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de espín de electrones, espectroscopía de absorbanza ultravioleta/visible, espectrometría de masas, resonancia nuclear magnética, resonancia magnética y métodos electroquímicos.

[0080] El término "dicarbonilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que contiene al menos dos restos seleccionados del grupo que consiste en -C(O)-, -S(O)-, -S(O)₂-, y C(S)-, incluidos, entre otros, grupos

1,2-dicarbonilo, grupos 1,3-dicarbonilo y grupos 1,4-dicarbonilo, y grupos que contienen al menos un grupo cetona, y/o al menos un grupo aldehído, y/o al menos un grupo éster, y/o al menos un grupo ácido carboxílico, y/o al menos un grupo tioéster. Dichos grupos dicarbonilo incluyen dicetonas, cetoaldehídos, cetoácidos, cetoésteres y cetotioésteres. Además, dichos grupos pueden ser parte de moléculas lineales, ramificadas o cíclicas. Los dos restos en el grupo dicarbonilo pueden ser iguales o diferentes, y pueden incluir sustituyentes que producirían, solo a modo de ejemplo, un éster, una cetona, un aldehído, un tioéster o una amida, en cualquiera de los dos restos.

[0081] El término "fármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia utilizada en la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o cura de una enfermedad o afección.

[0082] El término "colorante", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia colorante soluble que contiene un cromóforo.

[0083] El término "cantidad efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto que se está administrado que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando. El resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. A modo de ejemplo, un agente o un compuesto que se administra incluye, pero no se limita a, un polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado o polipéptido de no aminoácido modificado. Las composiciones que contienen tales polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden administrarse para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos. Una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual puede determinarse utilizando técnicas, como un estudio de aumento de dosis.

[0084] El término "grupo denso de electrones", como se usa en este documento, se refiere a un grupo que dispersa electrones cuando se irradia con un haz de electrones. Dichos grupos incluyen, pero no se limitan a, molibdato de amonio, subnitrito de bismuto yoduro de cadmio, 99%, carbohidracida, hexahidrato de cloruro férrico, hexametilentetramina, 98,5%, tricloruro de indio anhidro, nitrato de lantano, trihidrato de acetato de plomo, trihidrato de citrato de plomo, nitrato de plomo, ácido periódico, ácido fosfomolibdico, ácido fosfotúngstico, ferricianuro de potasio, ferrocianuro de potasio, rojo de rutenio, nitrato de plata, proteinato de plata (ensayo de Ag: 8,0-8,5%) "Fuerte", tetrafenilporfina de plata (S-TPPS), cloroaurato de sodio, tungstato de sodio, nitrato de talio, tiosemicarbazida (TSC), acetato de uranilo, nitrato de uranilo y sulfato de vanadilo.

[0085] El término "agente de transferencia de energía", como se usa en este documento, se refiere a una molécula que puede donar o aceptar energía de otra molécula. Solo a modo de ejemplo, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) es un proceso de acoplamiento dipolo-dipolo mediante el cual la energía del estado excitado de una molécula donante de fluorescencia se transfiere de manera no radiativa a una molécula aceptora no excitada que luego emite fluorescentemente la energía donada a una longitud de onda más larga.

[0086] Los términos "potenciar" o "potenciado" significan aumentar o prolongar, en potencia o duración, un efecto deseado. A modo de ejemplo, "potenciar" el efecto de los agentes terapéuticos se refiere a la capacidad de aumentar o prolongar, ya sea en potencia o en duración, el efecto de los agentes terapéuticos durante el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Una "cantidad de mejora de la eficacia", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad adecuada para mejorar el efecto de un agente terapéutico en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Cuando se utiliza en un paciente, las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los medicamentos, y el criterio del médico tratante.

[0087] Como se usa en el presente documento, el término "eucariota" se refiere a organismos que pertenecen al dominio filogenético Eucarya, que incluyen pero no se limitan a animales (incluidos, entre otros, mamíferos, insectos, reptiles, aves, etc.), ciliados, plantas (incluidos, entre otros, monocots, dicots y algas), hongos, levaduras, flagelados, microsporidios y protistas.

[0088] El término "ácido graso", como se usa en el presente documento, se refiere a ácidos carboxílicos con una cadena lateral de hidrocarburo aproximadamente C6 o más larga.

[0089] El término "fluoróforo", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que, por excitación, emite fotones y, por lo tanto, es fluorescente.

[0090] Los términos "grupo funcional", "grupo activo", "grupo activador", "grupo saliente", "sitio reactivo", "grupo químicamente reactivo" y "grupo químicamente reactivo", como se usan en este documento, se refieren a porciones o unidades de una molécula en la que se producen reacciones químicas. Los términos son en cierto modo sinónimos en las técnicas químicas y se usan en este documento para indicar las porciones de moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas.

[0091] El término "halógeno" incluye flúor, cloro, yodo y bromo.

[0092] El término "haloacilo", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos acilo que contienen restos halógenos, que incluyen, pero no se limitan a, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, y $-C(O)CH_2OCH_3$,

5 **[0093]** El término "haloalquilo", como se usa en este documento, se refiere a grupos alquilo que contienen restos de halógeno, que incluyen, pero no se limitan a, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$,

10 **[0094]** El término "heteroalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a la cadena lineal o ramificada, o radicales hidrocarbonados cíclicos, o combinaciones de los mismos, que consiste en un grupo alquilo y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar oxidados opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El (los) heteroátomo(s) O, N y S y Si pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2$, $-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$, y $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$. Además, hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, como, por ejemplo, $-CH_2-NH-OCH_3$ y $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$,

20 **[0095]** Los términos "enlace basado en heterocíclico" o "enlace heterociclo" se refieren a un resto formado a partir de la reacción de un grupo dicarbonilo con un grupo diamina. El producto de reacción resultante es un heterociclo, que incluye un grupo heteroarilo o un grupo heterocicloalquilo. El grupo heterociclo resultante sirve como un enlace químico entre un aminoácido no natural o un polipéptido de aminoácido no natural y otro grupo funcional. En una realización, el enlace heterociclo incluye un enlace heterociclo que contiene nitrógeno, incluyendo a modo de ejemplo solo un enlace pirazol, un enlace pirrol, un enlace indol, un enlace benzodiazepina y un enlace pirazalona.

25 **[0096]** De manera similar, el término "heteroalquileno" se refiere a un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica, pero no se limita a, $-CH_2-CH_2-S_2-CH_2-$ y $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$. Para los grupos heteroalquileno, los mismos o diferentes heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos de los extremos de la cadena (incluidos, entre otros, alquilenoxi, alquilendioxi, alquilenamino, alquilendiamino y aminoalquileno). Aún más, para los grupos de enlace alquileno y heteroalquileno, ninguna orientación del grupo de enlace está implicada por la dirección en la que está escrita la fórmula del grupo de enlace. A modo de ejemplo, la fórmula $-C(O)_2R^1-$ representa tanto $-C(O)_2R^1-$ como $-R^1C(O)_2-$.

35 **[0097]** El término "heteroarilo" o "heteroaromático", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos arilo que contienen al menos un heteroátomo seleccionado de N, O y S; en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar oxidados opcionalmente, y el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los grupos heteroarilo pueden estar sustituidos o no sustituidos. Un grupo heteroarilo puede unirse al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo incluyen 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenilo-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalino, 5-quinoxalino, 3-quinolilo, y 6-quinolilo.

45 **[0098]** El término "homoalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos alquilo que son grupos hidrocarburo.

50 **[0099]** El término "idéntico", como se usa en el presente documento, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Además, el término "sustancialmente idéntico", como se usa en este documento, se refiere a dos o más secuencias que tienen un porcentaje de unidades secuenciales que son iguales cuando se comparan y alinean para obtener una correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región designada según lo medido usando algoritmos de comparación o por alineación manual e inspección visual. Solo a modo de ejemplo, dos o más secuencias pueden ser "sustancialmente idénticas" si las unidades secuenciales son aproximadamente 60% idénticas, aproximadamente 65% idénticas, aproximadamente 70% idénticas, aproximadamente 75% idénticas, aproximadamente 80% idénticas, aproximadamente 85% idénticas, aproximadamente el 90% idénticas, o aproximadamente 95% idénticas en una región específica. Tales porcentajes para describir el "porcentaje de identidad" de dos o más secuencias. La identidad de una secuencia puede existir sobre una región que tiene al menos aproximadamente 75-100 unidades secuenciales de longitud, sobre una región que tiene aproximadamente 50 unidades secuenciales de longitud, o, cuando no se especifica, en toda la secuencia. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de prueba. Solo a modo de ejemplo, dos o más secuencias polipeptídicas son idénticas cuando los residuos de aminoácidos son iguales, mientras que dos o más secuencias polipeptídicas son "sustancialmente idénticas" si los residuos de aminoácidos son aproximadamente 60% idénticas, aproximadamente 65% idénticas, aproximadamente 70% idénticas, aproximadamente 75% idénticas, aproximadamente 80% idénticas, aproximadamente 85% idénticas, aproximadamente 90% idénticas, o aproximadamente 95% idénticas en una región específica. La identidad puede existir sobre una región que tiene al menos aproximadamente 75 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, sobre una región que tiene aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, o, cuando no se especifica, a través de la secuencia completa de una secuencia polipeptídica, solo a modo

de ejemplo, dos o más secuencias de polinucleótidos son idénticas cuando los residuos de ácido nucleico son iguales, mientras que dos o más secuencias de polinucleótidos son "sustancialmente idénticas" si los residuos de ácido nucleico son aproximadamente el 60% idénticos, aproximadamente el 65% idénticos, aproximadamente el 70% idénticos, aproximadamente el 75% idéntico, aproximadamente el 80% idéntico, aproximadamente el 85% idéntico, aproximadamente el 90% idéntico, o aproximadamente el 95% idéntico en una región específica. La identidad puede existir sobre una región que tiene al menos aproximadamente 75 a aproximadamente 100 ácidos nucleicos de longitud, sobre una región que tiene aproximadamente 50 ácidos nucleicos de longitud, o, cuando no se especifica, a través de la secuencia completa de una secuencia de polinucleótidos.

[0100] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia se ingresan en una computadora, las coordenadas de la subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar los parámetros predeterminados del programa, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencia calcula luego el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa.

[0101] El término "inmunogenicidad", como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta de anticuerpos a la administración de un fármaco terapéutico. La inmunogenicidad frente a polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos puede obtenerse utilizando ensayos cuantitativos y cualitativos para la detección de anticuerpos de polipéptidos de aminoácidos no naturales en fluidos biológicos. Dichos ensayos incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo luminiscente (LIA) e inmunoensayo fluorescente (FIA). El análisis de la inmunogenicidad hacia polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos implica comparar la respuesta de anticuerpos en la administración de polipéptidos de aminoácidos no naturales terapéuticos con la respuesta de anticuerpos en la administración de polipéptidos de aminoácidos naturales terapéuticos.

[0102] El término "agente de intercalación", también denominado "grupo de intercalación", como se usa en el presente documento, se refiere a un producto químico que se puede insertar en el espacio intramolecular de una molécula o el espacio intermolecular entre las moléculas. A modo de ejemplo, solo un agente o grupo intercalador puede ser una molécula que se inserta en las bases apiladas de la doble hélice del ADN.

[0103] El término "aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a separar y eliminar un componente de interés de componentes que no son de interés. Las sustancias aisladas pueden estar en estado seco o semiseco, o en solución, incluyendo pero sin limitarse a una solución acuosa. El componente aislado puede estar en un estado homogéneo o el componente aislado puede ser parte de una composición farmacéutica que comprende vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. La pureza y la homogeneidad se pueden determinar utilizando técnicas de química analítica que incluyen, entre otras, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Además, cuando un componente de interés se aísla y es la especie predominante presente en una preparación, el componente se describe aquí como sustancialmente purificado. El término "purificado", como se usa en este documento, puede referirse a un componente de interés que es al menos un 85% puro, al menos un 90% puro, al menos un 95% puro, al menos un 99% o más puro. Solo a modo de ejemplo, los ácidos nucleicos o proteínas se "aislan" cuando dichos ácidos nucleicos o proteínas están libres de al menos algunos de los componentes celulares con los que está asociado en el estado natural, o cuando el ácido nucleico o la proteína se han concentrado a un nivel mayor que la concentración de su producción *in vivo* o *in vitro*, también, a modo de ejemplo, se aísla un gen cuando se separa de los marcos de lectura abiertos que flanquean el gen y codifican una proteína distinta del gen de interés.

[0104] El término "etiqueta", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que se incorpora a un compuesto y se detecta fácilmente, por lo que su distribución física se puede detectar y/o monitorear.

[0105] El término "enlace", como se usa en este documento para referirse a enlaces o restos químicos formados a partir de una reacción química entre el grupo funcional de un enlazador y otra molécula. Tales enlaces pueden incluir, pero no están limitados a, enlaces covalentes y enlaces no covalentes, mientras que tales restos químicos pueden incluir, pero no están limitados a, ésteres, carbonatos, ésteres de fosfato de iminas, hidrazonas, acetales, ortoésteres, enlaces peptídicos y enlaces oligonucleotídicos. Los enlaces hidrolíticamente estables significan que los enlaces son sustancialmente estables en el agua y no reaccionan con el agua a valores de pH útiles, que incluyen, entre otros, condiciones fisiológicas durante un período prolongado de tiempo, tal vez incluso indefinidamente. Los enlaces hidrolíticamente inestables o degradables significan que los enlaces son degradables en agua o en soluciones acuosas, incluyendo, por ejemplo, sangre. Los enlaces enzimáticamente inestables o degradables significa que el enlace puede ser degradado por una o más enzimas. Solo a modo de ejemplo, PEG y polímeros relacionados pueden incluir enlaces degradables en el esqueleto polimérico o en el grupo enlazador entre el esqueleto polimérico y uno o más de los grupos funcionales terminales de la molécula de polímero. Tales enlaces degradables incluyen, pero no se limitan a, enlaces éster formados por la reacción de ácidos carboxílicos PEG o ácidos carboxílicos PEG activados con grupos alcohol en un agente biológicamente activo, en donde dichos grupos éster generalmente se hidrolizan bajo condiciones fisiológicas para liberar el agente biológicamente activo. Otros

enlaces hidrolíticamente degradables incluyen, entre otros, enlaces carbonato; los enlaces imina resultaron de la reacción de una amina y un aldehído; enlaces éster de fosfato formados por reacción de un alcohol con un grupo fosfato; enlaces hidrazona que son producto de reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces acetal que son el producto de reacción de un aldehído y un alcohol; enlaces ortoéster que son el producto de reacción de un formato y un alcohol; enlaces peptídicos formados por un grupo amina, que incluyen pero no se limitan a, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces oligonucleotídicos formados por un grupo fosforamidita, que incluyen pero no se limitan al final de un polímero, y un grupo hidroxilo 5' de un oligonucleótido.

[0106] Los términos "medio" o "medios", como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier medio de cultivo utilizado para cultivar y recolectar células y/o productos expresados y/o secretados por dichas células. Tales "medio" o "medios" incluyen, pero no se limitan a, soluciones, soportes sólidos, semisólidos o rígidos que pueden soportar o contener cualquier célula huésped, incluidas, a modo de ejemplo, células huésped bacterianas, células huésped de levadura, células huésped de insecto, células huésped de planta, células huésped eucariotas, células huésped de mamífero, células CHO, células huésped procarióticas, *E. coli* o células huésped de *Pseudomonas*, y contenido celular. Dicho "medio" o "medios" incluyen, pero no se limitan al medio o medios en que se ha desarrollado la célula huésped en la que se ha secretado un polipéptido, incluido el medio antes o después de una etapa de proliferación. Dichos "medio" o "medios" también incluyen, pero no se limitan a, tampones o reactivos que contienen lisados de células huésped, a modo de ejemplo, un polipéptido producido intracelularmente y las células huésped se lisan o se rompen para liberar el polipéptido.

[0107] El término "metabolito", como se usa en el presente documento, se refiere a un derivado de un compuesto, a modo de ejemplo, un polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado o un polipéptido no modificado de aminoácido natural, que se forma cuando se metaboliza el compuesto, a modo de ejemplo polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, el polipéptido de aminoácido natural modificado, o el polipéptido de aminoácido no natural modificado. El término "metabolito farmacéuticamente activo" o "metabolito activo" se refiere a un derivado biológicamente activo de un compuesto, a modo de ejemplo, un polipéptido de aminoácido natural, un polipéptido de aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural modificado o un polipéptido de aminoácido no modificado natural, que se forma cuando se metaboliza dicho compuesto, a modo de ejemplo, un polipéptido de aminoácido natural, polipéptido de aminoácido no natural, polipéptido de aminoácido natural modificado o polipéptido de aminoácido natural modificado.

[0108] El término "metabolizado", como se usa en el presente documento, se refiere a la suma de los procesos mediante los cuales un organismo modifica una sustancia en particular. Tales procesos incluyen, pero no se limitan a reacciones de hidrólisis y reacciones catalizadas por enzimas. Puede obtenerse más información sobre el metabolismo en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Edición, McGraw-Hill (1996). Solo a modo de ejemplo, los metabolitos de los polipéptidos de aminoácidos naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden identificarse mediante la administración de los polipéptidos de aminoácidos naturales, no naturales, polipéptidos de aminoácidos, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados a un huésped y análisis de muestras de tejido del huésped, o por incubación de polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, aminoácidos naturales modificados polipéptidos, o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados con células hepáticas *in vitro* y análisis de los compuestos resultantes.

[0109] El término "quelante de metal", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que forma un complejo metálico con iones metálicos. A modo de ejemplo, tales moléculas pueden formar dos o más enlaces de coordinación con un ion metálico central y pueden formar estructuras anulares.

[0110] El término "resto que contiene metal", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que contiene un ion metálico, átomo o partícula. Tales restos incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, iones de metales quelados (tales como níquel, hierro y platino) y nanopartículas metálicas (tales como níquel, hierro y platino).

[0111] El término "resto que incorpora un átomo pesado", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que incorpora un ion de átomo que suele ser más pesado que el carbono. Dichos iones o átomos incluyen, entre otros, silicio, tungsteno, oro, plomo y uranio.

[0112] El término "modificado", como se usa en el presente documento, se refiere a la presencia de un cambio en un aminoácido natural, un aminoácido no natural, un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural. Dichos cambios, o modificaciones, pueden obtenerse mediante modificaciones posteriores a la síntesis de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales, o por co-traducción, o por modificación postraducciona de aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. La forma "modificada o no modificada" significa que el aminoácido natural, el aminoácido no natural, el polipéptido de aminoácido natural o el polipéptido de aminoácido no natural que se están discutiendo están opcionalmente modificados, es decir, el aminoácido natural, aminoácido no natural, el polipéptido de aminoácido natural o el

polipéptido de aminoácido no natural en discusión pueden ser modificados o no modificados,

[0113] Como se usa en este documento, el término "vida media en suero modulada" se refiere a cambios positivos o negativos en la vida media en circulación de una molécula biológicamente activa modificada en relación con su forma no modificada. A modo de ejemplo, la célula biológica modificada las moléculas activas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, la vida media en suero se mide tomando muestras de sangre en varios puntos de tiempo después de la administración de la molécula biológicamente activa o molécula modificada biológicamente activa, y determinando la concentración de esa molécula en cada muestra. La correlación de la concentración sérica con el tiempo permite el cálculo de la vida media sérica. A modo de ejemplo, la vida media en suero modulada puede ser un aumento en la vida media en suero, lo que puede permitir una mejora de los regímenes de dosificación o evitar efectos tóxicos. Tales aumentos en el suero pueden ser al menos aproximadamente dos veces, al menos aproximadamente tres veces, al menos aproximadamente cinco veces, o al menos aproximadamente diez veces. Los métodos para evaluar la vida media en suero son conocidos en la técnica y se pueden usar para evaluar la vida media en suero de anticuerpos y conjugados de fármaco de anticuerpo de la presente invención.

[0114] El término "vida media terapéutica modulada", como se usa en este documento, se refiere a un cambio positivo o negativo en la vida media de la cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula biológicamente activa modificada, en relación con su forma no modificada. A modo de ejemplo, las moléculas biológicamente activas modificadas incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, la vida media terapéutica se mide midiendo las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas de la molécula en diversos puntos de tiempo después de la administración. El aumento de la vida media terapéutica puede permitir un régimen de dosificación beneficioso particular, una dosis total beneficiosa particular, o evita un efecto no deseado. A modo de ejemplo, el aumento de la vida media terapéutica puede resultar de una mayor potencia, un aumento o disminución de la unión de la molécula modificada a su objetivo, un aumento o disminución en otro parámetro o mecanismo de acción de la molécula no modificada, o un aumento de o disminución de la descomposición de las moléculas por enzimas como, por ejemplo, solo proteasas. Los métodos para evaluar la vida media terapéutica son conocidos en la técnica y se pueden usar para evaluar la vida media terapéutica de anticuerpos y conjugados de fármaco de anticuerpos de la presente invención.

[0115] El término "nanopartícula", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula que tiene un tamaño de partícula entre aproximadamente 500 nm a aproximadamente 1 nm.

[0116] El término "casi estequiométrico", como se usa en el presente documento, se refiere a la relación de los moles de compuestos que participan en una reacción química que es de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,5.

[0117] Como se usa en el presente documento, el término "no eucariotas" se refiere a organismos no eucariotas. A modo de ejemplo, un organismo no eucariótico puede pertenecer a las Eubacterias (que incluyen pero no se limitan a *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus* o *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*), dominio filogenético, o la Archaea, que incluye, pero no se limita a, *Metanococcus jannaschii*, *Metanobacterium thermoautotrophicum*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshi* o todas las personas que participan en este artículo.

[0118] Un "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que no es uno de los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina o selenocisteína. Otros términos que se pueden usar de manera sinónima con el término "aminoácido no natural" son "aminoácido no codificado de forma natural", "aminoácido no natural", "aminoácido de origen no natural", versiones de los mismos. El término "aminoácido no natural" incluye, pero no se limita a, aminoácidos que aparecen naturalmente por modificación de un aminoácido codificado naturalmente (incluidos, entre otros, los 20 aminoácidos comunes o pirrolisina y selenocisteína) pero no están incorporados en una cadena polipeptídica en crecimiento por el complejo de traducción. Los ejemplos de aminoácidos naturales que no están codificados naturalmente incluyen, entre otros, N-acetilglucosaminilo-L-serina, N-acetilglucosaminilo-L-treonina y O-fosfotirosina. Además, el término "aminoácido no natural" incluye, pero no se limita a, aminoácidos que no se producen naturalmente y pueden obtenerse sintéticamente o pueden obtenerse por modificación de aminoácidos no naturales.

[0119] El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de cadena sencilla o doble. Solo a modo de ejemplo, tales ácidos nucleicos y polímeros de ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, (i) análogos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales; (ii) análogos de oligonucleótidos que incluyen, pero no se limitan a, ANP (ácido peptidónucleico), análogos de ADN usados en tecnología antisentido (fosforotioatos, fosforoamidatos y similares); (iii) sus variantes modificadas de manera conservativa (incluidas, entre otras, las sustituciones de codones degenerados) y las secuencias complementarias y las secuencias explícitamente indicadas. A modo de ejemplo, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias

en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); y Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)).

5 **[0120]** El término "agente oxidante", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o material que es capaz de eliminar un electrón de un compuesto que está siendo oxidado. A modo de ejemplo, los agentes oxidantes incluyen, pero no se limitan a, glutatión oxidado, cistina, cistamina, ditiotreitól oxidado, eritreitól oxidado y oxígeno. Una amplia variedad de agentes oxidantes son adecuados para uso en los métodos y composiciones descritas en el presente documento.

10 **[0121]** El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un material, que incluye pero no se limita a una sal, vehículo o diluyente, que no anula la actividad o propiedades biológicas del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido,

15 **[0122]** El término "etiqueta de fotoafinidad", como se usa en el presente documento, se refiere a una etiqueta con un grupo que, al exponerse a la luz, forma un enlace con una molécula por la cual la etiqueta tiene una afinidad. Solo a modo de ejemplo, dicho enlace puede ser covalente o no covalente.

20 **[0123]** El término "resto fotocurado", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que, tras la iluminación en ciertas longitudes de onda, se une de forma covalente o no covalente a otros iones o moléculas.

25 **[0124]** El término "grupo fotoescindible", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo que se rompe tras la exposición a la luz.

30 **[0125]** El término "foto-reticulador", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que comprende dos o más grupos funcionales que, al exponerse a la luz, son reactivos y forman un enlace covalente o no covalente con dos o más moléculas monoméricas o poliméricas.

[0126] El término "resto fotoisomerizable", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo en el que tras la iluminación cambia la luz de una forma isomérica a otra.

35 **[0127]** El término "polialquilenglicol", como se usa en el presente documento, se refiere a polioles poliéter poliméricos lineales o ramificados. Tales polialquilenglicoles, que incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol y derivados de los mismos. Otras realizaciones ejemplares se enumeran, por ejemplo, en catálogos de proveedores comerciales, como el catálogo de Shearwater Corporation "Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001). Solo a modo de ejemplo, tales polioles poliéter poliméricos tienen pesos moleculares medios entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa. A modo de ejemplo, tales polioles poliéter poliméricos incluyen, pero no se limitan a, entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da o más. El peso molecular del polímero puede estar entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluyendo pero no limitado a, aproximadamente 100.000 Da, aproximadamente 95.000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 45.000 Da, aproximadamente 40.000 Da, aproximadamente 35.000 Da, aproximadamente 30.000 Da, aproximadamente 25.000 Da, aproximadamente 20.000 Da, aproximadamente 15.000 Da, aproximadamente 10.000 Da, aproximadamente 9.000 Da, aproximadamente 8.000 Da, aproximadamente 7.000 Da, aproximadamente 6.000 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 4.000 Da, aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 2.000 Da, aproximadamente 1.000 Da, aproximadamente 900 Da, aproximadamente 800 Da, aproximadamente 700 Da, aproximadamente 600 Da, aproximadamente 500 Da, 400 Da, aproximadamente 300 Da, aproximadamente 200 Da y aproximadamente 100 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 100 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del polímero está entre aproximadamente 10.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, la molécula de poli(etilenglicol) es un polímero ramificado. El peso molecular del PEG de cadena ramificada puede estar entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 100.000 Da, incluidos, entre otros, aproximadamente 100.000 Da, aproximadamente 95.000 Da, aproximadamente 90.000 Da, aproximadamente 85.000 Da, aproximadamente 80.000 Da, aproximadamente 75.000 Da, aproximadamente 70.000 Da, aproximadamente 65.000 Da, aproximadamente 60.000 Da, aproximadamente 55.000 Da, aproximadamente 50.000 Da, aproximadamente 45.000 Da, aproximadamente 40.000 Da, aproximadamente 35.000 Da, aproximadamente 30.000 Da, aproximadamente 25.000 Da, aproximadamente 20.000 Da, aproximadamente 15.000 Da, aproximadamente 10.000 Da, aproximadamente 9.000 Da, aproximadamente 8.000 Da, aproximadamente 7.000

Da, aproximadamente 6.000 Da, aproximadamente 5.000 Da, aproximadamente 4.000 Da, aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 2.000 Da y aproximadamente 1.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 50.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 1.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 40.000 Da. En algunas realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 5.000 Da y aproximadamente 20.000 Da. En otras realizaciones, el peso molecular del PEG de cadena ramificada está entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 50.000 Da.

5
10 **[0128]** El término "polímero", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula compuesta por subunidades repetidas. Dichas moléculas incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, polinucleótidos o polisacáridos o polialquilenglicoles.

15 **[0129]** Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Es decir, una descripción dirigida a un polipéptido se aplica igualmente a una descripción de un péptido y una descripción de una proteína, y viceversa. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos de origen natural, así como a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son aminoácidos no naturales. Además, tales "polipéptidos", "péptidos" y "proteínas" incluyen cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en donde los
20 residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

[0130] El término "modificado después de la traducción" se refiere a cualquier modificación de un aminoácido natural o no natural que se produce después de que dicho aminoácido se haya incorporado de forma translacional en una cadena polipeptídica. Dichas modificaciones incluyen, entre otras, modificaciones co-traduccionales *in vivo*,
25 modificaciones co-traduccionales *in vitro* (como en un sistema de traducción libre de células), modificaciones postraduccionales *in vivo* y modificaciones postraduccionales *in vitro*.

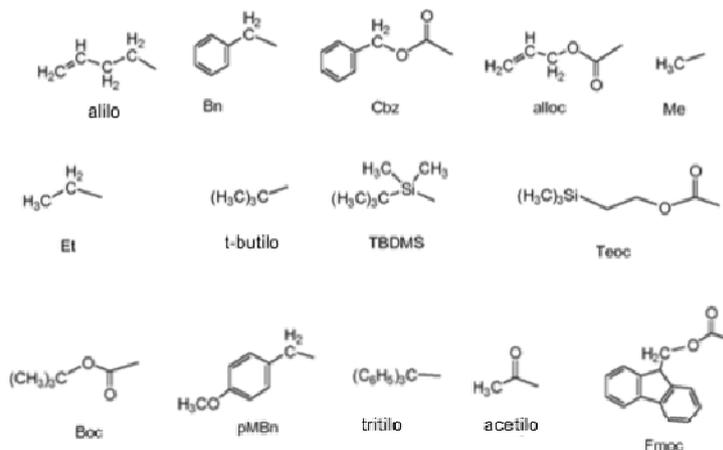
[0131] Los términos "profármaco" o "profármaco farmacéuticamente aceptable", como se usan en este documento, se refieren a un agente que se convierte en el fármaco principal *in vivo* o *in vitro*, en el que no anula la actividad biológica o las propiedades del fármaco original, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de forma perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido. Los profármacos son generalmente precursores de fármacos que, después de la administración a un sujeto y su posterior absorción, se convierten en una especie activa o más activa a través de algún proceso, como la conversión por una ruta metabólica. Algunos profármacos tienen un grupo químico presente en el profármaco que lo hace menos activo y/o confiere solubilidad o alguna otra propiedad al fármaco. Una vez que el grupo químico se ha separado y/o modificado del profármaco, se genera el fármaco activo. Los profármacos se convierten en un fármaco activo dentro del cuerpo a través de reacciones enzimáticas o no enzimáticas. Los profármacos pueden proporcionar propiedades fisicoquímicas mejoradas, como mejor solubilidad, características de administración mejoradas, como dirigirse específicamente a una célula, tejido, órgano o ligando en particular, y valor terapéutico mejorado del medicamento. Los beneficios de tales profármacos incluyen, entre otros, (i) facilidad de administración en comparación con el fármaco original; (ii) el profármaco puede estar biodisponible por administración oral, mientras que el progenitor no lo está; y (iii) el profármaco también puede tener una solubilidad mejorada en composiciones farmacéuticas en comparación con el fármaco original. Un profármaco incluye un derivado farmacológicamente inactivo o de actividad reducida de un fármaco activo. Los profármacos pueden diseñarse para modular la cantidad de un fármaco o molécula biológicamente activa que alcance un sitio de acción deseado mediante la manipulación de las propiedades de un fármaco, como las propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas o farmacocinéticas. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco sería un polipéptido de aminoácido no natural que se administra como un éster (el "profármaco") para facilitar la transmisión a través de una membrana celular donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad pero que luego se hidroliza metabólicamente para el ácido carboxílico, la entidad activa, una vez dentro de la célula donde la solubilidad en agua es beneficiosa. Los profármacos pueden diseñarse como derivados reversibles de medicamentos, para usarlos como modificadores para mejorar el transporte de medicamentos a tejidos específicos del sitio.

55 **[0132]** El término "cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en este documento, se refiere a esa cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácido no natural o al menos un polipéptido de aminoácido no natural modificado aplicado profilácticamente a un paciente que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno que se trata. En tales aplicaciones profilácticas, tales cantidades pueden depender del estado de salud del paciente, peso, y similares. Se considera bien dentro de la experiencia de la técnica que uno determine tales cantidades profilácticamente eficaces mediante experimentación de rutina, que incluye, entre otros, un ensayo clínico de aumento de la dosis.

[0133] El término "protegido", como se usa en el presente documento, se refiere a la presencia de un "grupo protector" o resto que previene la reacción del grupo funcional químicamente reactivo bajo ciertas condiciones de reacción. El grupo protector variará dependiendo del tipo de grupo químicamente reactivo que se esté protegiendo. Solo a modo de ejemplo, (i) si el grupo químicamente reactivo es una amina o una hidrazida, el grupo protector se
65

puede seleccionar entre *tert*-butiloxicarbonilo (*t*-Boc) y 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc); (ii) si el grupo químicamente reactivo es un tiol, el grupo protector puede ser ortopididilsulfuro; y (iii) si el grupo químicamente reactivo es un ácido carboxílico, como el ácido butanoico o propiónico, o un grupo hidroxilo, el grupo protector puede ser bencilo o un grupo alquilo tal como metilo, etilo o *tert*-butilo.

[0134] Solo a modo de ejemplo, los grupos de bloqueo/protección pueden seleccionarse de:



[0135] Adicionalmente, los grupos protectores incluyen, entre otros, grupos fotolabiles como Nvoc y MeNvoc y otros grupos protectores conocidos en la técnica. Otros grupos protectores se describen en Greene y Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3ª edición, John Wiley & Sons, New York, NY, 1999.

[0136] El término "resto radioactivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo cuyos núcleos emiten espontáneamente radiación nuclear, como partículas alfa, beta o gamma; en donde, las partículas alfa son núcleos de helio, las partículas beta son electrones y las partículas gamma son fotones de alta energía.

[0137] El término "compuesto reactivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que, en condiciones apropiadas, es reactivo hacia otro átomo, molécula o compuesto.

[0138] La expresión "célula huésped recombinante", también denominada "célula huésped", se refiere a una célula que incluye un polinucleótido exógeno, en donde los métodos utilizados para insertar el polinucleótido exógeno en una célula incluyen, entre otros, captación directa, transducción, apareamiento de células u otros métodos conocidos en la técnica para crear células huésped recombinantes. Solo a modo de ejemplo, dicho polinucleótido exógeno puede ser un vector no integrado, que incluye pero no se limita a un plásmido, o puede integrarse en el genoma del huésped.

[0139] El término "agente activo redox", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que oxida o reduce otra molécula, por lo que el agente activo redox se reduce u oxida. Los ejemplos de agente activo redox incluyen, pero no se limitan a, ferroceno, quinonas, complejos $Ru^{2+/3+}$, complejos $CO^{2+/3+}$ y complejos $OS^{2+/3+}$.

[0140] El término "agente reductor", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto o material que es capaz de agregar un electrón a un compuesto que se está reduciendo. A modo de ejemplo los agentes reductores incluyen, pero no se limitan a, ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol, ditioeritritol, cisteína, cisteína (2-aminoetanotiol) y glutatión reducido. Dichos agentes reductores pueden usarse, solo a modo de ejemplo, para mantener los grupos sulfhidrilo en el estado reducido y para reducir los enlaces disulfuro intra o intermoleculares.

[0141] El "replegamiento", como se usa en este documento, describe cualquier proceso, reacción o método que transforma un estado plegado o desplegado incorrectamente en una conformación nativa o plegada adecuadamente. Solo a modo de ejemplo, el replegamiento transforma el enlace disulfuro que contiene polipéptidos de un estado plegado o desplegado incorrectamente a una conformación nativa o plegada correctamente con respecto a los enlaces disulfuro. Dichos polipéptidos que contienen enlaces disulfuro pueden ser polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos de aminoácidos no naturales.

[0142] El término "resina", como se usa en el presente documento, se refiere a perlas de polímero insoluble de alto peso molecular. A modo solo de ejemplo, tales perlas pueden usarse como soportes para la síntesis de péptidos en fase sólida, o sitios para la unión de moléculas antes de la purificación.

[0143] El término "sacárido", como se usa en el presente documento, se refiere a una serie de carbohidratos que incluyen, entre otros, azúcares, monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

5 **[0144]** El término "seguridad" o "perfil de seguridad", como se usa en el presente documento, se refiere a los efectos secundarios que podrían estar relacionados con la administración de un fármaco en relación con el número de veces que se ha administrado el fármaco. A modo de ejemplo, se dice que un medicamento que se ha administrado muchas veces y que produce solo efectos secundarios leves o no tiene un excelente perfil de seguridad. En el ejemplo 26 se proporciona un ejemplo no limitativo de un método para evaluar el perfil de seguridad. Este método se puede usar para evaluar el perfil de seguridad de cualquier polipéptido.

10 **[0145]** La frase "hibrida selectivamente a" o "hibrida específicamente a", como se usa en este documento, se refiere a la unión, dúplex o hibridación de una molécula a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja que incluye, pero no se limita a, ADN o ARN celular total o de biblioteca.

15 **[0146]** El término "marca de espín", como se usa en este documento, se refiere a las moléculas que contienen un átomo o un grupo de átomos que exhiben un espín de electrones no apareado (es decir, un grupo paramagnético estable) que puede ser detectado por espectroscopia de resonancia de espín de electrones y puede ser unido a otra molécula. Dichas moléculas de marca giratoria incluyen, pero no se limitan a, radicales de nitrilo y nitroxidos, y pueden ser etiquetas de rotación única o etiquetas de rotación doble.

20 **[0147]** El término "estequiométrico", como se usa en el presente documento, se refiere a la relación de los moles de compuestos que participan en una reacción química que es de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,1.

25 **[0148]** El término "de tipo estequiométrico", como se usa en el presente documento, se refiere a una reacción química que se vuelve estequiométrica o casi estequiométrica ante cambios en las condiciones de reacción o en presencia de aditivos. Tales cambios en las condiciones de reacción incluyen, entre otros, un aumento de la temperatura o un cambio en el pH. Tales aditivos incluyen, pero no se limitan a, acelerantes.

30 **[0149]** La frase "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a la hibridación de secuencias de ADN, ARN, ANP u otros miméticos de ácido nucleico, o combinaciones de los mismos, en condiciones de baja fuerza iónica y alta temperatura. A modo de ejemplo, en condiciones rigurosas, una sonda se hibridará con su subsecuencia diana en una mezcla compleja de ácido nucleico (que incluye, entre otros, ADN o ARN celular total o de biblioteca), pero no se hibrida con otras secuencias en la mezcla compleja. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. A modo de ejemplo, las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, (i) aproximadamente 5-10°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos; (ii) la concentración de sal es de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 1,0 M a aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (incluidas, entre otras, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (incluidas, entre otras, más de 50 nucleótidos); (iii) la adición de agentes desestabilizantes que incluyen, entre otros, formamida, 5X SSC y 1% de SDS, incubando a 65°C, con lavado en 0,2X SSC, y aproximadamente SDS al 0,1% a 65°C durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 120 minutos. Solo a modo de ejemplo, la detección de hibridación selectiva o específica, incluye, pero no se limita a, una señal positiva al menos dos veces en segundo plano. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993).

35 **[0150]** El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal que es objeto de tratamiento, observación o experimento. Solo a modo de ejemplo, un sujeto puede ser, pero no se limita a, un mamífero que incluye, pero no se limita a, un ser humano.

40 **[0151]** El término "sustancialmente purificado", como se usa en el presente documento, se refiere a un componente de interés que puede estar sustancialmente o esencialmente libre de otros componentes que normalmente acompañan o interactúan con el componente de interés antes de la purificación. Solo a modo de ejemplo, un componente de interés puede estar "sustancialmente purificado" cuando la preparación del componente de interés contiene menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2%, o menos de aproximadamente el 1% (en peso seco) de componentes contaminantes. Por lo tanto, un componente de interés "sustancialmente purificado" puede tener un nivel de pureza de aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99% o más. Solo a modo de ejemplo, un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural puede purificarse a partir de una célula

nativa, o célula huésped en el caso de polipéptidos de aminoácidos naturales producidos de forma recombinante o polipéptidos de aminoácidos no naturales. A modo de ejemplo, una preparación de un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural puede "purificarse sustancialmente" cuando la preparación contiene menos de aproximadamente el 30%, menos de aproximadamente el 25%, menos de aproximadamente el 20%, menos de aproximadamente el 15%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2%, o menos de aproximadamente el 1% (en peso seco) de material contaminante. A modo de ejemplo, cuando las células huésped producen un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural, el polipéptido de aminoácido natural o el polipéptido de aminoácido no natural pueden estar presentes en aproximadamente el 30%, aproximadamente el 25%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 15%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 5%, aproximadamente el 4%, aproximadamente el 3%, aproximadamente el 2%, o aproximadamente el 1% o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, cuando un polipéptido de aminoácido natural o un polipéptido de aminoácido no natural se produce de forma recombinante por las células huésped, el polipéptido de aminoácido natural o el polipéptido de aminoácido no natural puede estar presente en el medio de cultivo a aproximadamente 5 g/L, aproximadamente 4 g/L, aproximadamente 3 g/L, aproximadamente 2 g/L, aproximadamente 1 g/L, aproximadamente 750 mg/l, aproximadamente 500 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 100 mg/L, aproximadamente 50 mg/L, aproximadamente 10 mg/L, o aproximadamente 1 mg/L o menos del peso seco de las células. A modo de ejemplo, los polipéptidos de aminoácidos naturales "sustancialmente purificados" o los polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden tener un nivel de pureza de aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 99% o más, según lo determinen los métodos apropiados, incluidos, entre otros, análisis de SDS/PAGE, RP-HPLC, SEC y electroforesis capilar.

[0152] El término "sustituyentes" también denominado "sustituyentes no interferentes" se refiere a grupos que pueden usarse para reemplazar otro grupo en una molécula. Dichos grupos incluyen, entre otros, halo, alquilo C₁-C₁₀, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, alcoxi C₁-C₁₀, aralquilo C₅-C₁₂, cicloalquilo C₃-C₁₂, cicloalqueno C₄-C₁₂, fenilo, fenilo sustituido, toluilo, xilenilo, bifenilo, alcoxiaralquilo C₂-C₁₂, alcoxiaralquilo C₅-C₁₂, alcoxiarilo, ariloalquilo C₅-C₁₂, oxiaril C₇-C₁₂, alquilosulfino C₁-C₆, alquilosulfonilo C₁-C₁₀, -(CH₂)_m-O-(alquilo C₁-C₁₀) en donde m es de 1 a 8, arilo, arilo sustituido, alcoxi sustituido, fluoroalquilo, radical heterocíclico, radical heterocíclico sustituido, nitroalquilo, -NO₂, -CN, -NRC(O)-(alquilo C₁-C₁₀), -C(O)-(alquilo C₁-C₁₀), alquiloalquilo C₂-C₁₀, -C(O)O-(alquilo C₁-C₁₀), -OH, -SO₂, = S, -COOH, -NR₂, carbonilo, -C(O)-(alquilo C₁-C₁₀)-CF₃, -C(O)-CF₃, -C(O)NR₂, -(arilo C₁-C₁₀)-S-(arilo C₆-C₁₀), -C(O)-(arilo C₆-C₁₀), -(CH₂)_m-O-(CH₂)_m-O-(alquilo C₁-C₁₀) en donde cada m es de 1 a 8, -C(O)NR₂, -C(S)NR₂, -SO₂NR₂, -NRC(O)NR₂, -NRC(S)NR₂, sales de los mismos, y similares. Cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, H, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido, o alcarilo. Cuando los grupos sustituyentes se especifican por sus fórmulas químicas convencionales, escritas de izquierda a derecha, abarcan igualmente los sustituyentes químicamente idénticos que resultarían de escribir la estructura de derecha a izquierda; por ejemplo, -CH₂O- es equivalente a -OCH₂-.

[0153] Solo a modo de ejemplo, los sustituyentes de radicales alquilo y heteroalquilo (incluidos los grupos denominados alqueno, alqueno, heteroalqueno, heteroalqueno, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno y heterocicloalqueno) incluyen, pero no se limitan a: -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR₂, -SR, -halógeno, -SiR₃, -OC(O)R, -C(O)R, -CO₂R, -CONR₂, -OC(O)NR₂, -NRC(O)R, -NRC(O)NR₂, -NR(O)₂R, -NR-C(NR₂)=NR, -S(O)R, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -NRSO₂R, -CN y -NO₂. Cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, que incluye, entre otros, arilo sustituido con 1-3 halógenos, grupos alquilo, alcoxi o tioalcoxi sustituido o no sustituido, o grupos aralquilo. Cuando dos grupos R se unen al mismo átomo de nitrógeno, se pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR₂ pretende incluir, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo.

[0154] A modo de ejemplo, los sustituyentes para grupos arilo y heteroarilo incluyen, pero no se limitan a, -OR, =O, =NR, =N-OR, -NR₂, -SR, -halógeno, -SiR₃, -OC(O)R, -C(O)R, -CO₂R, -CONR₂, -OC(O)NR₂, -NRC(O)R, -NRC(O)NR₂, -NR(O)₂R, -NR-C(NR₂)=NR, -S(O)R, -S(O)₂R, -S(O)₂NR₂, -NRSO₂R, -CN, -NO₂, -R, -N₃, -CH(Ph)₂, flúor (C₁-C₄) alcoxi y flúor (C₁-C₄) alquilo, en un número que oscila entre cero y el número total de valencias abiertas en el sistema de anillo aromático; y donde cada grupo R en la lista anterior incluye, pero no se limita a, hidrógeno, alquilo, heteroalquilo, arilo y heteroarilo.

[0155] La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácido no natural y/o al menos un polipéptido de aminoácido no natural modificado administrado a un el paciente ya sufre una enfermedad, afección o trastorno, suficiente para curar o al menos detener parcialmente, o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se está tratando. La efectividad de tales composiciones depende de condiciones que incluyen, entre otras, la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o condición, la terapia previa, el estado de salud del paciente y la respuesta a los medicamentos, y el juicio del médico que lo trata. Solo a modo de ejemplo, las cantidades terapéuticamente eficaces se pueden determinar mediante la experimentación de rutina, que incluye, entre otros, un ensayo clínico de aumento de la dosis.

[0156] El término "tioalcoxi", como se usa en el presente documento, se refiere a grupos alquilo que contienen azufre unidos a moléculas a través de un átomo de oxígeno.

5 **[0157]** El término "punto de fusión térmico" o T_m es la temperatura (con una fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias a una diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio.

10 **[0158]** El término "resto tóxico" o "grupo tóxico", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto que puede causar daños, perturbaciones o la muerte. Los restos tóxicos incluyen, pero no se limitan a, NCA1, auristatina, agente de unión al surco menor del ADN, agente alquilante del surco menor del ADN, enedina, lexitropsina, duocarmicina, taxano, puromicina, dolastatina, maytansinoide, alcaloide vinca, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecano, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, calicheamicina, maitansina, DM-1, netropsina, podofilotoxina (p.ej. etopósido, tenipósido, etc.), baccatina y sus derivados, agentes anti-tubulina, criptofisina, combretastatina, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, epotilona A, epotilona B, nocodacoles, colcimid, estramustina, cemadotina, discodermólido, maytansina, eleuterobina, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, carmustina, lomustina, semustina, etc. trietilenmelamina, trietilenotiofosforamina, busulfán, dacarbazina y temozolomida, itarabina, citosina arabinosida, fluorouracilo, floxuridina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, pentostatina, 5-fluorouracilo, metotrexato, 10-propargilo-5,8-dideazafolato, ácido 5,8-dideazatetrahidrofólico, leucovorina, fosfato de fludarabina, pentostatina, gemcitabina, Ara-C, paclitaxel, docetaxel, deoxicofornicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, azatioprina, brequinar, antibióticos (p.ej., antraciclina, gentamicina, cefalotina, vancomicina, telavancina, daptomicina, azitromicina, eritromicina, rocitromicina, furazolidona, amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, flucloxacilina, meticilina, penicilina, ciprofloxacina, moxifloxacina, ofloxacina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, estreptomina, rifabutina, etambutol, rifaximina, etc.), medicamentos antivirales (p. ej., abacavir, aciclovir, ampligeno, cidofovir, delavirdina, didanosina, efavirenz, entecavir, fosfonet, ganciclovir, ibacitabina, inmunovir, idoxuridina, inosina, lopinavir, metisazona, nexavir, nevirapina, oseltamivir, penciclovir, estavudina, trifluridina, truvada, valaciclovir, zanamivir, etc.), hidrocloreuro de daunorubicina, daunomicina, rubidomicina, cerubidina, idarubicina, doxorubicina, epirubicina y derivados de morfolino, bisciclopéptidos de fenoxizona (p. ej., dactinomicina), glucopéptidos básicos (p. ej., bleomicina), glucósidos de antraquinona (p. ej., plicamicina, mitramicina), antracenodionas (p. ej., mitoxantrona), indoledionas de azirinopirrol (p. ej., mitomicina), inmunosupresores macrocíclicos (p. ej. ciclosporina, FK-506, tacrolimus, prograf, rapamicina, etc.), navelbeno, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida, droloxafina, alocolchicina, Halicondrina B, cochicina, derivados de colchicina, maitansina, rizoxina, paclitaxel, derivados de paclitaxel, docetaxel, tiocolchicina, cisterina de tritilo, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina, cisplatino, carboplatino, hidroxidurea, N-metilhidrazina, epidofilotoxina, procarbazona, mitoxantrona, leucovorina y tegegur. Los "taxanos" incluyen paclitaxel, así como cualquier derivado activo de taxano o profármaco, agentes quimioterapéuticos como erlotinib (TARCEVA.RTM., Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE.RTM., Millenium Pharm.) fulvestrant (FASLODEX.RTM., AstraZeneca), sutent (SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA.RTM., Novartis), meslato de imatinib (GLEEVEC.RTM., Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatina (Eloxatin.RTM., Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, Rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE.RTM., Wyeth), lapatinib (TYKERB.RTM., GSK572016, GlaxoSmithKline), Lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.), y gefitinib (IRESSA.RTM., AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN.RTM. ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improfulfán y piposulfán; antineoplástico de antifolato como pemetrexado (ALIMTA.RTM, Eli Lilly), aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluido el topotecán análogo sintético); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina una sarcodictina; espongiastatina; mostazas nitrogenadas como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como los antibióticos de enediino, calicheamicina, calicheamicina gamma1I y calicheamicina omega1I; dinemina, incluyendo dinemina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos relacionados con el cromoproteína enedina, aclacinomisinas, actinomicina, antramincina, azeraserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicinis, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN.RTM. doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de

dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico, tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamina; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina demecolcina diaziouona; elformitina; acetato de eliptinio; una eptilona; etoglucido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguzona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; phenamet pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbazona; PSK.RTM. complejo de polisacáridos (JHS Natural Products, Eugene, Oregón); razoxano; rizoxina; sizofuran espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziouona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manacustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamina; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL.RTM., Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), ABRAXANE.TM. Libre de Cremophor, albúmina, formulación de nanopartículas de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), y TAXOTERE.RTM. doxetaxel (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; GEMZAR.RTM. gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina, platino; etopósido (VP-16); ifosfamina; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE.RTM. vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000, difluorometilomina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico, capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0159] Los términos "tratar", "tratado" o "tratamiento", como se usan en este documento, incluyen aliviar, atenuar o mejorar una enfermedad o síntomas de afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o afección, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, causar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección. Los términos "tratar", "tratado" o "tratamiento", incluyen, entre otros, tratamientos profilácticos y/o terapéuticos.

[0160] Como se usa en el presente documento, el término "polímero soluble en agua" se refiere a cualquier polímero que sea soluble en disolventes acuosos. Dichos polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol, polietilenglicol propionaldehído, monoalcoxi C₁-C₁₀ o sus derivados ariloxi (descritos en la patente de EE.UU. N° 5.252.714), monometoxi-polietilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, ácidos de poliamino, anhídrido maleico diviniléter, N-(2-hidroxi-propilo-metilo)-metacrilamida, dextrano, derivados de dextrano que incluyen sulfato de dextrano, polipropilenglicol, óxido de polipropileno/copolímero de óxido de etileno, polioli polioxi-etilado, heparina, fragmentos de heparina, polisacáridos, oligosacáridos, glicanos, celulosa, y derivados de celulosa, incluidos, entre otros, metilcelulosa y carboximetilcelulosa, albúmina de suero, derivados de almidón y almidón, polipéptidos, polialquilenglicol y derivados de los mismos, copolímeros de polialquilenglicoles y derivados de los mismos, polivinilo etilo éteres y alfa-beta poli[(2-hidroxi-etilo)-DL-aspartamida, o mezclas de los mismos. Solo a modo de ejemplo, el acoplamiento de dichos polímeros solubles en agua a polipéptidos de aminoácidos naturales o polipéptidos no naturales puede producir cambios que incluyen, entre otros, aumento de la solubilidad en agua, vida media en suero aumentada o modulada, vida media terapéutica aumentada o modulada relativa a la forma no modificada, mayor biodisponibilidad, actividad biológica modulada, tiempo de circulación extendido, inmunogenicidad modulada, características de asociación física moduladas que incluyen, entre otras, agregación y formación de multímeros, enlace al receptor alterado, enlace alterado a una o más parejas de enlace y alteración de la dimerización del receptor o multimerización. Además, tales polímeros solubles en agua pueden o no tener su propia actividad biológica.

[0161] A menos que se indique lo contrario, se emplean métodos convencionales de espectroscopía de masas, RMN, HPLC, química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica.

[0162] Los compuestos (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) presentados aquí incluyen compuestos marcados isotópicamente, que son idénticos a los enumerados en las diversas fórmulas y estructuras presentadas en este documento, pero por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o el número de masas que se encuentra generalmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en los presentes compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, flúor y cloro, tales como ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁷O, ³⁵S, ¹⁸F, ³⁶Cl, respectivamente. Ciertos compuestos marcados con isótopos descritos en el presente documento, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos tales como ³H y ¹⁴C, son útiles en ensayos de distribución de tejido de sustrato y/o fármaco. Además, la sustitución con isótopos como el deuterio, es decir, ²H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, un aumento de la vida media *in vivo* o requisitos de dosificación reducida.

[0163] Algunos de los compuestos en este documento (que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) tienen átomos de carbono asimétricos y, por lo tanto, pueden

existir como enantiómeros o diastereómeros, las mezclas diastoméricas se pueden separar en sus diastereómeros individuales en base a sus diferencias químicas y físicas mediante métodos conocidos, por ejemplo, por cromatografía y/o cristalización fraccionada. Los enantiómeros pueden separarse convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereomérica por reacción con un compuesto ópticamente activo apropiado (por ejemplo, alcohol), separando los diastereoisómeros y convirtiendo (por ejemplo, hidrolizando) los diastereoisómeros individuales en los enantiómeros puros correspondientes. Todos estos isómeros, incluidos los diastereómeros, enantiómeros y mezclas de los mismos se consideran parte de las composiciones descritas en el presente documento.

[0164] En realizaciones adicionales o adicionales, los compuestos descritos en el presente documento (que incluyen, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) son utilizados en forma de profármacos. En realizaciones adicionales o adicionales, los compuestos descritos en el presente documento ((incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados, y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) se metabolizan en la administración a un organismo que necesita producir un metabolito que luego se usa para producir un efecto deseado, incluido un efecto terapéutico deseado. En realizaciones adicionales o adicionales, son metabolitos activos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados o no modificados.

[0165] Los métodos y formulaciones descritos aquí incluyen el uso de N-óxidos, formas cristalinas (también conocidas como polimorfos) o sales farmacéuticamente aceptables de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados. En ciertas realizaciones, los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados pueden existir como tautómeros. Todos los tautómeros están incluidos dentro del alcance de los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados presentados en el presente documento. Además, los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados descritos en el presente documento pueden existir en formas no solvatadas y solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. Las formas solvatadas de los aminoácidos no naturales, los polipéptidos de aminoácidos no naturales y los polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados presentados en el presente documento también se consideran descritos en el presente documento.

[0166] Algunos de los compuestos de este documento (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos y reactivos de aminoácidos no naturales modificados para producir los compuestos mencionados anteriormente) pueden existir en varios compuestos formas tautoméricas. Todas estas formas tautoméricas se consideran parte de las composiciones descritas en este documento. Además, por ejemplo, todas las formas enol-ceto de cualquier compuesto (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos y reactivos de aminoácidos no naturales modificados para producir los compuestos mencionados anteriormente) se consideran aquí como parte de las composiciones descritas en este documento.

[0167] Algunos de los compuestos en este documento (que incluyen, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos y reactivos de aminoácidos no naturales modificados para producir cualquiera de los compuestos mencionados anteriormente) son ácidos y pueden formar una sal con un catión farmacéuticamente aceptable. Algunos de los compuestos de la presente memoria (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales y polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados y reactivos para producir los compuestos mencionados anteriormente) pueden ser básicos y, en consecuencia, pueden formar una sal. Con un anión farmacéuticamente aceptable. Todas estas sales, incluidas las di-sales, están dentro del alcance de las composiciones descritas en el presente documento y pueden prepararse mediante métodos convencionales. Por ejemplo, las sales pueden prepararse poniendo en contacto las entidades ácidas y básicas, ya sea en forma acuosa, no acuosa o medio parcialmente acuoso. Las sales se recuperan utilizando al menos una de las siguientes técnicas: filtración, precipitación con un no disolvente seguido de filtración, evaporación del disolvente o, en el caso de soluciones acuosas, liofilización.

[0168] Las sales farmacéuticamente aceptables de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden formarse cuando un protón ácido presente en los polipéptidos de aminoácidos no naturales originales se reemplaza por un ión metálico, a modo de ejemplo, un ión de metal alcalino, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o coordinadas con una base orgánica. Además, las formas de sal de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos pueden prepararse usando sales de los materiales de partida o intermedios. Los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden prepararse como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable (que es un tipo de sal farmacéuticamente aceptable) haciendo reaccionar la forma de base libre de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en el presente documento con un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en este documento pueden prepararse como sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables (que son un tipo de sal farmacéuticamente aceptable) haciendo reaccionar la forma

de ácido libre de los polipéptidos de aminoácidos no naturales descritos en este documento con una base inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable.

5 **[0169]** El tipo de sales farmacéuticamente aceptables incluye, pero no se limita a: (1) sales de adición de ácido, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares; o formados con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoilo)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-metilbicyclo-[2,2,2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, 4,4'-metilenobis(ácido 3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido laurilsulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico y similares; (2) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto original es reemplazado por un ión metálico, por ejemplo, un ión de metal alcalino, un ión alcalinotérreo o un ión de aluminio; o coordinadas con una base orgánica, las bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina y similares. Las bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio y similares.

20 **[0170]** Los contraiones correspondientes de las sales farmacéuticamente aceptables de polipéptidos de aminoácidos no naturales pueden analizarse e identificarse utilizando diversos métodos que incluyen, entre otros, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de iones, electroforesis capilar, plasma acoplado inductivamente, espectroscopia de absorción atómica, espectrometría de masas, o cualquier combinación de los mismos. Además, la actividad terapéutica de tales sales farmacéuticamente aceptables de polipéptidos de aminoácidos no naturales se puede ensayar utilizando las técnicas y métodos descritos en los ejemplos 87-91.

30 **[0171]** Debe entenderse que una referencia a una sal incluye las formas de adición de solventes o formas cristalinas de las mismas, particularmente solvatos o polimorfos. Los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un solvente, y se forman a menudo durante el proceso de cristalización con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol y similares. Los hidratos se forman cuando el disolvente es agua, o los alcoholatos se forman cuando el disolvente es alcohol. Los polimorfos incluyen las diferentes disposiciones de empaquetamiento de cristales de la misma composición elemental de un compuesto. Los polimorfos suelen tener diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros infrarrojos, puntos de fusión, densidad, dureza, forma del cristal, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. Varios factores, como el disolvente de recristalización, la velocidad de cristalización y la temperatura de almacenamiento pueden hacer que domine una forma de cristal único.

40 **[0172]** La selección y caracterización de polipéptidos de aminoácidos no naturales, sales farmacéuticamente aceptables, polimorfos y/o solvatos se pueden lograr usando una variedad de técnicas que incluyen, pero no se limitan a, análisis térmico, difracción de rayos X, espectroscopia, sorción de vapor y microscopía. Los métodos de análisis térmico abordan la degradación termoquímica o los procesos termo físicos que incluyen, entre otros, transiciones polimórficas, y dichos métodos se utilizan para analizar las relaciones entre formas polimórficas, determinar la pérdida de peso, encontrar la temperatura de transición vítrea o para estudios de compatibilidad de excipientes. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, calorimetría diferencial de barrido (DSC), calorimetría diferencial de barrido modulada (MDCS), análisis termogravimétrico (TGA) y análisis termométrico e infrarrojo (TG/IR). Los métodos de difracción de rayos X incluyen, pero no se limitan a, difractómetros de monocristales y en polvo y fuentes de sincrotrón. Las diversas técnicas espectroscópicas utilizadas incluyen, pero no se limitan a, Raman, FTIR, UVIS y RMN (estado líquido y sólido). Las diversas técnicas de microscopía incluyen, pero no se limitan a, microscopía de luz polarizada, microscopía electrónica de barrido (SEM) con análisis de rayos X de energía dispersiva (EDX), microscopía electrónica de barrido ambiental con EDX (en atmósfera de gas o vapor de agua), microscopía IR, y microscopía Raman.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 **[0173]** Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención haciendo referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos adjuntos de los cuales:

60 La Fig. 1 presenta una ilustración gráfica de la eficacia antitumoral del anticuerpo CD70-2H5-HA119 no conjugado ARX- α CD70 administrado en una dosis única a ratones hembra desnudos 7 días después de la implantación de un fragmento de tumor 786-O en una dosis de 3 mg/kg) contra vehículo de control.

65 La Fig. 2 presenta una ilustración gráfica del volumen del tumor en grupos de sujetos sometidos a prueba de ratones desnudos tratados con 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg de dosis del fármaco de anticuerpo conjugado CD70-2H5-HA119-NCA1 en el riñón modelo de xenoinjerto de carcinoma de células, las mismas condiciones de la Fig. 1,

La Fig. 3A presenta una ilustración gráfica de los resultados de un ensayo de citotoxicidad de tres conjugados de fármaco ARX-anticuerpo; CD70-2H5-NCA1, CD70-69A7-NCA1, y CD70hIF6-NCA1 en células 786-O.

La Fig. 3B presenta una ilustración gráfica de los resultados de un ensayo de citotoxicidad de tres conjugados de fármaco ARX-anticuerpo; CD70-2H5-NCA1, CD70-69A7-NCA1, y CD70hIF6-NCA1 en células Caki-1,

La Fig. 4 presenta una ilustración gráfica del volumen del tumor a lo largo del tiempo después de una inyección única en el día 12 de la Fig. 4(A), el anticuerpo CD70-2H5-HA119 de α CD70 conjugado con AS269 (también denominado NCA1 en la presente solicitud); Fig. 4(B) anticuerpo CD70-8A1-HA122 de α CD70 conjugado con AS269; y la Fig. 4(C) del anticuerpo α CD70 CD70-7F2-HA119 conjugado. Los conjugados farmacológicos de anticuerpos se administraron en dosis de 0,5 mg/kg; 1 mg/kg; y 3 mg/kg y en comparación con el vehículo.

La Fig. 5 presenta un gráfico de puntos de los volúmenes de tumores de los diferentes grupos de prueba, medido en el día 49 después del trasplante del fragmento de tumor 786-O.

La Fig. 6A presenta una ilustración gráfica del volumen del tumor en grupos de sujetos de prueba con ratones desnudos tratados con CD70-2H5-AS269 3 mg/kg; CD70-8A1-AS269 3 mg/kg; y CD70-7F2-AS269 3 mg/kg; administrado 12 días después del trasplante de un fragmento de tumor 786-O.

La Fig. 6B presenta una ilustración gráfica del volumen del tumor en grupos de sujetos de prueba de ratones desnudos tratados con CD70-2H5-AS269 en 1 mg/kg y 3 mg/kg en comparación con el vehículo; Los conjugados farmacológicos de anticuerpos se administraron 12 días después del trasplante de un fragmento de tumor 786-O.

La Fig. 6C presenta una ilustración gráfica del volumen del tumor en grupos de sujetos de prueba de ratones desnudos tratados con 8A1-pAF1-AS269 en 1 mg/kg y 3 mg/kg en comparación con el vehículo; los conjugados farmacológicos de anticuerpos se administraron 12 días después del trasplante de un fragmento de tumor 786-O.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0174] Aunque las realizaciones preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en el presente documento, será obvio para los expertos en la materia que tales realizaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo. A los expertos en la técnica se les ocurrirán numerosas variaciones, cambios y sustituciones sin apartarse de la invención. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento para poner en práctica la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes se cubran de ese modo.

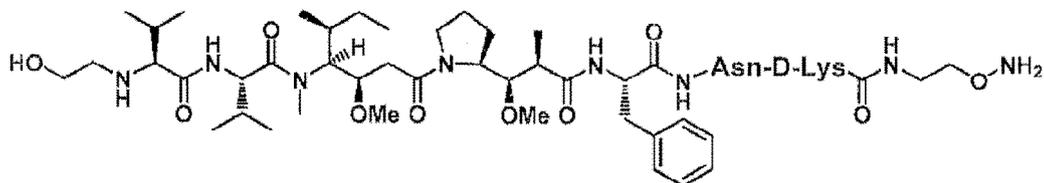
I. Introducción

[0175] Recientemente, se ha informado de una tecnología completamente nueva en las ciencias de las proteínas, que promete superar muchas de las limitaciones asociadas con las modificaciones de proteínas específicas del sitio. Específicamente, se han agregado nuevos componentes a la maquinaria biosintética de proteínas del procarionta *Escherichia coli* (*E. coli*) (por ejemplo, L. Wang, et al., (2001), *Science* 292: 498-500) y al eucariota *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (por ejemplo, J. Chin et al., *Science* 301: 964-7 (2003)), que ha permitido la incorporación de aminoácidos no naturales a proteínas *in vivo*. Varios nuevos aminoácidos con nuevas propiedades químicas, físicas o biológicas, que incluyen etiquetas de fotoafinidad y aminoácidos fotoisomerizables, ceto aminoácidos y aminoácidos glicosilados se han incorporado de manera eficiente y con alta fidelidad a proteínas en *E. coli* y en levaduras en respuesta al codón ámbar, TAG, utilizando esta metodología. Véase, por ejemplo, JW Chin et al., (2002), *Journal of American Chemical Society* 124: 9026-9027; JW Chin, y PG Schultz, (2002), *ChemBioChem* 3(11): 1135-1137; JW Chin, et al., (2002), *PNAS United States of America* 99(17): 11020-11024; y, L. Wang, y PG Schultz, (2002), *Chem. Comm.*, 1-11. Estos estudios han demostrado que es posible introducir selectiva y rutinariamente grupos funcionales químicos que no se encuentran en proteínas, que son químicamente inertes a todos los grupos funcionales encontrados en los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente y que pueden usarse para reaccionar de manera eficiente y selectiva para formar enlaces covalentes estables.

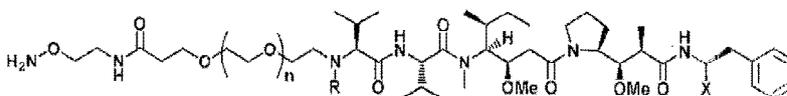
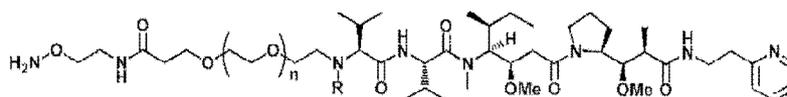
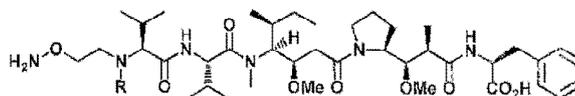
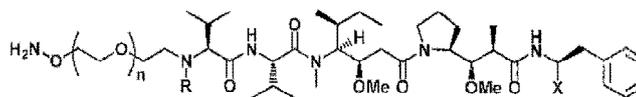
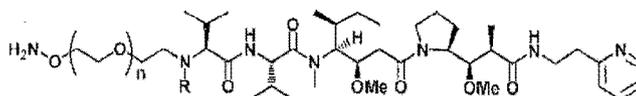
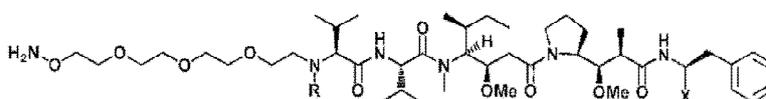
I. Descripción general

[0176] La presente invención proporciona anticuerpos α CD70 que tienen un aminoácido no codificado de forma natural que facilita la conjugación de anticuerpos a un fármaco (por ejemplo, un fármaco, una toxina, una molécula marcadora). El ADC comprende un anticuerpo α CD70 conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo α CD70 conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en la cadena pesada del anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo α CD70 conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en la cadena ligera del anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo de longitud completa conjugado con una alfombra de anuncios en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo de longitud completa conjugado a un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en la cadena pesada del anticuerpo. En una realización, el ADC comprende un anticuerpo de longitud completa conjugado con un fármaco en el que la conjugación se produce a través de un aminoácido no codificado de forma natural en la cadena ligera del anticuerpo.

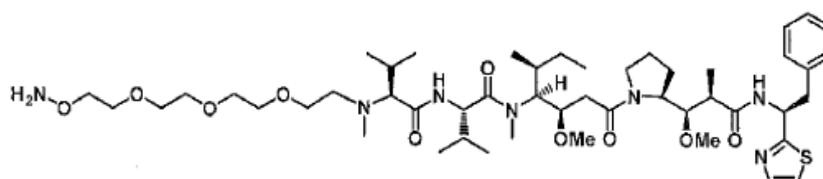
[0177] En algunas realizaciones, el fármaco del ADC es un fármaco citotóxico. En algunos aspectos de la invención, el fármaco citotóxico se selecciona del grupo que consiste en una auristatina, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, un enedino, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puromicina, dolastatina, un maitansinoide y un alcaloide de la vinca. En algunos aspectos de la invención, el fármaco citotóxico es



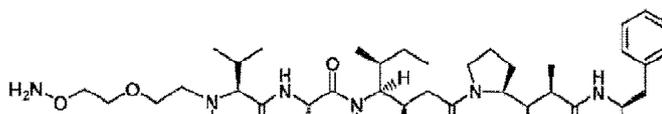
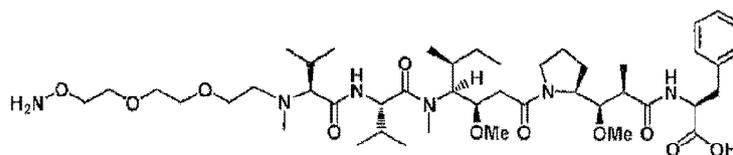
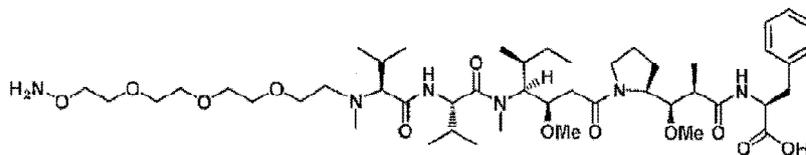
[0178] En otras realizaciones de la presente invención, el fármaco citotóxico se elige del grupo que comprende:



[0179] En algunas realizaciones de la presente invención, el fármaco citotóxico se elige del grupo que consiste en



[0181] En otros aspectos de la presente invención, el fármaco citotóxico se elige del grupo que consiste en



20

[0182] En otros aspectos de la presente invención, el fármaco citotóxico se selecciona del grupo que consiste en AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecano, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, echinomicina, combretastatina, calicheamicina, maitansina, DM-1, o netropsina.

25

[0183] En algunos aspectos de la invención, el fármaco citotóxico es un agente anti-tubulina. En algunas realizaciones, el agente antitubulina es una auristatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de baccatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina o una dolastatina. En otros aspectos de la invención, el agente antitubulina es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, eptilona A, nocodazol, colchicinas, colcimid, estramustina, cematotina, discodenolida, maytanina, DM-1, o eleuterobina.

30

[0184] En otros aspectos de la invención, el fármaco citotóxico del ADC es ganciclovir, etanercept, ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetilo, metotrexato, cortisol, aldosterona, aldosterona, dexametasona, un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-ipoxigenasa, o un antagonista del receptor de leucotrienos.

35

[0185] En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo del ADC comprende un anticuerpo de longitud completa que: (a) se une a CD70, y (b) está conjugado con un agente citotóxico o un agente inmunosupresor, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco ejerce: (a) un efecto citotóxico o citostático sobre una línea de células cancerosas que expresan CD70, o (b) un efecto citotóxico, citostático o inmunosupresor sobre una célula inmunitaria que expresa CD70, en donde la conjugación ocurre en un aminoácido codificado de forma no natural en el anticuerpo.

40

[0186] A un nivel, se describen en este documento las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y usar derivados de ligadores de dolastatina o análogos que comprenden al menos un carbonilo, dicarbonilo, oxima, hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, azida, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, alquino, cicloalquino o eno-diona. En otro nivel, en el presente documento se describen las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y utilizar derivados de enlazadores de dolastatina o análogos que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con una oxima, una amina aromática, un heterociclo (por ejemplo, indol, quinoxalina, fenazina, pirazol, triazol, etc.).

45

[0187] Dichos derivados del enlazador de dolastatina que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener una funcionalidad adicional, que incluye pero no se limita a, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades mencionadas no pretenden implicar que los miembros de una funcionalidad no puedan clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. Solo a modo de ejemplo, un polímero soluble en agua se superpone en el alcance con un derivado de polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y, por lo tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

[0188] En el presente documento, en algunas realizaciones, se proporciona un derivado de enlace de grupo tóxico que comprende un carbonilo, dicarbonilo, oxima, hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, azida, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, alquino, cicloalquino o eno-diona. En algunas realizaciones, el derivado de grupo tóxico comprende cualquiera de los enlazadores descritos en el presente documento. En otras realizaciones, en el presente documento se describen las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y usar derivados de grupos tóxicos o análogos que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con una oxima, una amina aromática, un heterociclo (por ejemplo, indol, quinoxalina, fenazina, pirazol, triazol, etc.).

[0189] En algunas realizaciones, dichos derivados tóxicos que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener una funcionalidad adicional, que incluye, entre otros, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones específicas, el grupo tóxico es un inhibidor de tubulina. En ciertas realizaciones específicas, el grupo tóxico es dolastatina o auristatina. En otras realizaciones específicas, el grupo tóxico es dolastatina o derivado de auristatina. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades mencionadas anteriormente no pretenden implicar que los miembros de una funcionalidad no puedan clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. Solo a modo de ejemplo, un polímero soluble en agua se solapa en el alcance con un derivado de polietilenglicol; sin embargo, el solapamiento no es completo y, por lo tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

[0190] Ciertas realizaciones de la presente invención describen preparaciones de ciertos restos tóxicos con enlazadores que reducen la toxicidad del resto *in vivo* mientras que el resto tóxico conserva la actividad farmacológica. En algunas realizaciones, la toxicidad del grupo tóxico unido, cuando se administra a un animal o humano, se reduce o elimina en comparación con el grupo tóxico libre o los derivados de grupo tóxico que comprenden enlaces lábiles, mientras que retienen la actividad farmacológica. En algunas realizaciones, se pueden administrar dosis elevadas del grupo tóxico enlazado (por ejemplo, derivados del enlazador de dolastatina, derivados de dolastatina no ligados a aminoácidos no naturales) a animales o seres humanos con mayor seguridad. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de aminoácidos no naturales unidos a un resto tóxico (por ejemplo, derivado de dolastatina) proporcionan estabilidad *in vitro* e *in vivo*. En algunas realizaciones, los polipéptidos de aminoácidos no naturales unidos a un resto tóxico (por ejemplo, inhibidor de tubulina, derivado de dolastatina-10) son eficaces y menos tóxicos en comparación con el resto tóxico libre (por ejemplo, inhibidor de tubulina, dolastatina-10).

III. Derivados del enlazador de dolastatina

[0191] A un nivel, se describen en este documento las herramientas (métodos, composiciones, técnicas) para crear y usar un derivado de enlazador de dolastatina o análogos que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con un carbonilo, dicarbonilo, oxima o grupo hidroxilamina. Tales derivados de enlazadores de dolastatina que comprenden aminoácidos no naturales pueden contener una funcionalidad adicional, que incluye, entre otros, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos. Tenga en cuenta que las diversas funcionalidades mencionadas anteriormente no pretenden implicar que los miembros de una funcionalidad no puedan clasificarse como miembros de otra funcionalidad. De hecho, habrá superposición dependiendo de las circunstancias particulares. Solo a modo de ejemplo, un polímero soluble en agua se superpone en el alcance con un derivado de polietilenglicol, sin embargo, el solapamiento no es completo y, por lo tanto, ambas funcionalidades se citan anteriormente.

[0192] En un aspecto, se encuentran métodos para seleccionar y diseñar un derivado de enlazador de dolastatina a modificar usando los métodos, composiciones y técnicas descritas en el presente documento. El nuevo derivado del enlazador de dolastatina se puede diseñar de novo, incluso solo a modo de ejemplo, como parte del proceso de selección de alto rendimiento (en cuyo caso se pueden diseñar, sintetizar, caracterizar y/o ensayar numerosos polipéptidos) o en función de los intereses del investigador. El nuevo derivado del enlazador de dolastatina también puede diseñarse en base a la estructura de un polipéptido conocido o parcialmente caracterizado. Sólo a modo de ejemplo, la dolastatina ha sido objeto de un intenso estudio por parte de la comunidad científica; Se puede diseñar un nuevo compuesto basado en la estructura de la dolastatina. Los principios para seleccionar los aminoácidos que sustituyen y/o modifican se describen por separado en este documento. La elección de qué modificación emplear también se describe en el presente documento, y se puede utilizar para satisfacer las necesidades del experimentador o usuario final. Dichas necesidades pueden incluir, entre otras, la manipulación de la eficacia terapéutica del polipéptido, la mejora del perfil de seguridad del polipéptido, el ajuste de la farmacocinética, la farmacología y/o la farmacodinámica del polipéptido, como, por ejemplo, únicamente, aumentando la solubilidad en agua, la biodisponibilidad, aumentando la vida media en suero, aumentando la vida media terapéutica, modulando la inmunogenicidad, modulando la actividad biológica, o extendiendo el tiempo de circulación. Además, dichas modificaciones incluyen, solo a modo de ejemplo, proporcionar funcionalidad adicional al polipéptido, incorporando un anticuerpo y cualquier combinación de las modificaciones mencionadas anteriormente.

[0193] También se describen en el presente documento derivados de enlazadores de dolastatina que tienen o

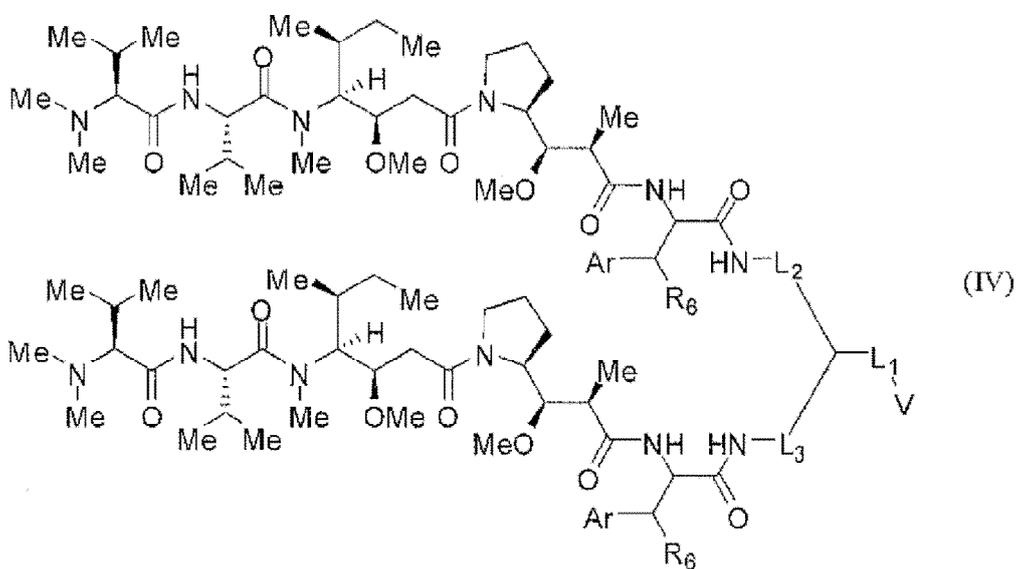
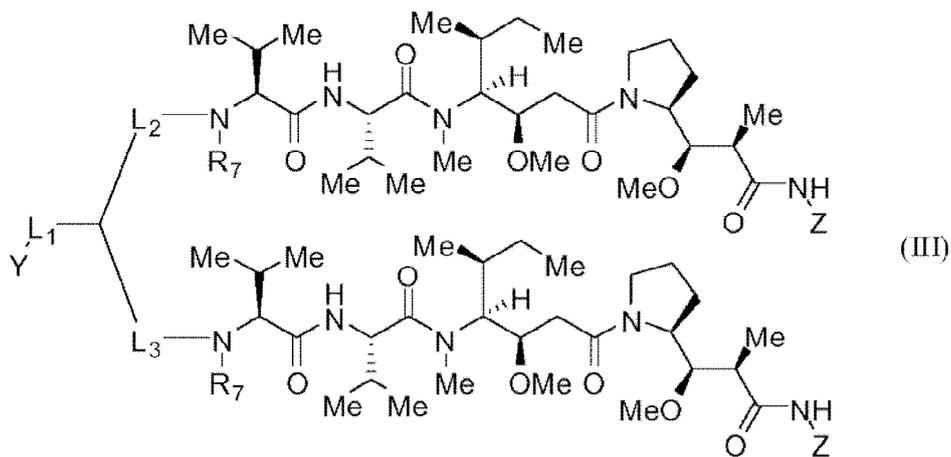
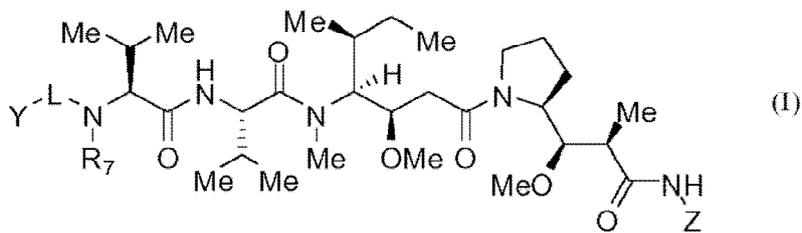
pueden modificarse para contener un grupo oxima, carbonilo, dicarbonilo o hidroxilamina. Con este aspecto se incluyen métodos para producir, purificar, caracterizar y utilizar dichos derivados de enlazadores de dolastatina.

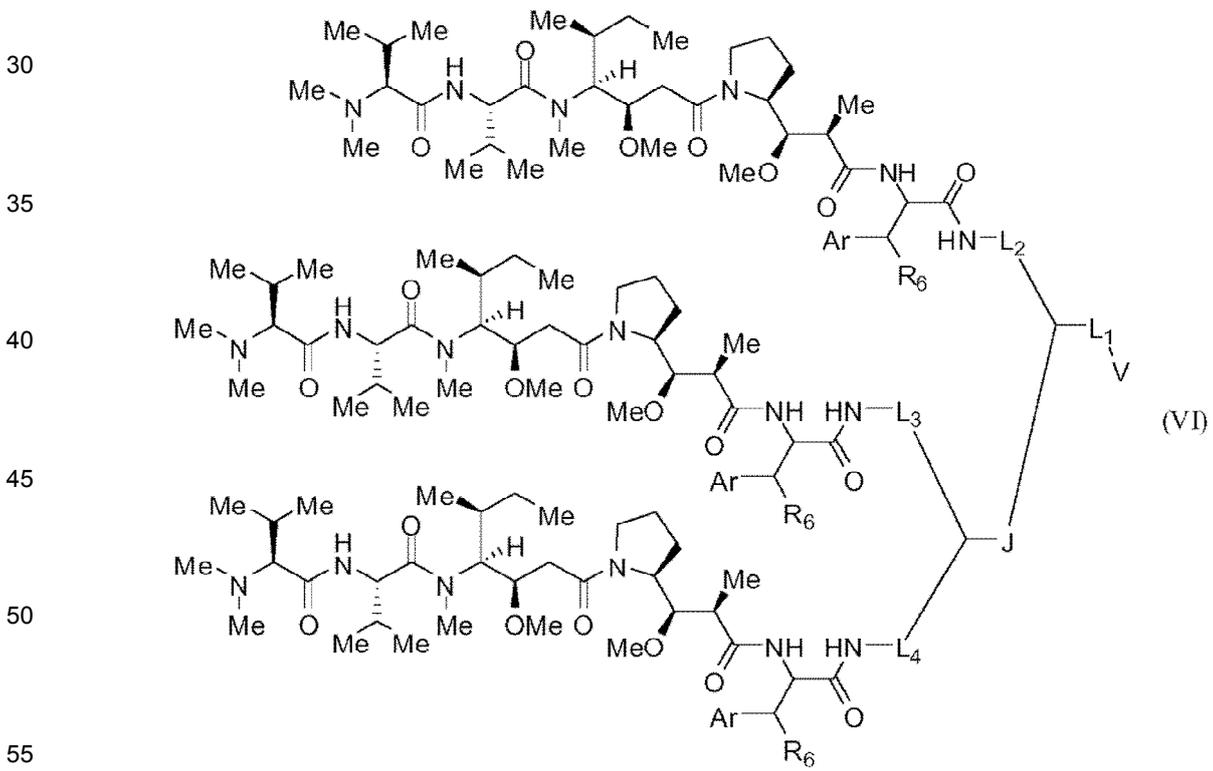
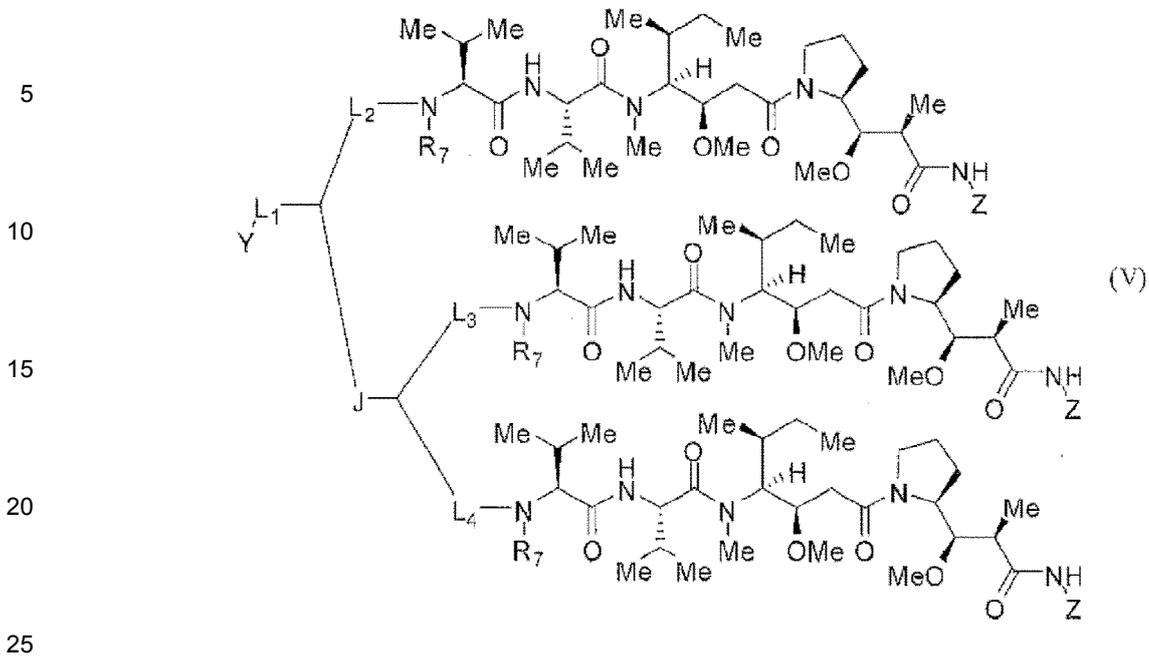
[0194] El derivado del enlazador de dolastatina puede contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o diez o más de un grupo carbonilo o dicarbonilo, un grupo oxima, un grupo hidroxilamina o sus formas protegidas. El derivado del enlazador de dolastatina puede ser igual o diferente, por ejemplo, puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más sitios diferentes en el derivado que comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más grupos reactivos diferentes.

A. Estructura y síntesis de los derivados del enlazador de dolastatina: grupos electrófilos y nucleófilos

[0195] Los derivados de dolastatina con enlazadores que contienen un grupo hidroxilamina (también llamado aminooxi) permiten que la reacción con una variedad de grupos electrofílicos forme conjugados (incluidos, entre otros, PEG u otros polímeros solubles en agua). Al igual que las hidrazinas, hidrazidas y semicarbazidas, la nucleofilicidad mejorada del grupo aminooxi le permite reaccionar de manera eficiente y selectiva con una variedad de moléculas que contienen grupos carbonilo o dicarbonilo, que incluyen, entre otros, cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con similares reaccion química. Véase, por ejemplo, Shao, J. y Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117: 3893 - 3899 (1995); H. Hang y C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34 (9): 727-736 (2001). Mientras que el resultado de la reacción con un grupo hidrazina es la hidrazona correspondiente, sin embargo, una oxima resulta generalmente de la reacción de un grupo aminooxi con un grupo que contiene carbonilo o dicarbonilo tal como, a modo de ejemplo, una cetonas, aldehídos u otros grupos funcionales con reactividad química similar. En algunas realizaciones, los derivados de la dolastatina con enlazadores que comprenden una azida, alquino o cicloalquino permiten la unión de moléculas mediante reacciones de cicloadición (por ejemplo, cicloadiciones 1,3-dipolares, cicloadición Huisgen de azidaalquino, etc.). (Descrito en la patente de EE.UU. N° 7.807.619).

[0196] Por lo tanto, en ciertas descripciones descritas en el presente documento son derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden una hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, amidina, imina, diamina, ceto-amina, ceto-alquino, y el grupo eno-diona hidroxilamina, un grupo similar a la hidroxilamina (que tiene una reactividad similar a un grupo hidroxilamina y es estructuralmente similar a un grupo hidroxilamina), un grupo hidroxilamina enmascarado (que puede convertirse fácilmente en un grupo hidroxilamina), o grupo hidroxilamina protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo hidroxilamina tras la desprotección). En algunas descripciones, los derivados de dolastatina con enlazadores comprenden azidas, alquinos o cicloalquinos. La presente invención proporciona derivados de enlazadores de dolastatina que incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI):





en donde:

60 Z tiene la estructura de:



R₅ es H, CORs, alquilo C₁-C₆ o tiazol;
 R₈ es OH o -NH-(alquileo-O)_n-NH₂;
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

5

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

Y y V se seleccionan cada uno del grupo que consiste en una hidroxilamina;

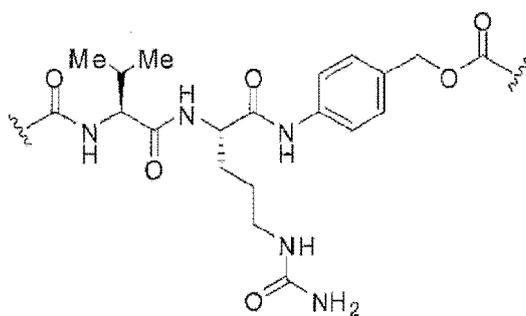
10

L, L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, alquileo, alquileo-C(O)-, alquileo-J-, -(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_nJ-, -(alquileo-O)_nJ-alquileo-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-, alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo', -J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n-alquileo-J', -W-, alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-, -J-alquileo-NMe-alquileo'-NMe-alquileo'-W-, y -alquileo-J-alquileo'-NMe-alquileo'-NMe-alquileo"-W-;

15

W tiene la estructura de:

20

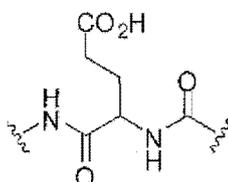


25

30

U tiene la estructura de:

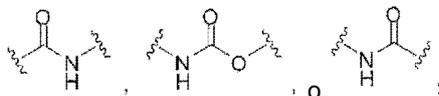
35



40

cada J y J' independientemente tienen la estructura de:

45



50

cada n, n', n", n"" y n"" son independientemente enteros mayores o iguales a uno; y o L está ausente, Y es metilo, R₅ es COR₈ y R₈ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂.

55

Dichos derivados del enlazador de dolastatina pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse a un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

60

[0197] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R₅ es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R₅ es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en donde alquileo es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (IV) y (VI), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,

65

23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

5 **[0198]** En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R₆ es H. En algunas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), R₆ es hidroxilo.

[0199] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), (III) y (V), Ar es fenilo.

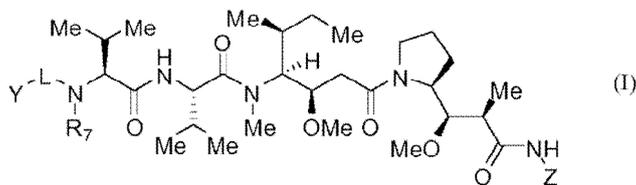
10 **[0200]** En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), R₇ es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), R₇ es hidrógeno.

15 **[0201]** En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), cada L, L₁, L₂, L₃ y L₄ es independientemente un enlazador escindible o no enlazador escindible. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), cada L, L₁, L₂, L₃ y L₄ es independientemente un enlazador derivatizado de oligo (etilenglicol).

20 **[0202]** En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (I), (III), (IV), (V) y (VI), cada alquileo, alquileo', alquileo" y alquileo" independientemente es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII), cada n, n', n", n'" y n"" es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

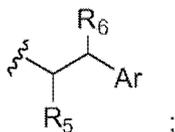
30 **A. Estructura y síntesis de derivados del enlazador de dolastatina: grupos hidroxilamina**

[0203] Por lo tanto, en ciertas realizaciones descritas en este documento son derivados de dolastatina con enlazadores que comprenden un grupo hidroxilamina. Tales derivados del enlazador de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I):



45 en donde:

Z tiene la estructura de:



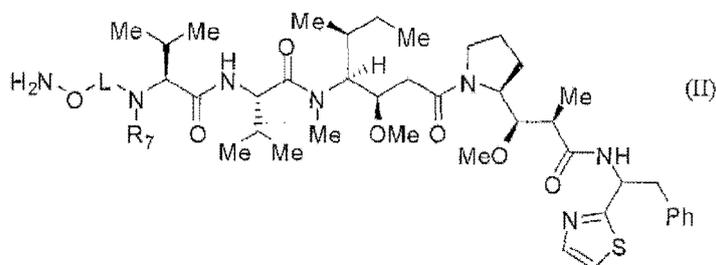
55 R₅ es H, CORs, alquilo C₁-C₆ o tiazol;
R₈ es OH o -NH-(alquileo-O)_n-NH₂;
R₆ es OH o H;
Ar es fenilo o piridina;

60 R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
Y es NH₂-O-;

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en -alquileo-, -alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-C(O)-, y -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-;

60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

[0211] En ciertas realizaciones, los derivados del enlazador de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (II):



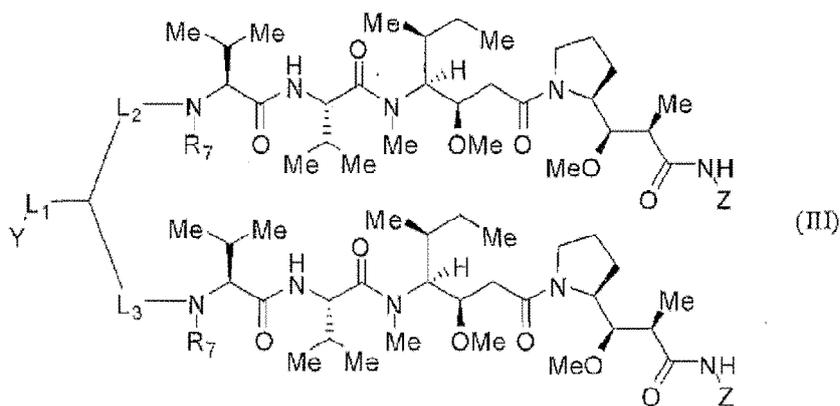
En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), L es $-(\text{alquileno-O})_n\text{-alquileno-}$. En algunas realizaciones, cada alquileno es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, n es igual a 3 y R₇ es metilo. En algunas realizaciones, L es $-\text{alquileno-}$. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada alquileno es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ y R₇ es metilo o hidrógeno. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), L es $-(\text{alquileno-O})_n\text{-alquileno-C(O)-}$. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada alquileno es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, n es igual a 4, y R₇ es metilo. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), L es $-(\text{alquileno-O})_n\text{-(CH}_2\text{)}_{n'}\text{-NHC(O)-(CH}_2\text{)}_{n''}\text{-C(Me)}_2\text{-S-S-(CH}_2\text{)}_{n'''}\text{-NHC(O)-}$ $(\text{alquileno-O})_{n''''}\text{-alquileno-}$. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada alquileno es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, n es igual a 1, n' es igual a 2, n'' es igual a 1, n''' es igual a 2, n'''' es igual a 4, y R₇ es metilo. Dichos derivados del enlazador de dolastatina pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse a un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

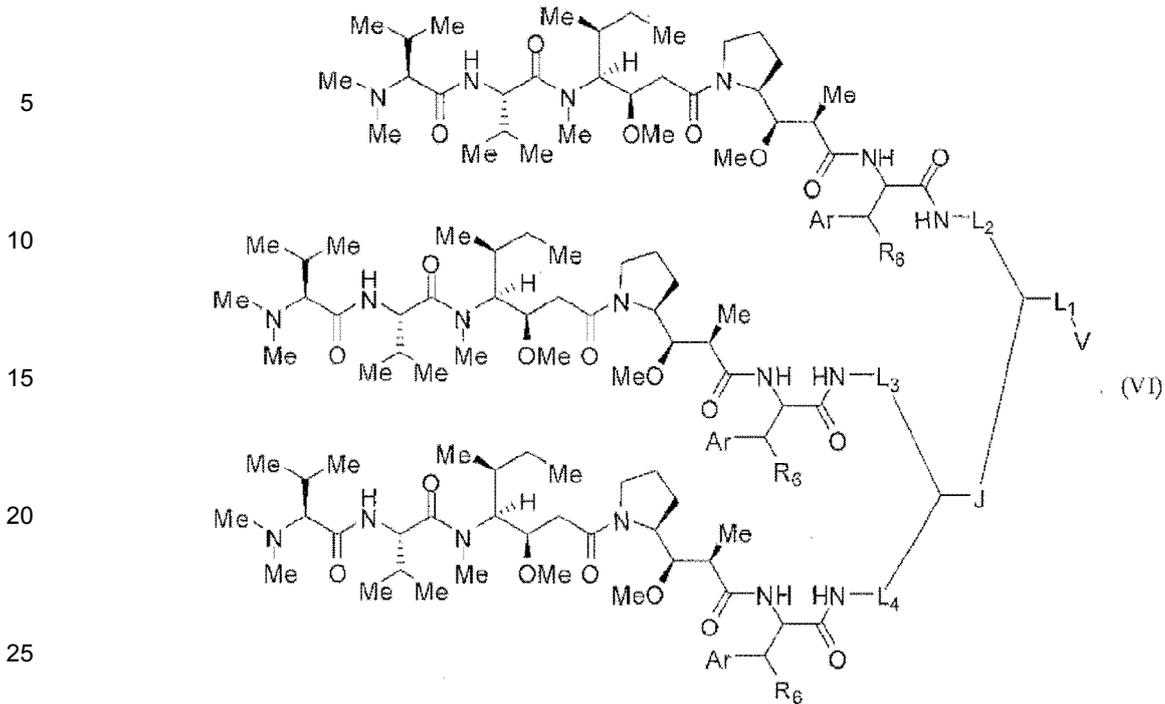
[0212] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada L es independientemente un enlazador escindible o un enlazador no escindible. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada L es independientemente un enlazador derivado de oligo (etilenglicol).

[0213] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), R₇ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), R₇ es hidrógeno.

[0214] En ciertas formas de realización de los compuestos de Fórmula (II), el alquileno es $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (II), cada n, n', n'', n''' y n'''' es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

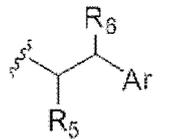
[0215] Tales derivados de enlazadores de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI):





en donde:

Z tiene la estructura de;

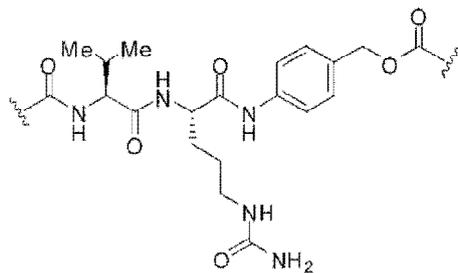


39 R₅ es H, COR₈, alquilo C₁-C₆ o tiazol;
 R₈ es OH;
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

43 R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
 Y es NH₂-O-;
 V es O-NH₂

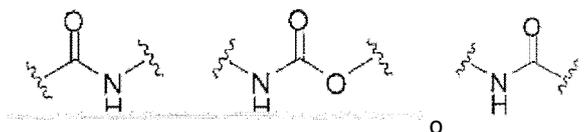
47 L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de ellos enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, alquilenos, -(alquilenos-O)_n-alquilenos-J-, alquilenos'-J-(alquilenos-O)_n-alquilenos-, -J-(alquilenos-O)_n-alquilenos-, -(alquilenos-O)_n-alquilenos-J-(alquilenos-O)_n-alquilenos-J'-, -(alquilenos-O)_n-alquilenos-J-alquilenos'-, -W-, -alquilenos-W-, alquilenos'-J-(alquilenos-NMe)_n-alquilenos-W-, -J-(alquilenos-NMe)_n-alquilenos-W-, -J-alquilenos-NMe-alquilenos'-NMe-alquilenos"-W-, y -alquilenos-J-alquilenos'-NMe-alquilenos"-NMe-alquilenos"-W-;

53 W tiene la estructura de:



cada J y J' independientemente tienen la estructura de:

5



10

y
cada n y n' son independientemente números enteros mayores o iguales a uno.

15

Dichos derivados del enlazador de dolastatina pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse a un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

20

[0216] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R₆ es H. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R^A es fenilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), R₇ es metilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), n y n' son números enteros de 0 a 20. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), n y n' son números enteros de 0 a 10. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) o (VI), n y n' son números enteros de 0 a 5,

25

[0217] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en donde alquileo es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

35

[0218] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R₆ es H. En algunas realizaciones de los compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R₆ es hidroxilo.

40

[0219] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), Ar es fenilo.

[0220] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R₇ es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), R₇ es hidrógeno.

45

[0221] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III) y (V), Y es hidroxilamina, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, amidina, imina, diamina, ceto amina, ceto-alquino, o eno-diona. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (IV) y (VI), V es una hidroxilamina, metilo, aldehído, aldehído protegido, cetona, cetona protegida, tioéster, éster, dicarbonilo, hidrazina, amidina, imina, diamina, cetoamina, ceto-alquino, y eno-diona.

50

[0222] En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII), cada L, L₁, L₂, L₃ y L₄ es independientemente un enlazador escindible o no enlazador escindible. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XIV), (XV), (XVI), (XVII) y (XVIII), cada L, L₁, L₂, L₃ y L₄ es independientemente un enlazador derivatizado de oligo (etilenglicol).

55

[0223] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), cada alquileo, alquileo', alquileo", y alquileo" independientemente es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), alquileo es metileno, etileno, propileno, butilenos, pentileno, hexileno o heptileno.

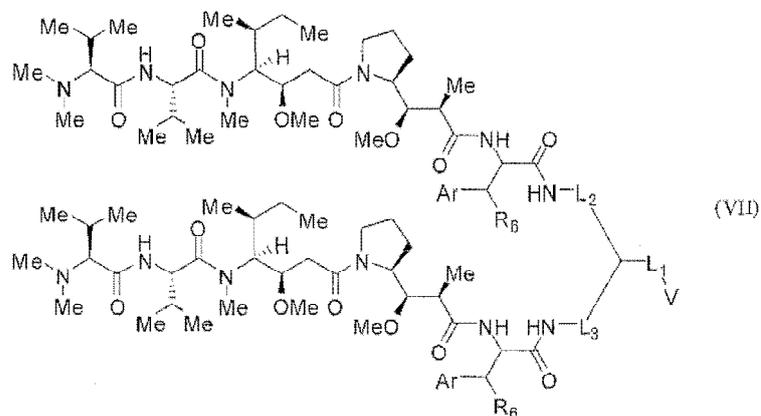
60

65

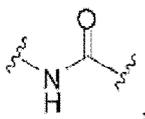
[0224] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (III), (IV), (V) y (VI), cada n y n' independientemente es 0, 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38,

39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 o 100.

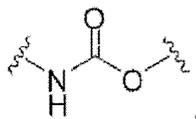
[0225] En ciertas realizaciones, los derivados de enlazador de dolastatina incluyen compuestos que tienen la estructura de Fórmula (VII):



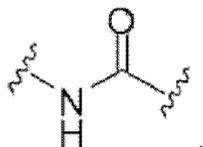
[0226] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VII), L_1 es $-(\text{alquileo-O})_n\text{-alquileo-J-}$, L_2 es $-\text{alquileo}'\text{-J}'\text{-(alquileo-O)}_n\text{'-alquileo-}$, L_3 es $-\text{J}''\text{-(alquileo-O)}_n\text{''-alquileo-}$, alquileo es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, alquileo' es $-(\text{CH}_2)_{4-}$, n es 1, n' y n'' son 3, J tiene la estructura de



J' y J'' tienen la estructura de



y R_7 es metilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VII), L_1 es $-\text{J}(\text{alquileo-O})_n\text{-alquileo-}$, L_2 es $(\text{alquileo-O})_n\text{-alquileo-J}'\text{-alquileo}'\text{-}$, L_3 es $(\text{alquileo-O})_n\text{-alquileo-J}''\text{-}$, alquileo es $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, alquileo' es $(\text{CH}_2)_{4-}$, n es 1, n' y n'' son 4, y J , J' y J'' tienen la estructura de



Dichos derivados del enlazador de dolastatina pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse a un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

[0227] En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I)-(VII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones levemente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I)-(VII) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (I)-(VII) es estable durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son pH_2 a 8.

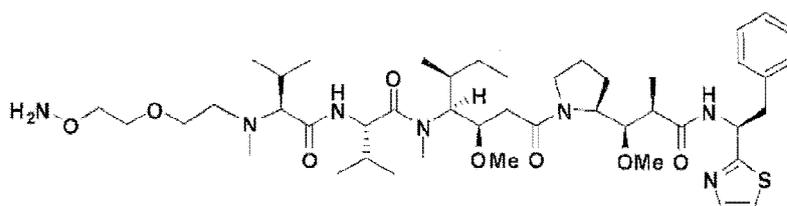
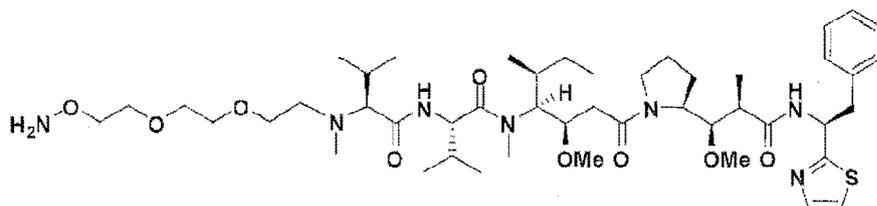
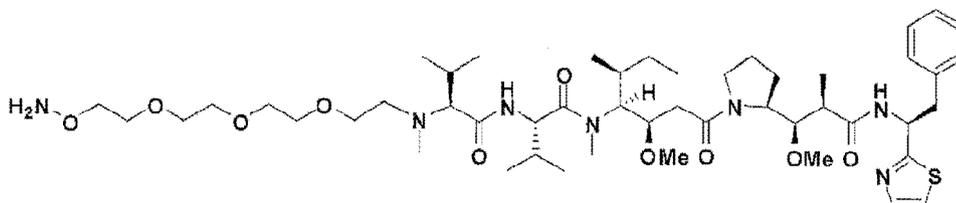
[0228] Los métodos y composiciones proporcionados y descritos en el presente documento incluyen polipéptidos que comprenden un derivado de enlazador de dolastatina que contiene al menos un grupo carbonilo o dicarbonilo, un grupo oxima, un grupo hidroxilamina o formas protegidas o enmascaradas de los mismos. La introducción de al menos un grupo reactivo en un derivado de enlazador de dolastatina puede permitir la aplicación de químicas de conjugación que involucren reacciones químicas específicas, que incluyen, entre otros, uno o más derivados de enlazador de dolastatina, mientras que no reaccionan con los que ocurren comúnmente aminoácidos. Una vez incorporadas, las cadenas laterales derivadas del enlazador de dolastatina también pueden modificarse utilizando metodologías químicas descritas en el presente documento o adecuadas para los grupos funcionales o sustituyentes particulares presentes en el derivado del enlazador de dolastatina.

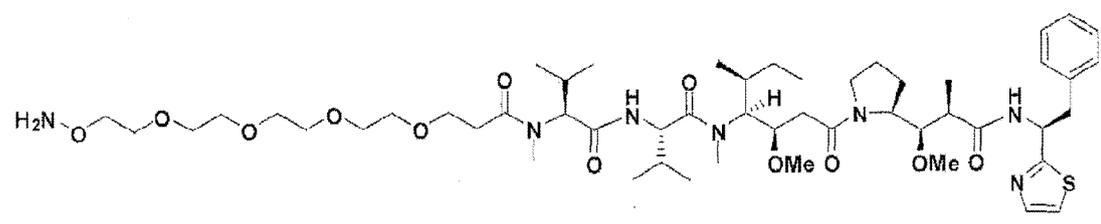
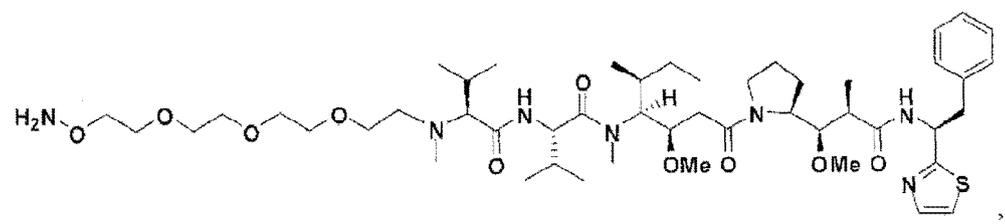
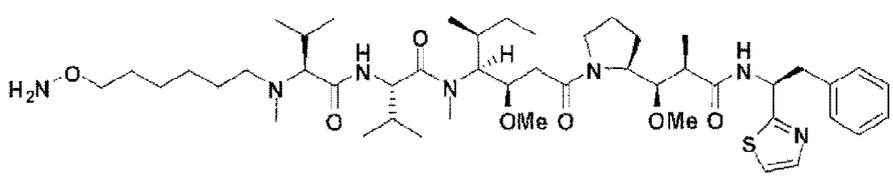
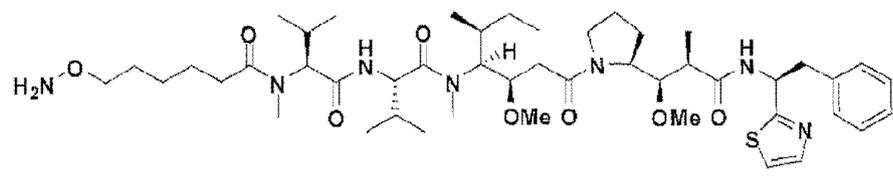
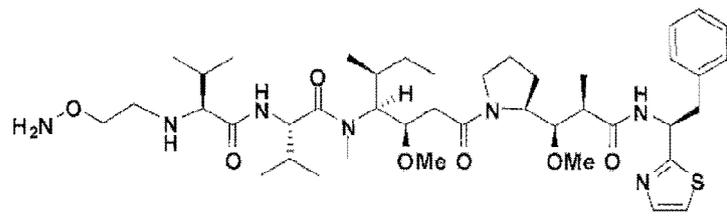
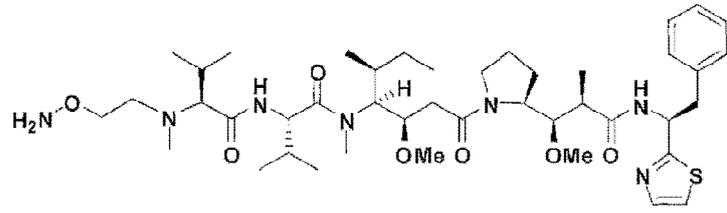
[0229] Los métodos y composiciones derivados del enlazador de dolastatina descritos en el presente documento proporcionan conjugados de sustancias que tienen una amplia variedad de grupos funcionales, sustituyentes o restos, con otras sustancias que incluyen, entre otras, un polímero; un polímero soluble en agua; un derivado de polietilenglicol; una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos.

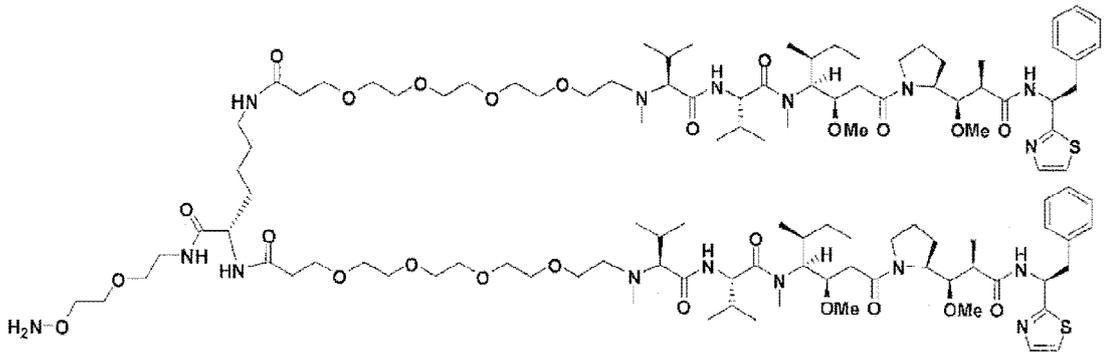
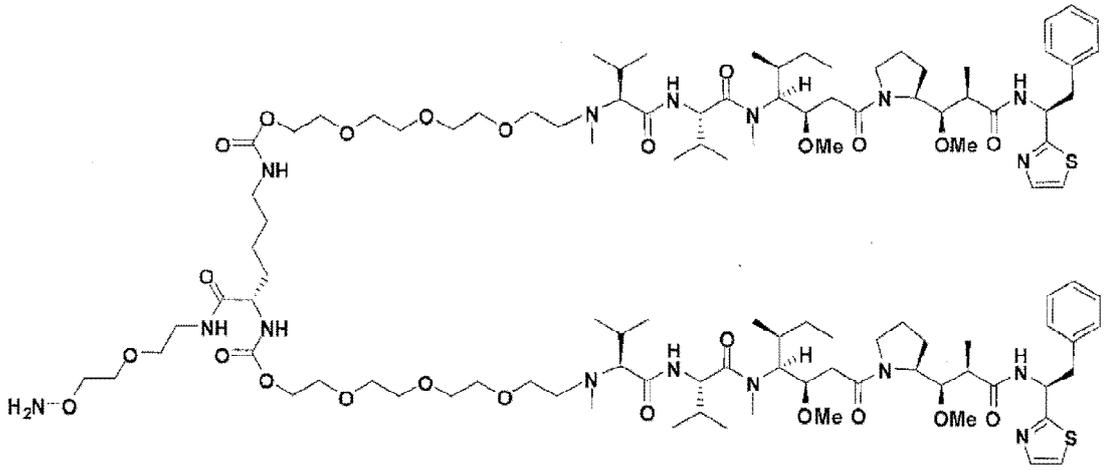
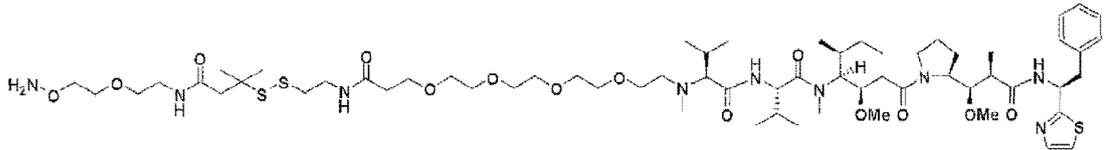
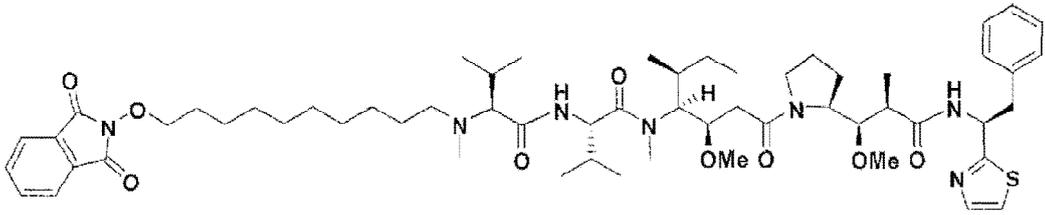
[0230] En ciertas realizaciones, los derivados del enlazador de dolastatina, los enlazadores y los reactivos descritos en el presente documento, incluidos los compuestos de Fórmulas (I)-(VII) son estables en solución acuosa en condiciones levemente ácidas (incluidos, entre otros, pH₂ a 8). En otras realizaciones, tales compuestos son estables durante al menos un mes en condiciones ligeramente ácidas. En otras realizaciones, tales compuestos son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En otras realizaciones, tales compuestos son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas.

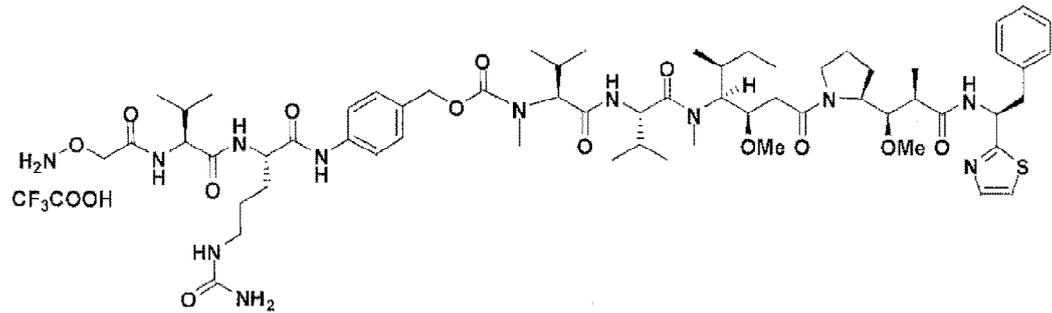
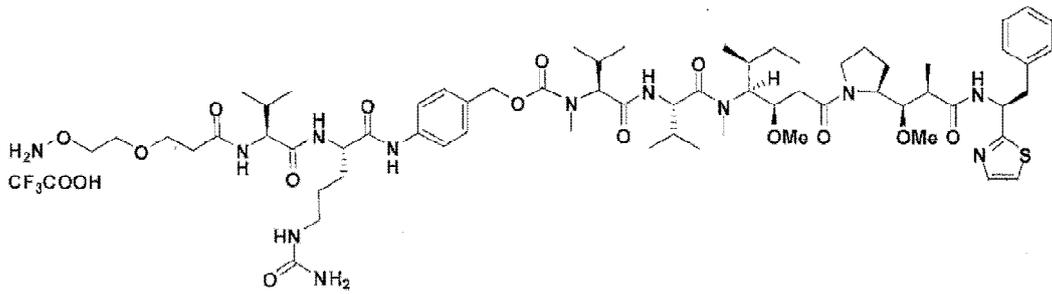
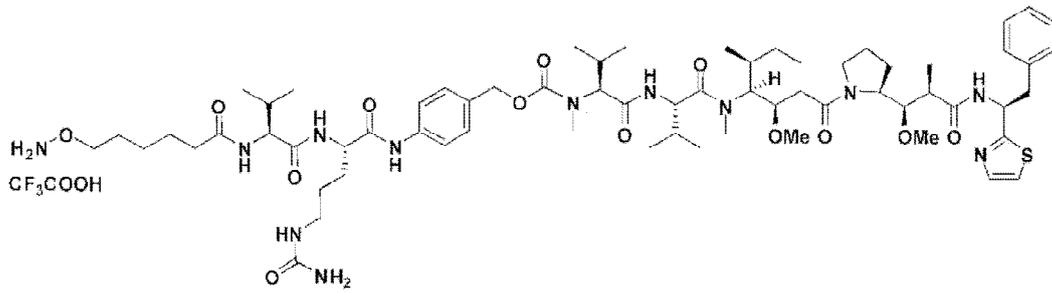
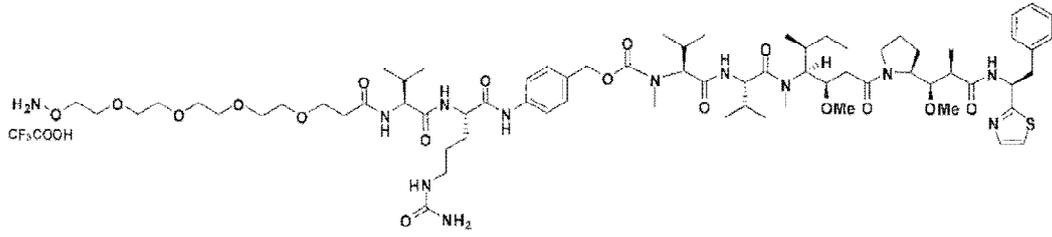
[0231] En otro aspecto de las composiciones, los métodos, las técnicas y las estrategias descritas en el presente documento son métodos para estudiar o utilizar cualquiera de los derivados del enlazador de dolastatina de aminoácidos no naturales "modificados o no modificados" mencionados anteriormente. Se incluyen en este aspecto, solo a modo de ejemplo, los usos terapéuticos, diagnósticos, basados en ensayos, industriales, cosméticos, de biología vegetal, ambientales, de producción de energía, de consumo y/o militares que se beneficiarían de un derivado de dolastatina enlazador que comprende un polipéptido o proteína de aminoácido no natural "modificado o no modificado".

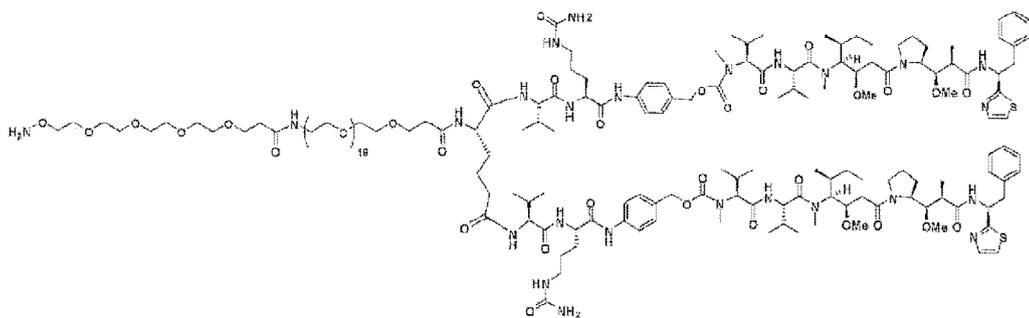
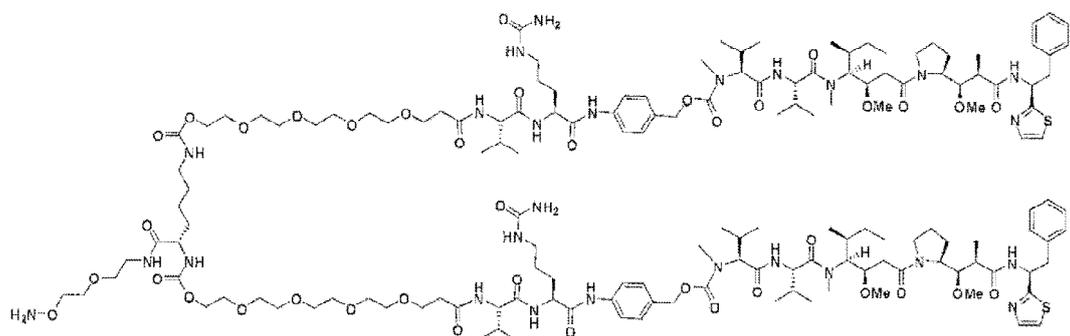
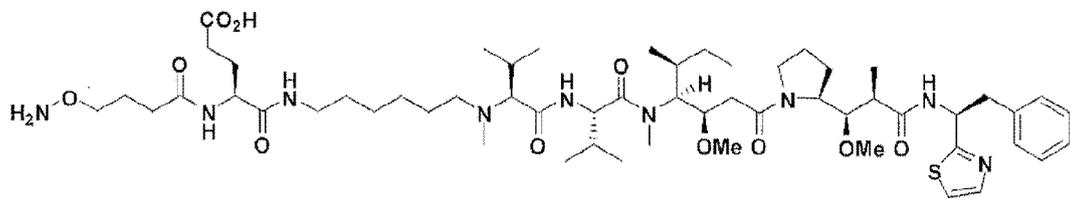
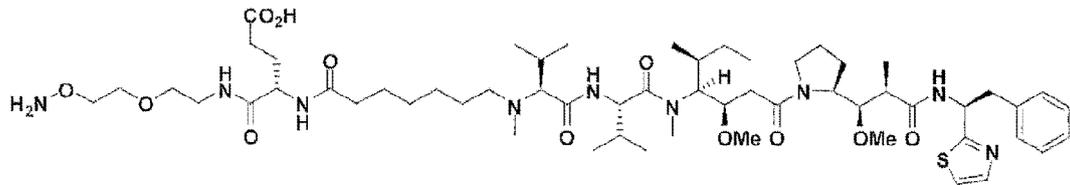
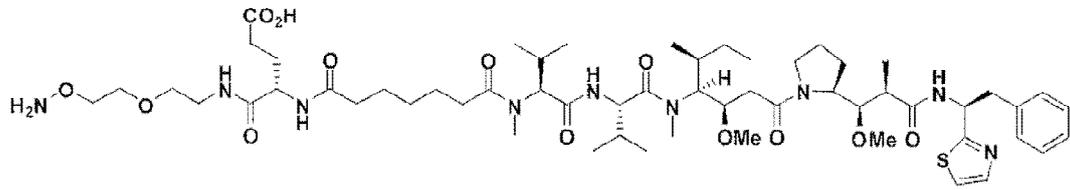
[0232] Los ejemplos no limitantes de derivados de enlazadores de dolastatina incluyen:

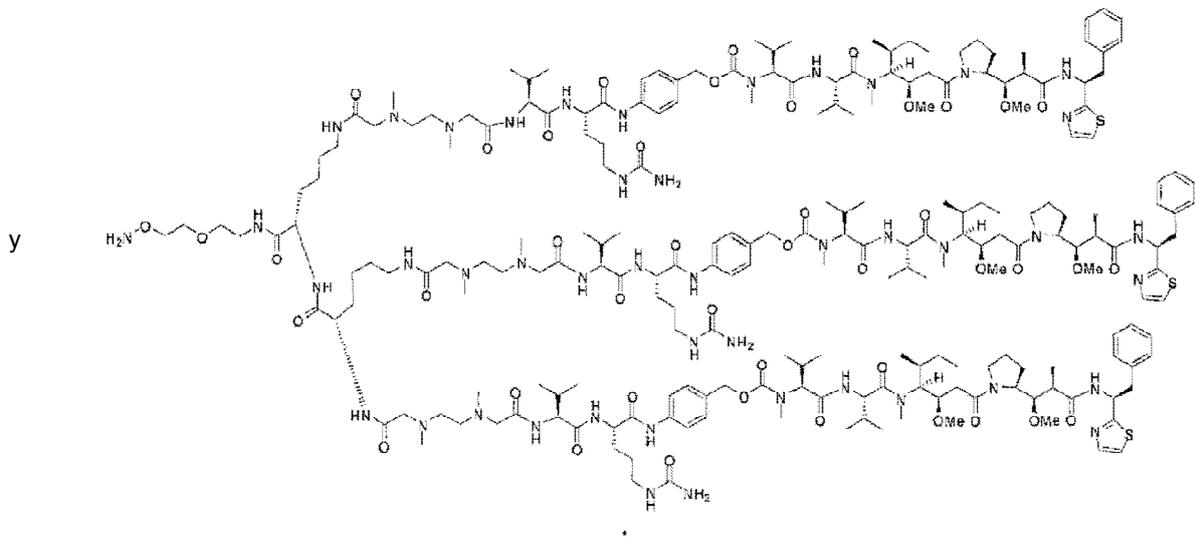
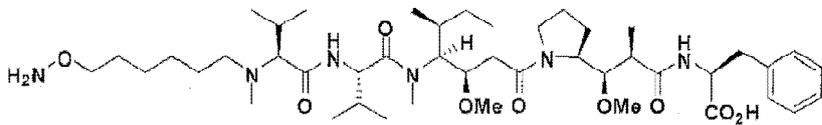
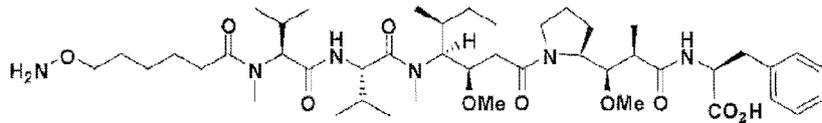
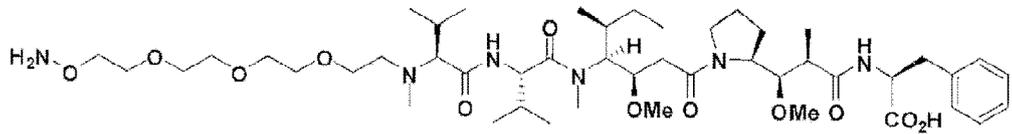
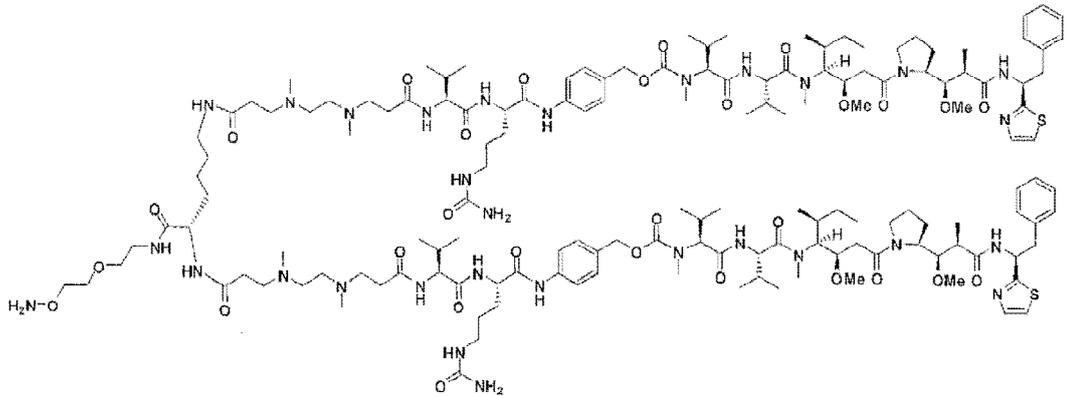




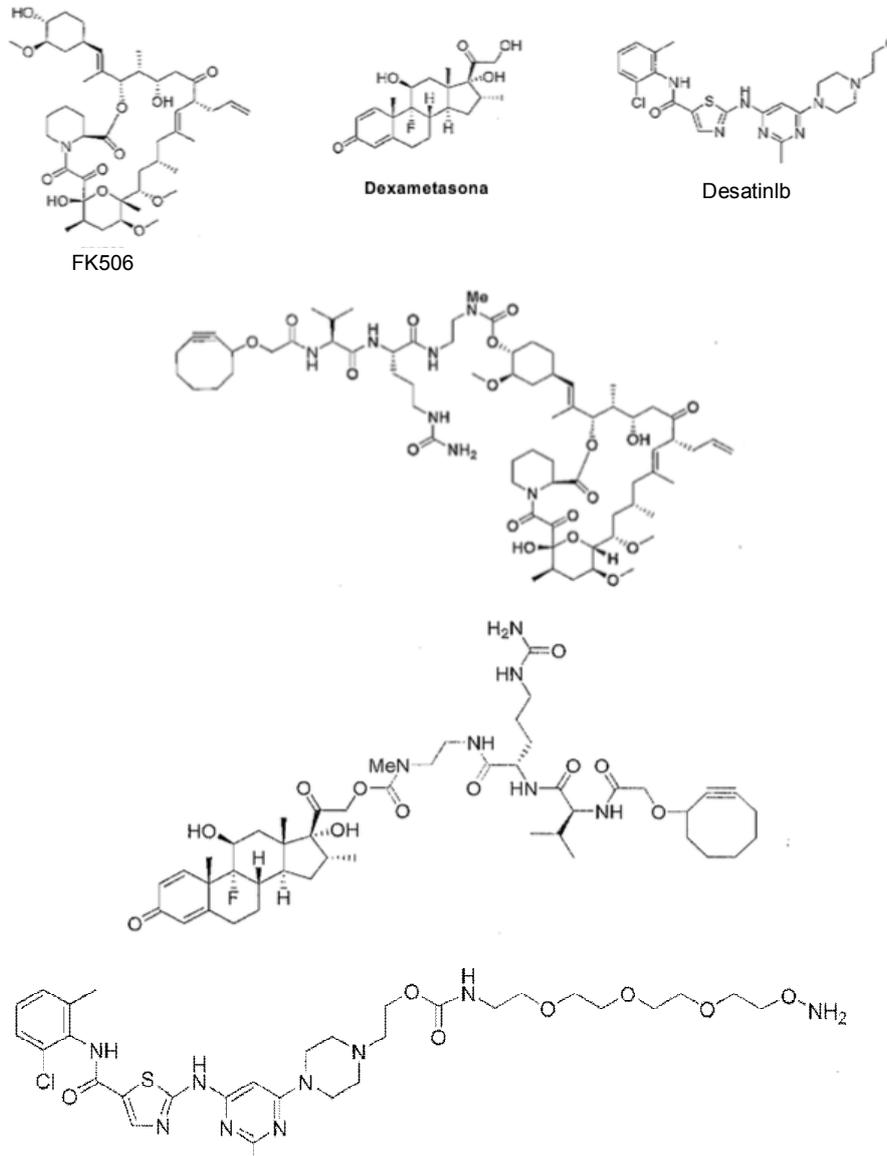








[0233] En otro aspecto de la presente invención, el fármaco conjugado con el anticuerpo anti-CD70 es dexametasona. En otro aspecto de la presente invención, el fármaco conjugado con el anticuerpo anti-CD70 es dasatinib. En otro aspecto de la presente invención, el fármaco conjugado con el anticuerpo anti-CD70 es FK506. En otro aspecto de la presente invención, el fármaco conjugado con el anticuerpo anti-CD70 es un derivado de dexametasona. En otro aspecto de la presente invención, el fármaco conjugado con el anticuerpo anti-CD70 es un derivado de dasatinib. En otro aspecto de la presente invención, el fármaco conjugado con el anticuerpo anti-CD70 es un derivado de FK506.

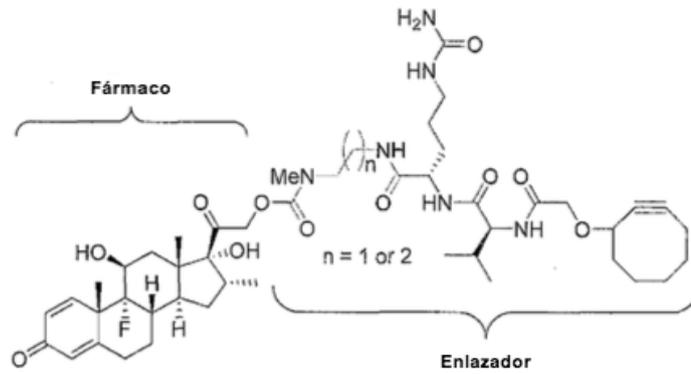


[0234] En otros aspectos de la presente invención, la porción de enlazador-fármaco del conjugado de fármaco con anticuerpo anti-CD70 se elige de uno de los siguientes ejemplos no limitativos:

5

10

15

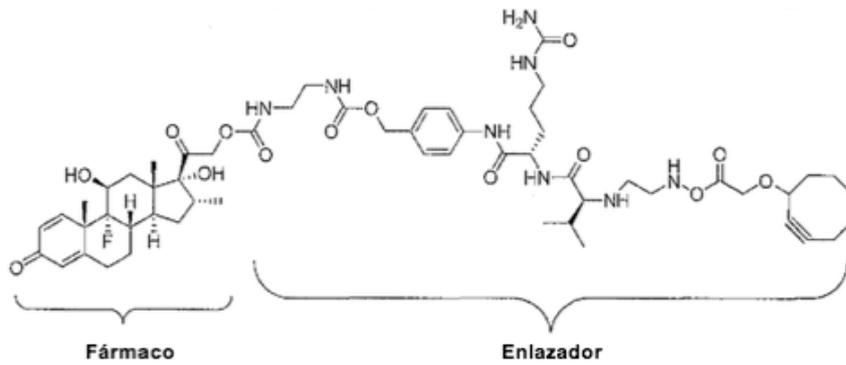


20

25

30

35

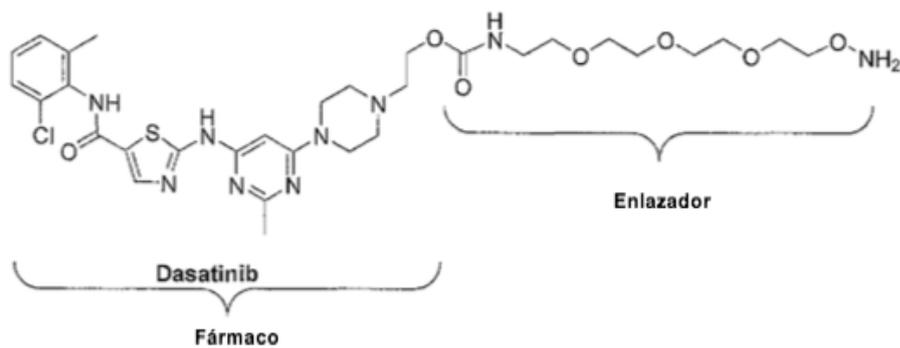


o

40

45

50



55 **IV. Derivados de aminoácidos no naturales**

60 **[0235]** Los aminoácidos no naturales utilizados en los métodos y composiciones descritas en este documento tienen al menos una de las siguientes cuatro propiedades: (1) al menos un grupo funcional en la cadena lateral del aminoácido no natural tiene al menos una característica y/o actividad y/o reactividad ortogonales a la reactividad química de los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente (es decir, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina), o al menos ortogonales a la reactividad química de los aminoácidos naturales presentes en el polipéptido que incluye el aminoácido no natural; (2) los aminoácidos no naturales introducidos son sustancialmente inertes químicamente hacia los 20 aminoácidos comunes codificados genéticamente; (3) el aminoácido no natural puede incorporarse de manera estable en un polipéptido,

preferiblemente con la estabilidad proporcional a los aminoácidos naturales o en condiciones fisiológicas típicas, y además, preferiblemente, dicha incorporación puede ocurrir a través de un sistema *in vivo*; y (4) el aminoácido no natural incluye un grupo funcional oxima o un grupo funcional que puede transformarse en un grupo oxima al reaccionar con un reactivo, preferiblemente en condiciones que no destruyen las propiedades biológicas del polipéptido que incluye el no aminoácido natural (a menos que, por supuesto, tal destrucción de las propiedades biológicas sea el propósito de la modificación/transformación), o donde la transformación pueda ocurrir en condiciones acuosas a un pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, o donde el sitio reactivo en el aminoácido no natural es un sitio electrofílico. Se puede introducir cualquier número de aminoácidos no naturales en el polipéptido. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir oximas protegidas o enmascaradas o grupos protegidos o enmascarados que pueden transformarse en un grupo oxima después de la desprotección del grupo protegido o desenmascaramiento del grupo enmascarado. Los aminoácidos no naturales también pueden incluir grupos carbonilo o dicarbonilo protegidos o enmascarados, que pueden transformarse en un grupo carbonilo o dicarbonilo después de la desprotección del grupo protegido o enmascaramiento del grupo enmascarado y, por lo tanto, están disponibles para reaccionar con las hidroxilaminas o las oximas para formar grupos de oximas.

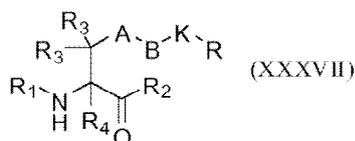
[0236] Los aminoácidos no naturales que pueden usarse en los métodos y composiciones descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos que comprenden aminoácidos con nuevos grupos funcionales, aminoácidos que interactúan de forma covalente o no covalente con otras moléculas, aminoácidos glucosilados tales como una serina sustituida con azúcar, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que contienen ceto, aminoácidos que contienen aldehído, aminoácidos que comprenden polietilenglicol u otros poliéteres, aminoácidos sustituidos con átomos pesados, aminoácidos químicamente escindibles y/o aminoácidos foto-liberables, aminoácidos con cadenas laterales alargadas en comparación con los aminoácidos naturales, incluidos, entre otros, poliéteres o hidrocarburos de cadena larga, incluidos, entre otros, más de aproximadamente 5 o más de aproximadamente 10 carbonos, aminoácidos que contienen azúcares enlazados, aminoácidos activos redox, aminoácidos que contienen amino tioácidos y aminoácidos que comprenden uno o más restos tóxicos.

[0237] En algunas realizaciones, los aminoácidos no naturales comprenden un resto sacárido. Los ejemplos de tales aminoácidos incluyen *N*-acetilo-L-glucosaminilo-L-serina, *N*-acetilo-L-galactosaminilo-L-serina, *N*-acetilo-L-glucosaminilo-L-treonina, *N*-acetilo-L-glucosaminilo L-asparagina y *O*-manosaminilo-L-serina. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen ejemplos en los que el enlace N- u O- que se produce naturalmente entre el aminoácido y el sacárido se reemplaza por un enlace covalente que no se encuentra comúnmente en naturaleza - incluyendo pero no limitado a, un alqueno, una oxima, un tioéter, una amida y similares. Los ejemplos de tales aminoácidos también incluyen sacáridos que no se encuentran comúnmente en proteínas naturales tales como 2-desoxi-glucosa, 2-desoxigalactosa y similares.

[0238] Los restos químicos incorporados en polipéptidos a través de la incorporación de aminoácidos no naturales en tales polipéptidos ofrecen una variedad de ventajas y manipulaciones de polipéptidos. Por ejemplo, la reactividad única de un grupo funcional carbonilo o dicarbonilo (incluido un grupo funcional ceto o aldehído) permite la modificación selectiva de proteínas con cualquiera de una serie de reactivos que contienen hidrazina o hidroxilamina *in vivo* e *in vitro*. Un aminoácido no natural de átomo pesado, por ejemplo, puede ser útil para la eliminación de datos de estructura de rayos X. La introducción específica al sitio de átomos pesados que utilizan aminoácidos no naturales también proporciona selectividad y flexibilidad en la elección de las posiciones para los átomos pesados. Aminoácidos fotorreactivos no naturales (incluidos, entre otros, aminoácidos con benzofenona y arilazidas (incluidas, entre otros, cadenas laterales de fenilazida)), por ejemplo, permiten un eficaz fotointracción *in vivo* e *in vitro* de polipéptidos. Los ejemplos de aminoácidos no naturales fotorreactivos incluyen, pero no se limitan a, *p*-azido-fenilalanina y *p*-benzoilo-fenilalanina. El polipéptido con los aminoácidos no naturales fotorreactivos puede entonces reticularse a voluntad mediante la excitación del control temporal que proporciona el grupo fotorreactivo. En un ejemplo no limitativo, el grupo metilo de un amino no natural se puede sustituir con un marcador isotópico, que incluye pero no se limita a, con un grupo metilo, como una sonda de estructura y dinámica local, que incluye pero no se limita con el uso de resonancia magnética nuclear y espectroscopia vibracional.

A. Estructura y síntesis de los derivados de aminoácidos no naturales: carbonilo, de tipo carbonilo, carbonilo enmascarado y carbonilo protegido.

[0239] Los aminoácidos con un grupo reactivo electrofílico permiten una variedad de reacciones para unir moléculas mediante diversas reacciones químicas, que incluyen, entre otras, reacciones de adición nucleofílica. Dichos grupos reactivos electrofílicos incluyen un grupo carbonilo o dicarbonilo (incluido un grupo ceto o aldehído), un grupo similar a carbonilo o dicarbonilo (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo y es estructuralmente similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo), un grupo enmascarado carbonilo o dicarbonilo enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo carbonilo o dicarbonilo), o un grupo carbonilo protegido o dicarbonilo protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo carbonilo o dicarbonilo tras la desprotección). Tales aminoácidos utilizados en la invención incluyen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVII):



5

10

en donde:

15

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquilenileno inferior, heteroalquilenileno inferior, heterocicloalquilenileno sustituido, heterocicloalquilenileno inferior, heterocicloalquilenileno inferior sustituido, arileno, arileno; heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenileno o aralquilenileno sustituido;

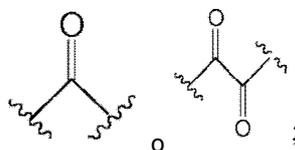
20

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquilenileno inferior, heteroalquilenileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquilenileno o alquilenileno sustituido)-, -S-, -S-(alquilenileno o alquilenileno sustituido)-, -S(O)_K- donde K es 1, 2 o 3, -S(O)_K (alquilenileno o alquilenileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquilenileno o alquilenileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquilenileno o alquilenileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquilenileno o alquilenileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquilenileno o alquilenileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquilenileno o alquilenileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquilenileno o alquilenileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

25

K es

30



35

40

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; cada R" es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido o un grupo protector, o cuando más de un grupo R" está presente, dos R" forman opcionalmente un heterocicloalquilo;

45

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

50

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; y

cada uno de R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

55

o los grupos -A-B-K-R forman juntos un cicloalquilo o heterocicloalquilo bicíclico o tricíclico que comprende al menos un grupo carbonilo, que incluye un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, que incluye un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, que incluye un grupo dicarbonilo enmascarado;

o el grupo -K-R juntos forma un cicloalquilo monocíclico o bicíclico o heterocicloalquilo que comprende al menos un grupo carbonilo, que incluye un grupo dicarbonilo, un grupo carbonilo protegido, que incluye un grupo dicarbonilo protegido, o un grupo carbonilo enmascarado, que incluye un grupo dicarbonilo enmascarado;

60

con la condición de que cuando A sea fenileno y cada R₃ sea H, B esté presente; y que cuando A es -(CH₂)₄- y cada R₃ es H, B no es -NHC(O)(CH₂CH₂)-; y que cuando A y B están ausentes y cada R₃ es H, R no es metilo. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

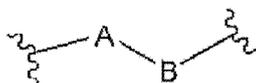
65

[0240] En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (XXXVII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (XXXVII) son

estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (XXXVII) es estable durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8,

5 **[0241]** En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), B es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(R')=N-N(R')-, -N(R')CO-, -C(O)-, -C(R')=N-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)(alquileo o alquileo sustituido)-, o -S(O)₂(alquileo o alquileo sustituido)-. En
 10 ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), B es -O(CH₂)-, -CH=N-, -CH=N-NH-, -NHCH₂-, -NHCO-, -C(O)-, -C(O)-(CH₂)-, -CONH-(CH₂)-, -SCH₂-, -S(=O)CH₂-, o -S(O)₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R es C₁₋₆ alquilo o cicloalquilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R es -CH₃, -CH(CH₃)₂, o ciclopropilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₁ es H, terc-butilxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), N-acetilo, tetrafluoroacetilo (TFA) o bencilxicarbonilo (Cbz).
 15 En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₁ es una resina, aminoácido, polipéptido, anticuerpo o polinucleótido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es OH, O-metilo, O-etilo o O-*t*-butilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es una resina, aminoácido, polipéptido, anticuerpo o polinucleótido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es un polinucleótido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII), R₂ es ácido ribonucleico (ARN).

20 **[0242]** En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (XXXVII),



25 se selecciona del grupo que consiste en:

30 (i) A es alquileo inferior sustituido, arileno C₄, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquienileno inferior, alquienileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R')-, -S(O)₂N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-;

35 (ii) A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior sustituido, arileno C₄, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

40 B es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquienileno inferior, alquienileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R')-, -S(O)₂N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-;

45 (iii) A es alquileo inferior;

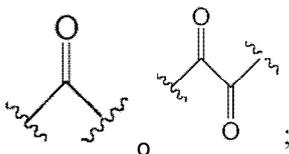
B es opcional, y cuando está presente es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquienileno inferior, alquienileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R')-, -S(O)₂N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-;

50 (iv) A es fenileno;

B es un enlazador divalente seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquienileno inferior, alquienileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -N(R')-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -N(R')C(S)-, -S(O)N(R')-, -S(O)₂N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)N(R')-, -N(R')S(O)₂N(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-;

55 K es

60



cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

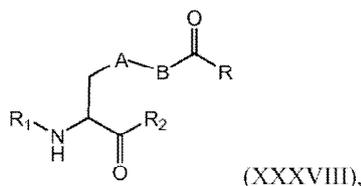
en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; y

cada R₃ y R₄ es independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

[0243] Además, los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXVIII) se incluyen:



en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno inferior, heteroalquileno inferior, heterocicloalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno; heterarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_K- donde K es 1, 2 o 3, -S(O)_K (alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

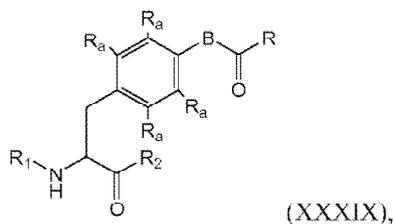
en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

con la condición de que cuando A es fenileno, B está presente; y que cuando A es -(CH₂)₄-, B no es NHC(O)(CH₂CH₂)-; y que cuando A y B están ausentes, R no es metilo. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraduccional.

[0244] Además, los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXIX) se incluyen:



en donde:

15 B es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_K- donde K es 1, 2 o 3, -S(O)_K(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

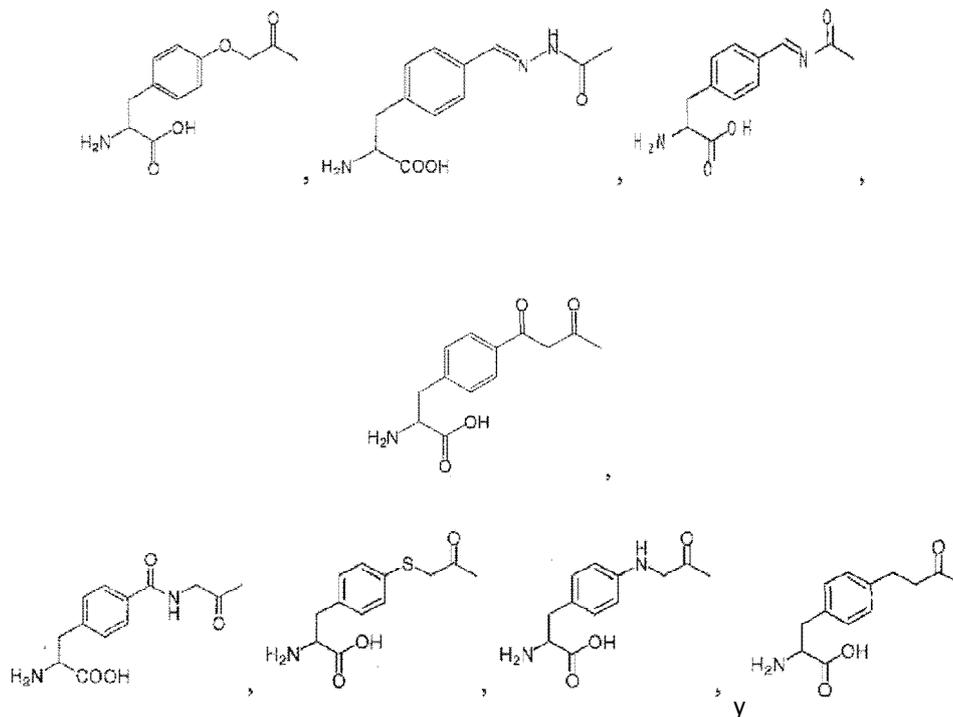
25 en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

30 en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

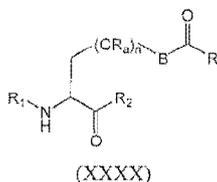
35 cada R^A se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)kR" donde K es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR" y -S(O)_KR", donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraduccional.

[0245] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:



Dichos aminoácidos no naturales pueden ser, opcionalmente, un grupo amino protegido, carboxilo protegido y/o en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente postraduccionamente. modificado.

5 **[0246]** Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXX):



15 en donde

-NS(O)₂-, -OS(O)₂-, opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_K- donde K es 1, 2 o 3, -S(O)_K (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;
 R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,
 en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o
 en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o
 en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;
 35 cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_KR''
 donde K es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_KR'', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8;

40 con la condición de que cuando A es -(CH₂)₄-, B no es NHC(O)(CH₂CH₂)-. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

45 **[0247]** Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

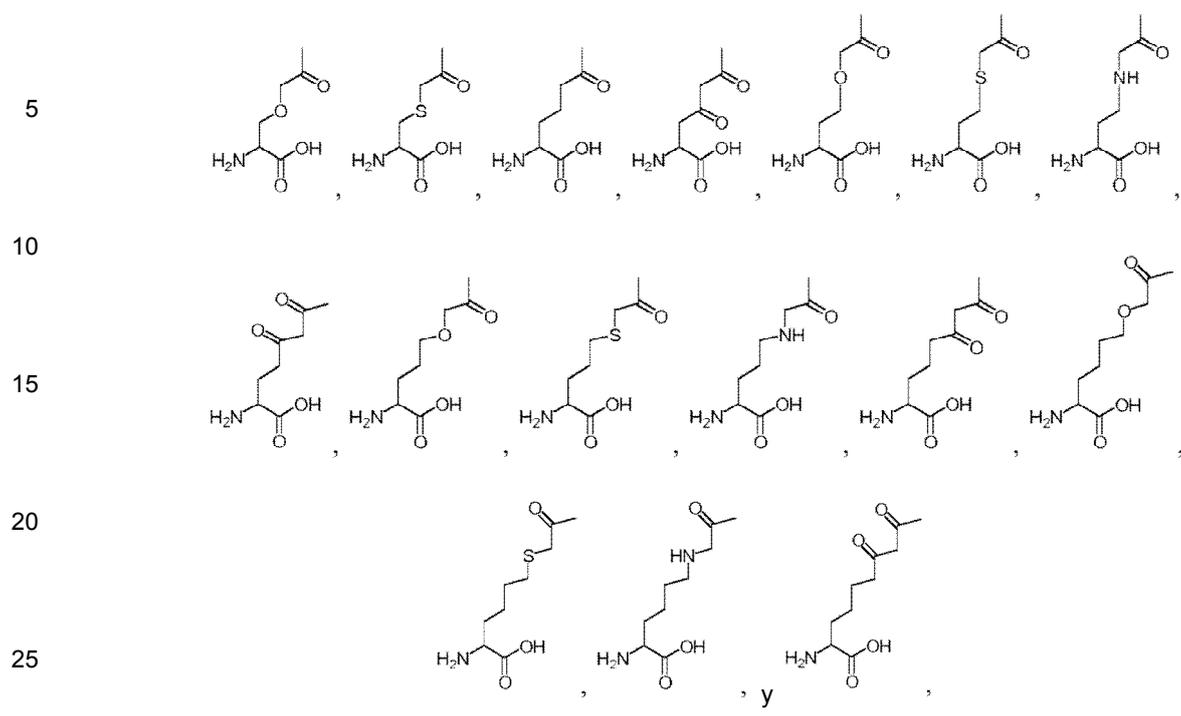
50

55

60

65

66



30 en donde dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo, o una sal de los mismos, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente postraduccionalmente modificado.

35 **[0248]** Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXI):



45 en donde,

50 A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno inferior, heteroalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno; heterarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

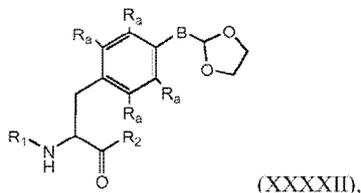
55 B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_K- donde K es 1, 2 o 3, -S(O)_K (alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

60 R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

65 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de

aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraduccional.

[0249] Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXII):



en donde,

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_K- donde K es 1, 2 o 3, -S(O)_K (alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

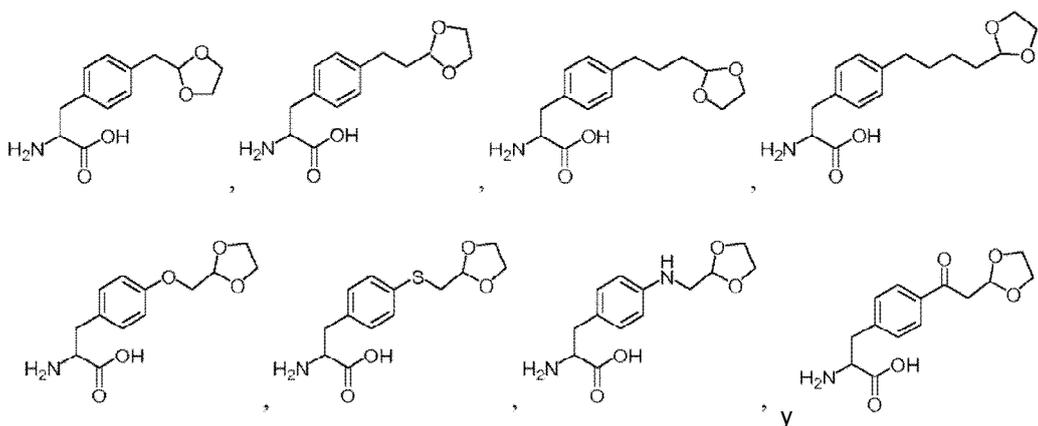
R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

en donde cada R^A se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_KR" donde K es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_KR", donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

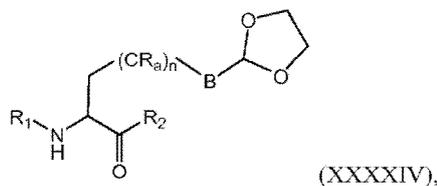
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraduccional.

[0250] Además, se describen los siguientes aminoácidos:



en donde dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo, o una sal de los mismos, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente postraduccionalmente modificado.

[0251] Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXIV):



en donde,

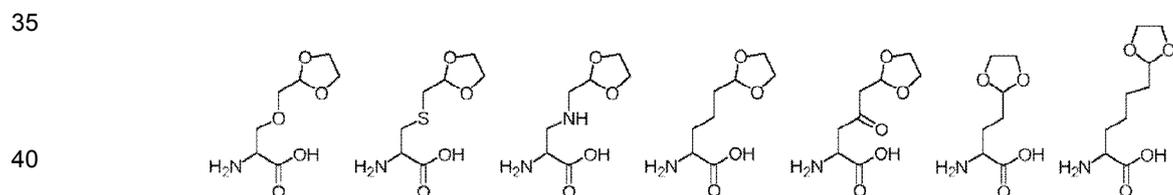
15 B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_K- donde K es 1, 2 o 3, -S(O)_K (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_KN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_KN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

20 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

25 cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂-, -C(O)_KR" donde K es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂-, -OR', y -S(O)_KR", donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8.

30 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

[0252] Además, se describen los siguientes aminoácidos:



y

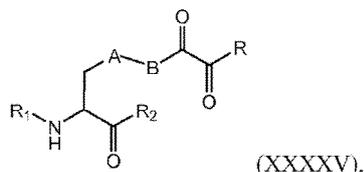


55 en donde dichos compuestos están opcionalmente protegidos con amino, opcionalmente protegidos con carboxilo, opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo, o una sal de los mismos, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente postraduccionalmente modificado.

60 [0253] Además de las estructuras de monocarbonilo, los aminoácidos no naturales descritos aquí pueden incluir grupos tales como dicarbonilo, similares a dicarbonilo, dicarbonilo enmascarado y grupos de dicarbonilo protegidos. Por ejemplo, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXV):

65

5



10

en donde,

15

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquenileno inferior sustituido, alquinileno heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido;

20

heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido; B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

25

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

30

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

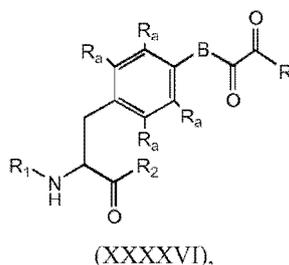
35

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

40

[0254] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVI):

45



50

55

en donde,

60

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k (alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

65

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

5 en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

10 en donde cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma

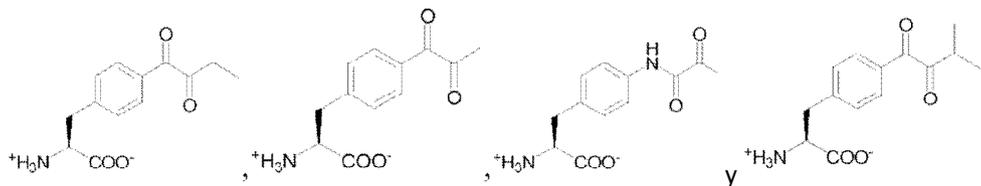
15 postraducciona.

[0255] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos:

20

25

30

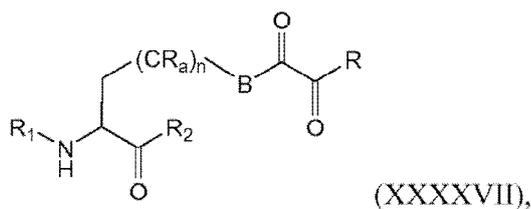


35 en donde tales compuestos están opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo, o una sal de los mismos. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

[0256] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVII):

40

45



50 en donde,

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k (alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -NS(O)₂-, -OS(O)₂-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N-N=, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

60 R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

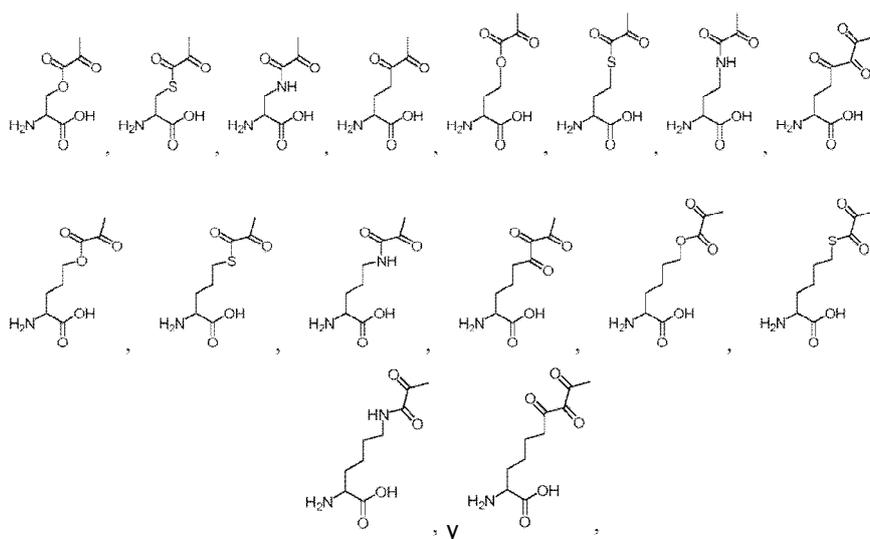
en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

65 en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en este documento el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ donde k es 1, 2 o 3, $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$, y $-S(O)_kR'$, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; y n es 0 a 8,

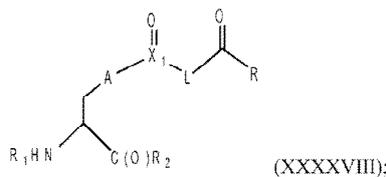
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

[0257] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos



en donde tales compuestos están opcionalmente protegidos con amino y protegidos con carboxilo, o una sal de los mismos, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y opcionalmente modificado postraduccionalmente.

[0258] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXVIII):



en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo inferior, heteroalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno; heterarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R_1 y/o R_2 es un anticuerpo α CD70,

en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

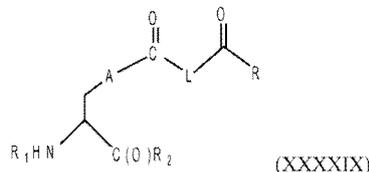
en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

X_1 es C, S o S(O); y L es alquileo, alquileo sustituido, $N(R')$ (alquileo) o $N(R')$ (alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de

aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

[0259] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXIX):



en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquinileno inferior, heteroalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

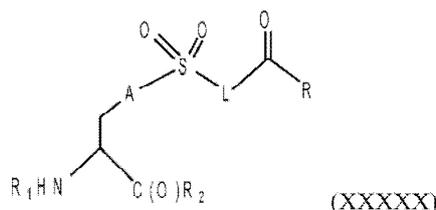
en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R') (alquileo) o N(R') (alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

[0260] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXX):



en donde:

A es opcional, y cuando está presente alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquinileno inferior, heteroalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido; heterarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

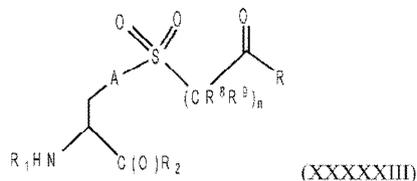
L es alquileo, alquileo sustituido, N(R') (alquileo) o N(R') (alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de

cicloalquilo, o cualquiera de los grupos R_8 adyacentes pueden formar juntos un cicloalquilo.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona

[0263] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXIII):



en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo inferior, heteroalquilenilo inferior, heterocicloalquilenilo sustituido, heterocicloalquilenilo inferior, heterocicloalquilenilo inferior sustituido, arileno sustituido, arileno; heterarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenilo o aralquilenilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R_1 y/o R_2 es un anticuerpo α CD70,

en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

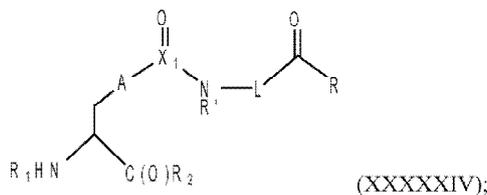
en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

n es 0, 1, 2, 3, 4 o 5; y cada R_8 y R_9 en cada grupo CR_8R_9 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alcoxi, alquilamina, halógeno, alquilo, arilo, o cualquier R_8 y R_9 pueden formar juntos =O o un cicloalquilo, o cualquier grupo R_8 adyacente puede Juntos forman un cicloalquilo.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona

[0264] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXIV):



en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo inferior, heteroalquilenilo inferior, heterocicloalquilenilo sustituido, heterocicloalquilenilo inferior, heterocicloalquilenilo inferior sustituido, arileno, arileno sustituido; heterarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquilenilo o aralquilenilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R_1 y/o R_2 es un anticuerpo α CD70,

en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

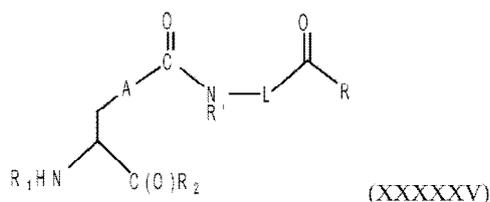
X₁ es C, S o S(O); y L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

5 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona

[0265] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXV):

10

15



en donde:

20

25

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo inferior, heteroalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno sustituido, arileno; heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

30

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

35

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

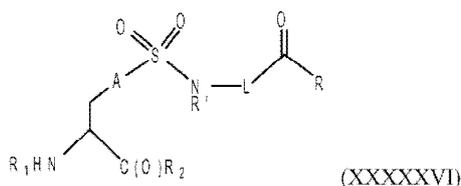
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

40

[0266] Además, se incluyen los siguientes aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXVI):

45

50



en donde:

55

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo inferior, heteroalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno sustituido, arileno; heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

60

R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido;

L es alquileo, alquileo sustituido, N(R')(alquileo) o N(R')(alquileo sustituido), donde R' es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

65

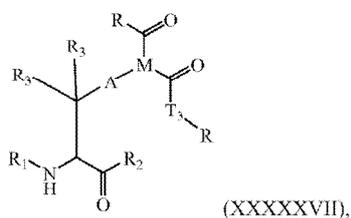
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma

postraduccional.

[0267] Además, se describen los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXVII):

5

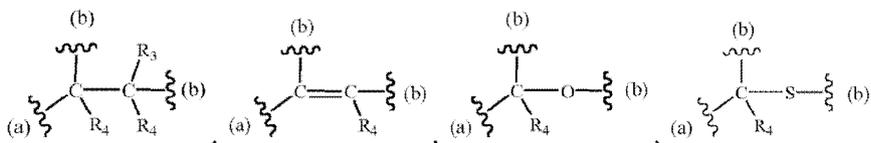
10



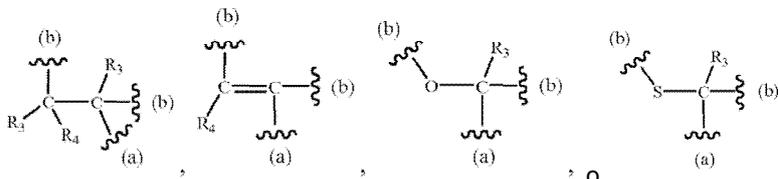
15 en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo inferior, heteroalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior sustituido, arileno sustituido, arileno; heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido; M es $-C(R_3)-$,

25



30



35

40 donde (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los grupos carbonilo respectivos, R_3 y R_4 se eligen independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R_3 y R_4 dos R_3 los grupos o dos grupos R_4 forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; T_3 es un enlace, $C(R)(R)$, O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

45 R_1 es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y R_2 es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido.

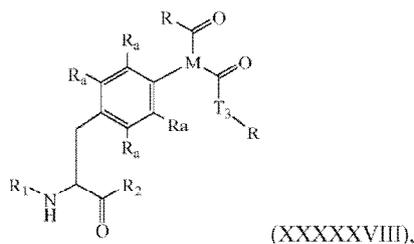
Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraduccional.

50

[0268] Además, se describen aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXVIII):

55

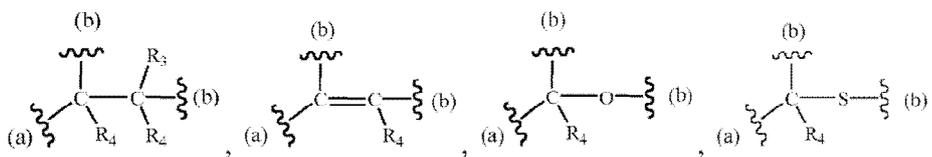
60



65 en donde:

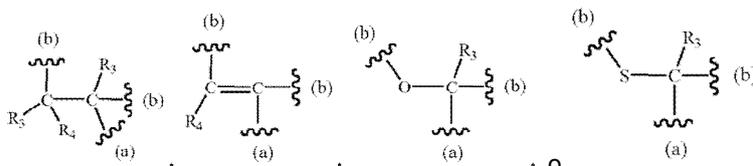
M es -C(R₃)-,

5



10

15



20

donde (a) indica la unión al grupo A y (b) indica la unión a los grupos carbonilo respectivos, R₃ y R₄ se eligen independientemente de H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido, o R₃ y R₄ o dos R₃ los grupos o dos grupos R₄ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

25

R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

30

T₃ es un enlace, C(R)(R), O o S, y R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ es H, un grupo protector de amino, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; y

35

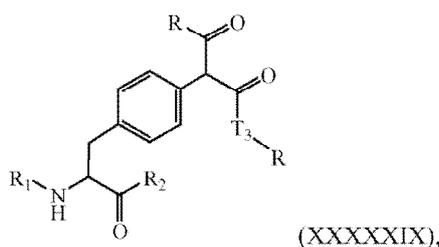
R₂ es OH, un grupo protector de éster, resina, aminoácido, polipéptido o polinucleótido; cada R_a se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, -N(R')₂, -C(O)_kR' donde k es 1, 2 o 3, -C(O)N(R')₂, -OR', y -S(O)_kR', donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

35

[0269] Además, se describen los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXXIX):

40



45

50

en donde:

55

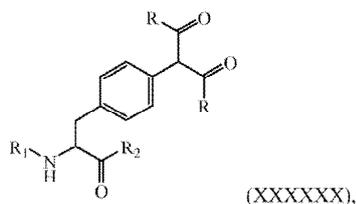
R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido; y T₃ es O, o S.

Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

60

[0270] Además, los aminoácidos que tienen la estructura de Fórmula (XXXXXX) se describen:

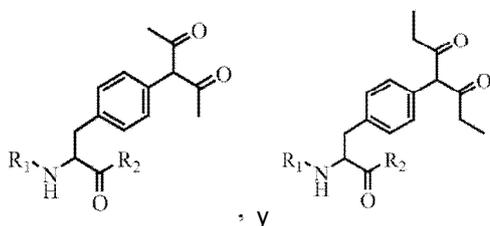
65



en donde:

15 R es H, halógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido.

[0271] Además, se describen los siguientes aminoácidos que tienen estructuras de Fórmula (XXXXXX):



30 Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural, polímero, polisacárido, o un polinucleótido y opcionalmente modificado de forma postraducciona.

35 [0272] La funcionalidad carbonilo o dicarbonilo se puede hacer reaccionar selectivamente con un reactivo que contiene hidroxilamina en condiciones suaves en solución acuosa para formar el enlace de oxima correspondiente que es estable en condiciones fisiológicas. Véase, por ejemplo, Jencks, WP, J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959); Shao, J. y Tam, JP, J. Am. Chem. Soc. 117 (14): 3893-3899 (1995). Además, la reactividad única del grupo carbonilo o dicarbonilo permite la modificación selectiva en presencia de otras cadenas laterales de aminoácidos. Véase, por ejemplo, Cornish, VW, et al., J. Am. Chem. Soc. 118: 8150-8151 (1996); Geoghegan, KF & Stroh, JG, Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Mahal, LK, et al., Science 276: 1125-1128 (1997).

40 [0273] La síntesis de p-acetilo-(+/-)-fenilalanina y m-acetilo-(+/-)-fenilalanina se describe en Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003). Se pueden preparar de manera similar otros aminoácidos que contienen carbonilo o dicarbonilo.

45 [0274] En algunas realizaciones, un polipéptido que comprende un aminoácido no natural se modifica químicamente para generar un grupo funcional reactivo carbonilo o dicarbonilo. Por ejemplo, una funcionalidad aldehído útil para reacciones de conjugación puede generarse a partir de una funcionalidad que tiene grupos amino e hidroxilo adyacentes. Cuando la molécula biológicamente activa es un polipéptido, por ejemplo, se puede usar una serina N-terminal o treonina (que puede estar normalmente presente o expuesta mediante digestión química o enzimática) para generar una funcionalidad aldehído en condiciones de escisión oxidativa suave usando periodato. Véase, por ejemplo, Gaertner, et. al., bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. y Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3: 138-146 (1992); Gaertner y otros, J. Biol. Chem. 269: 7224-7230 (1994). Sin embargo, los métodos conocidos en la técnica están restringidos al aminoácido en el extremo N del péptido o proteína.

50 [0275] Adicionalmente, a modo de ejemplo, un aminoácido no natural que lleva grupos hidroxilo y amino adyacentes puede incorporarse en un polipéptido como una funcionalidad aldehído "enmascarada". Por ejemplo, la 5-hidroxilisina contiene un grupo hidroxilo adyacente a la amina épsilon. Las condiciones de reacción para generar el aldehído típicamente implican la adición de un exceso molar de metaperiodato de sodio en condiciones suaves para evitar la oxidación en otros sitios dentro del polipéptido. El pH de la reacción de oxidación es típicamente alrededor de 7,0. Una reacción típica implica la adición de aproximadamente 1,5 exceso molar de meta periodato de sodio a una solución tamponada del polipéptido, seguida de incubación durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.423.685.

65 **II. Derivados de dolastatina unidos a aminoácidos no naturales**

[0276] En otro aspecto descrito en el presente documento se encuentran métodos, estrategias y técnicas para incorporar al menos uno de tales derivados de enlazadores de dolastatina en un aminoácido no natural. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos derivados de enlazadores de dolastatina que contienen al menos uno de tales aminoácidos no naturales. También se incluyen con este aspecto las composiciones y los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar oligonucleótidos (incluidos el ADN y el ARN) que se pueden usar para producir, al menos en parte, un derivado del enlazador de dolastatina que contiene al menos un aminoácido no natural. También se incluyen con este aspecto composiciones y métodos para producir, purificar, caracterizar y usar células que pueden expresar tales oligonucleótidos que pueden usarse para producir, al menos en parte, un derivado de enlazador de dolastatina que contiene al menos un aminoácido no natural.

[0277] Por lo tanto, los derivados del enlazador de dolastatina que comprenden al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con un grupo carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina se proporcionan y se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones, los derivados del enlazador de dolastatina con al menos un aminoácido no natural o un aminoácido no natural modificado con un grupo carbonilo, dicarbonilo, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina incluyen al menos una modificación postraducciona en alguna posición en el polipéptido. En algunas realizaciones, la modificación co-traducciona o postraducciona se produce a través de la maquinaria celular (por ejemplo, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación del enlace glicolípido y similares), en muchas instancias, tales modificaciones co-traduccionales o postraduccionales basadas en maquinaria celular ocurren en los sitios de aminoácidos de origen natural en el polipéptido, sin embargo, en ciertas realizaciones, las modificaciones co-traduccionales o postraduccionales basadas en maquinaria celular se producen en el (los) sitio(s) de aminoácidos no naturales en el polipéptido.

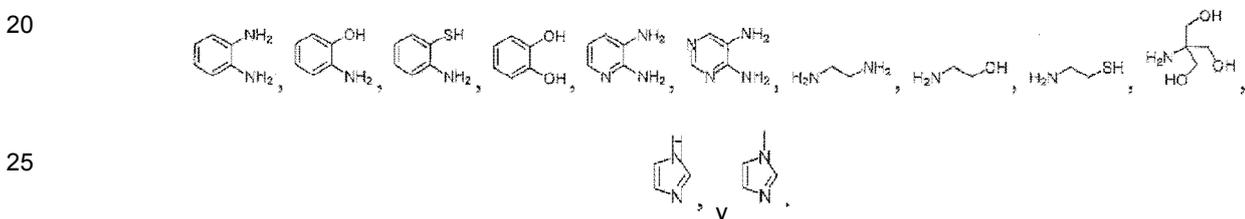
[0278] En otras realizaciones, la modificación postraducciona no utiliza la maquinaria celular, pero la funcionalidad se proporciona en su lugar mediante la unión de una molécula (un polímero, un polímero soluble en agua, un derivado del polietilenglicol, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y cualquier combinación de los mismos, que comprende un segundo grupo reactivo al menos un aminoácido no natural que comprende un primer grupo reactivo (incluidos, entre otros, aminoácidos no naturales que contienen un grupo funcional cetona, aldehído, acetal, hemiacetal, alquino, cicloalquino, azida, oxima o hidroxilamina, que utilizan la metodología química descrita en este documento, u otros adecuados para los grupos reactivos particulares. En ciertas realizaciones, la modificación co-traducciona o postraducciona se realiza *in vivo* en una célula eucariota o en una célula no eucariótica. En ciertas realizaciones, la modificación postraducciona se realiza *in vitro* y no utiliza la maquinaria celular. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos derivados de enlazadores de dolastatina que contienen al menos uno de tales aminoácidos no naturales modificados de forma cotraducciona o postranslaciona.

[0279] También se incluyen dentro del alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en el presente documento reactivos capaces de reaccionar con un derivado enlazador de dolastatina (que contiene un grupo carbonilo o dicarbonilo, grupo oxima, alquino, cicloalquino, azida, grupo hidroxilamina, o formas enmascaradas o protegidas de los mismos) que forma parte de un polipéptido para producir cualquiera de las modificaciones postraduccionales mencionadas anteriormente. En ciertas realizaciones, el derivado de enlace de dolastatina modificado postraducciona resultante contendrá al menos un grupo oxima; el derivado de enlazador de dolastatina que contiene oxima modificado resultante puede sufrir reacciones de modificación subsiguientes. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar dichos reactivos que son capaces de realizar dichas modificaciones postraduccionales de tales derivados de enlazadores de dolastatina.

[0280] En ciertas realizaciones, el polipéptido o derivado de dolastatina unido a aminoácido no natural incluye al menos una modificación co-traducciona o postraducciona que se realiza *in vivo* por una célula huésped, donde la modificación postraducciona normalmente no es realizada por otro tipo de célula huésped. En ciertas realizaciones, el polipéptido incluye al menos una modificación de co-traducciona o postraducciona que se realiza *in vivo* por una célula eucariota, donde la modificación de co-traducciona o postraducciona normalmente no es realizada por una célula no eucariota. Los ejemplos de tales modificaciones co-traduccionales o postraduccionales incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, acetilación, acilación, modificación de lípidos, palmitoilación, adición de palmitato, fosforilación, modificación de enlace de glicolípidos y similares. En una realización, la modificación co-traducciona o postraducciona comprende la unión de un oligosacárido a una asparagina por un enlace GlcNAc-asparagina (que incluye pero no se limita a, donde el oligosacárido comprende (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc, y similares). En otra realización, la modificación co-traducciona o postraducciona comprende la unión de un oligosacárido (incluyendo pero no limitado a, Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc, etc.) a una serina o treonina por GalNAc-serina, GalNAc-treonina, GlcNAc-serina, o un enlace GlcNAc-treonina. En ciertas realizaciones, una proteína o polipéptido puede comprender una secuencia de secreción o localización, una etiqueta de epítipo, una etiqueta FLAG, una etiqueta de polihistidina, una fusión con GST y/o similares. También se incluyen con este aspecto los métodos para producir, purificar, caracterizar y usar tales polipéptidos que contienen al menos una de tales modificaciones co-traduccionales o postraduccionales. En otras realizaciones, el polipéptido de aminoácido no natural glicosilado se produce en una forma no glicosilada. Dicha forma no glicosilada de un aminoácido no natural glicosilado se puede producir mediante métodos que incluyen la eliminación química o enzimática de grupos oligosacáridos de un

5 polipéptido de aminoácido no natural glicosilado aislado o sustancialmente purificado o no purificado; La producción de un aminoácido no natural en un huésped que no glicosila tal como un polipéptido de aminoácido no natural (como un huésped que incluye, procariontas o eucariotas modificados o mutados para no glicosilar dicho polipéptido), la introducción de un inhibidor de glicosilación en el medio de cultivo celular en el que un polipéptido de aminoácido no natural está siendo producido por un eucariota que normalmente glicosilaría tal polipéptido, o una combinación de cualquiera de tales métodos. También se describen en el presente documento tales formas no glicosiladas de polipéptidos de aminoácidos no naturales normalmente glicosilados (glicosilado normalmente significa un polipéptido que se glicosilaría cuando se produjera en condiciones en las que los polipéptidos naturales se glicosilan). Por supuesto, tales formas no glicosiladas de polipéptidos de aminoácidos no naturales normalmente glicosilados (o de hecho cualquier polipéptido descrito en el presente documento) pueden estar en una forma no purificada, una forma sustancialmente purificada o en una forma aislada.

15 **[0281]** En ciertas realizaciones, el polipéptido de aminoácido no natural incluye al menos una modificación postraducciona que se realiza en presencia de un acelerante, en el que la modificación postraducciona es estequiométrica, similar a la estequiométrica, o casi estequiométrica. En otras realizaciones, el polipéptido se pone en contacto con un reactivo de Fórmula (XIX) en presencia de un acelerante. En otras realizaciones, el acelerante se selecciona del grupo que consiste en:



30 **A. Síntesis química de derivados de dolastatina unidos a aminoácidos no naturales: derivados de dolastatina enlazados que contienen oxima**

35 **[0282]** Los derivados unidos a dolastatina de aminoácidos no naturales que contienen un grupo oxima permiten la reacción con una variedad de reactivos que contienen ciertos grupos carbonilo o dicarbonilo reactivos (incluidos, entre otros, cetonas, aldehídos u otros grupos con reactividad similar)) para formar nuevos aminoácidos no naturales que comprenden un nuevo grupo oxima. Tal reacción de intercambio de oxima permite una mayor funcionalización de los derivados unidos a dolastatina. Además, el derivado original enlazado a dolastatina que contiene un grupo oxima puede ser útil por sí mismo siempre que el enlace oxima sea estable en las condiciones necesarias para incorporar el aminoácido en un polipéptido (por ejemplo, los métodos sintéticos *in vivo*, *in vitro* y químicos aquí descritos).

45 **[0283]** Por lo tanto, en ciertas realizaciones descritas aquí están aminoácidos no naturales unidos a derivados de dolastatina con cadenas laterales que comprenden un grupo oxima, un grupo similar a la oxima (que tiene una reactividad similar a un grupo oxima y es estructuralmente similar a un grupo oxima), un grupo oxima enmascarado (que se puede convertir fácilmente en un grupo oxima), o un grupo oxima protegido (que tiene una reactividad similar a un grupo oxima en caso de desprotección).

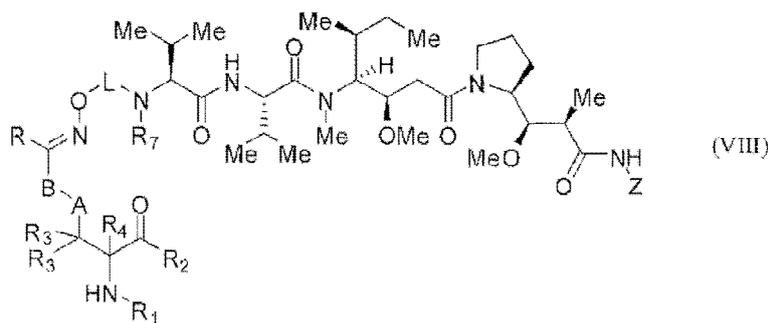
50 **[0284]** Tales derivados de aminoácidos no naturales unidos a dolastatina incluyen derivados unidos a dolastatina que tienen la estructura de Fórmula (VIII) o (IX):

55

60

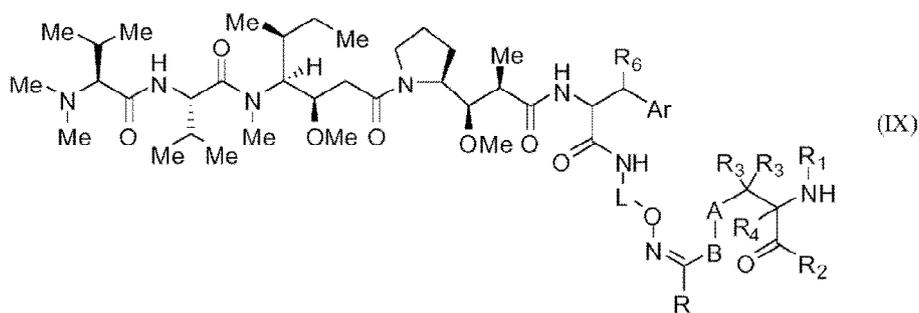
65

5



10

15



20

25

30 en donde:

35

A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno inferior, heteroalquileno inferior, heterocicloalquileno sustituido, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno sustituido, arileno; heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

40

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k (alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido; R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

45

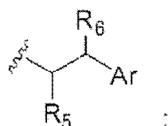
50

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo anti-CD70 (αCD70), en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

55

R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo; Z tiene la estructura de:

60



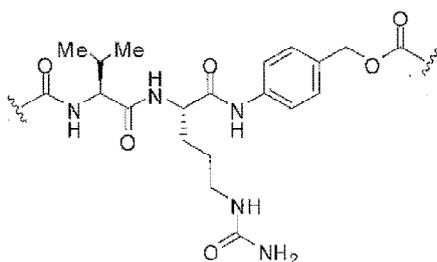
65

R₈ es H, COR₈, alquilo C₁-C₆ o tiazol;
 R₈ es OH
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

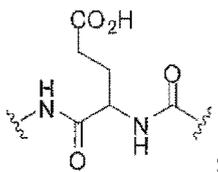
R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

L es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en -alquileo-, -alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_n-NHC(O)-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, -alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-C(O)-, y -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-;

W tiene la estructura de:



U tiene la estructura de:



y cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno;

o un metabolito activo, o un profármaco o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0285] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₆ es H. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R_a es fenilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₇ es metilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), n es un número entero de 0 a 20. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), n es un número entero de 0 a 10. En ciertas En realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), n es un número entero de 0 a 5,

[0286] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo, en ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en donde el alquileo es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

[0288] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₆ es H.

[0289] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), Ar es fenilo.

[0290] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₇ es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), R₇ es hidrógeno.

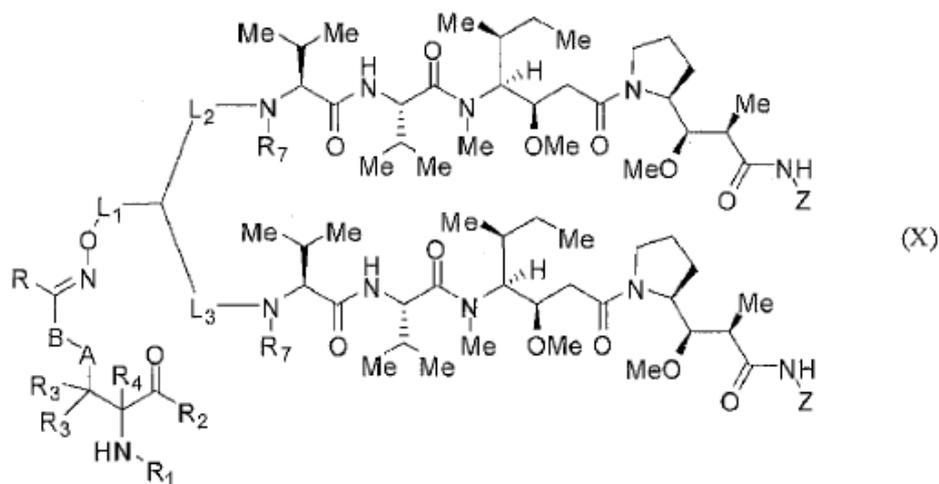
[0291] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), cada L es independientemente un enlazador escindible o un enlazador no escindible. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), cada L es independientemente un enlazador derivado de oligo (etilenglicol).

[0292] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), cada alquileo, alquileo', alquileo", y alquileo''' independientemente es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno,

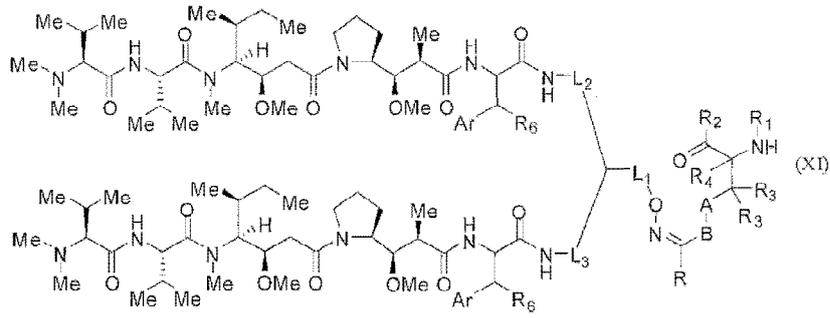
[0293] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) y (IX), cada n, n', n'', n''' y n'''' independientemente es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

[0294] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) o (IX), R₁ es un polipéptido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) o (IX), R₂ es un polipéptido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) o (IX), el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (VIII) o (IX), el anticuerpo es herceptina.

[0295] Dichos aminoácidos no naturales unidos a dolastatina incluyen derivados unidos a dolastatina que tienen la estructura de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII):



5



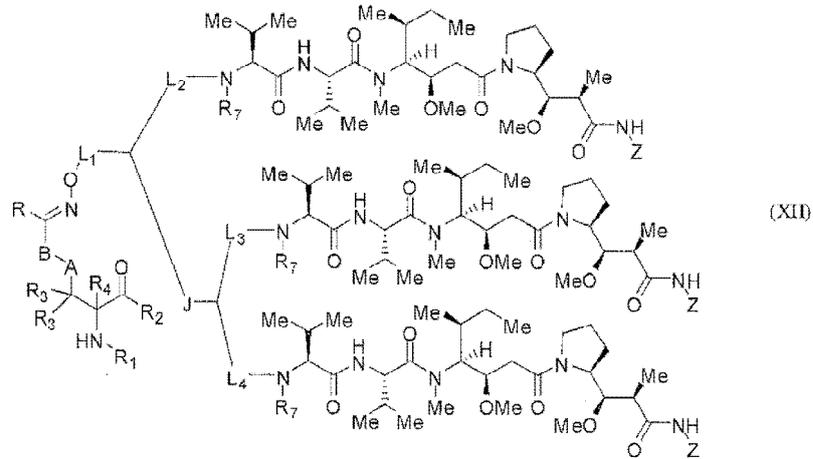
10

15

20

25

30



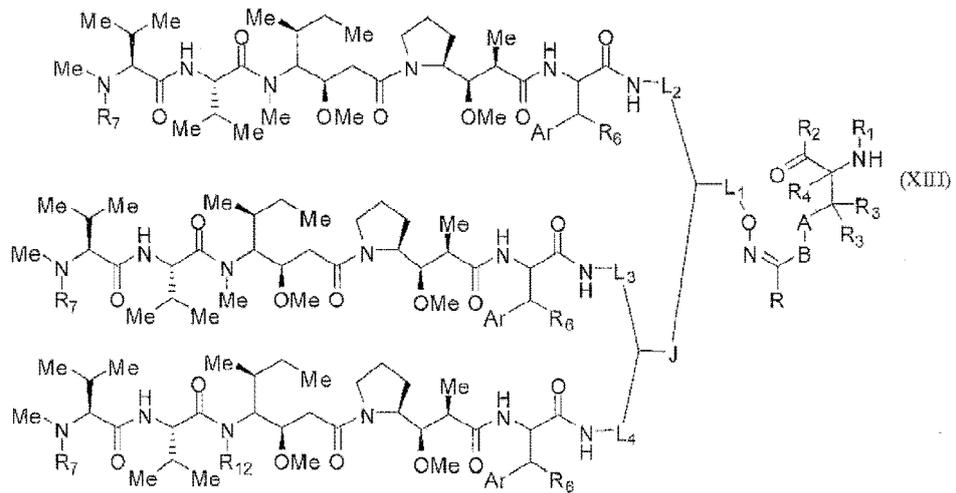
35

40

45

50

55



60

en donde:

65

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo inferior, heteroalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo inferior

sustituido, arileno sustituido, arileno; heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k (alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')=N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

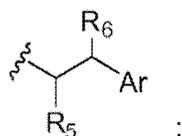
en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

Z tiene la estructura de:



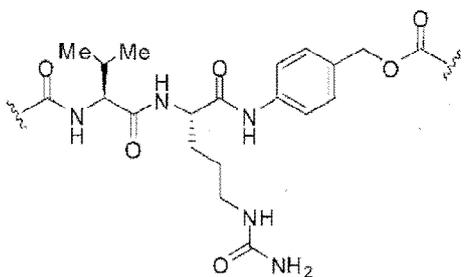
R₅ es H, CO₂H, alquilo C₁-C₆ o tiazol;

R₆ es OH o H;

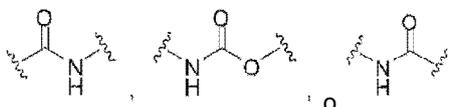
Ar es fenilo o piridina;

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de ellos enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, alquileno, -(alquileno-O)_n-alquileno-J-, alquileno'-J-(alquileno-O)_n-alquileno-, -J-(alquileno-O)_n-alquileno-, -(alquileno-O)_n-alquileno-J-(alquileno-O)_n-alquileno-J-, -(alquileno-O)_n-alquileno-J-alquileno', -W-, -alquileno-W-, alquileno'-J-(alquileno-NMe)_n-alquileno-W-, -J-(alquileno-NMe)_n-alquileno-W-, -J-alquileno-NMe-alquileno'-NMe-alquileno'-W-, y -alquileno-J-alquileno'-NMe-alquileno'-NMe-alquileno'-W-; W tiene la estructura de:



cada J y J' independientemente tienen la estructura de:



y

cada n y n' son independientemente números enteros mayores o iguales a uno.

[0296] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es tiazol o ácido carboxílico. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₆ es H. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), Ar es fenilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₇ es metilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), n y n' son números enteros de 0 a 20. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), n y n' son números enteros de 0 a 10. En ciertas realizaciones de los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), n y n' son números enteros de 0 a 5.

[0297] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es tiazol. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es hidrógeno. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en donde el alquileo es -CH₂-, -CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

[0298] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₅ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂, en donde n es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

[0299] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₆ es H. En algunas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₆ es hidroxilo.

[0300] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), Ar es fenilo.

[0301] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₇ es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, pentilo o hexilo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₇ es hidrógeno.

[0302] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), cada L₁, L₂, L₃ y L₄ es independientemente un enlazador escindible o un enlazador no escindible. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), cada L₁, L₂, L₃ y L₄ es independientemente un enlazador derivado de oligo (etilenglicol).

[0303] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), cada alquileo, alquileo', alquileo" y alquileo" independientemente es -CH₂-, -CH₂CH₂-CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-, o -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-. En ciertas realizaciones de compuestos de fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), alquileo es metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno o heptileno.

[0304] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), cada n y n' independientemente es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

[0305] En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₁ es un polipéptido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), R₂ es un polipéptido. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), el polipéptido es un anticuerpo. En ciertas realizaciones de compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII), el anticuerpo es herceptina.

[0306] En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) son estables en solución acuosa durante al menos 1 mes en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) son estables durante al menos 2 semanas en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, el compuesto de Fórmula (X), (XI), (XII) o (XIII) son estables durante al menos 5 días en condiciones ligeramente ácidas. En ciertas realizaciones, tales condiciones ácidas son pH 2 a 8. Dichos aminoácidos no naturales pueden estar en forma de una sal, o pueden incorporarse en un polipéptido de aminoácido no natural,

polímero, polisacárido o un polinucleótido y, opcionalmente, se pueden modificar posteriormente.

[0307] Los aminoácidos no naturales basados en oxima pueden sintetizarse mediante métodos ya descritos en la técnica, o mediante los métodos descritos en el presente documento, que incluyen: (a) reacción de un aminoácido no natural que contiene hidroxilamina con un carbonilo o dicarbonilo -con reactivo; (b) reacción de un aminoácido no natural que contiene carbonilo o dicarbonilo con un reactivo que contiene hidroxilamina; o (c) reacción de un aminoácido no natural que contiene oxima con ciertos reactivos que contienen carbonilo o dicarbonilo.

VI. Localización de aminoácidos no naturales en derivados de enlazador de dolastatina

[0308] Los métodos y composiciones descritas en este documento incluyen la incorporación de uno o más aminoácidos no naturales en un derivado enlazador de dolastatina. Se pueden incorporar uno o más aminoácidos no naturales en una o más posiciones particulares que no interrumpen la actividad del derivado enlazante de dolastatina. Esto se puede lograr haciendo sustituciones "conservativas", que incluyen, entre otras, la sustitución de aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrófobos no naturales o naturales, aminoácidos voluminosos con aminoácidos voluminosos no naturales o naturales, aminoácidos hidrófilos con aminoácidos no hidrófilos (aminoácidos naturales o hidrófilos naturales) y/o la inserción del aminoácido no natural en una ubicación que no se requiere para la actividad.

[0309] Se puede emplear una variedad de enfoques bioquímicos y estructurales para seleccionar los sitios deseados para la sustitución con un aminoácido no natural dentro del derivado enlazante de dolastatina. En algunas realizaciones, el aminoácido no natural está unido en el extremo C del derivado de dolastatina. En otras realizaciones, el aminoácido no natural está unido en el extremo N del derivado de dolastatina. Cualquier posición del derivado del enlazador de dolastatina es adecuada para que la selección incorpore un aminoácido no natural, y la selección puede basarse en un diseño racional o por selección aleatoria para uno o ningún propósito particular deseado. La selección de los sitios deseados se puede basar en la producción de un polipéptido de aminoácido no natural (que puede modificarse aún más o permanecer sin modificar) que tenga cualquier propiedad o actividad deseada, incluyendo pero

no se limita a un modulador de unión al receptor, moduladores de la actividad del receptor, moduladores de la unión a los pares aglutinantes, moduladores de la actividad del compañero de unión, moduladores de la conformación del compañero de unión, formación de dímeros o multímeros, ningún cambio en la actividad o propiedad en comparación con la molécula nativa, o la manipulación de cualquier componente físico o propiedad química del polipéptido como la solubilidad, agregación o estabilidad. Alternativamente, los sitios identificados como críticos para la actividad biológica también pueden ser buenos candidatos para la sustitución con un aminoácido no natural, de nuevo dependiendo de la actividad deseada buscada para el polipéptido. Otra alternativa sería simplemente hacer sustituciones en serie en cada posición en la cadena polipeptídica con un aminoácido no natural y observar el efecto sobre las actividades del polipéptido. Cualquier medio, técnica o método para seleccionar una posición para la sustitución con un aminoácido no natural en cualquier polipéptido es adecuado para uso en los métodos, técnicas y composiciones descritas en el presente documento.

[0310] La estructura y la actividad de los mutantes de origen natural de un polipéptido que contienen delecciones también se pueden examinar para determinar las regiones de la proteína que probablemente toleren la sustitución con un aminoácido no natural. Una vez que se hayan eliminado los residuos que probablemente sean intolerantes a la sustitución con aminoácidos no naturales, el impacto de las sustituciones propuestas en cada una de las posiciones restantes se puede examinar utilizando métodos que incluyen, entre otros, la estructura tridimensional de la estructura polipéptido relevante, y cualquier ligando asociado o proteínas de unión. Las estructuras cristalográficas de rayos X y RMN de muchos polipéptidos están disponibles en el Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org), una base de datos centralizada que contiene datos estructurales tridimensionales de grandes moléculas de proteínas y ácidos nucleicos, se puede emplear uno que identifique las posiciones de los aminoácidos que se pueden sustituir con aminoácidos no naturales. Además, se pueden hacer modelos investigando la estructura secundaria y terciaria de los polipéptidos, si no se dispone de datos estructurales tridimensionales. Por lo tanto, la identidad de las posiciones de aminoácidos que pueden sustituirse por aminoácidos no naturales se puede obtener fácilmente.

[0311] Los sitios ejemplares de incorporación de un aminoácido no natural incluyen, pero no se limitan a, aquellos que están excluidos de las regiones de unión a receptores potenciales, o las regiones para la unión a proteínas o ligandos de unión pueden estar total o parcialmente expuestas a disolventes, tienen interacciones mínimas o nulas con enlaces de hidrógeno con residuos cercanos, pueden exponerse mínimamente a residuos reactivos cercanos, y/o pueden estar en regiones que son altamente flexibles según lo predicho por la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido particular con su receptor asociado, ligando o proteínas de unión.

[0312] Una amplia variedad de aminoácidos no naturales puede sustituirse o incorporarse a una posición dada en un polipéptido. A modo de ejemplo, un aminoácido no natural particular puede seleccionarse para su incorporación en base a un examen de la estructura cristalina tridimensional de un polipéptido con sus ligandos, receptores y/o proteínas de unión asociados, una preferencia por las sustituciones conservativas.

[0313] En una realización, los métodos descritos en el presente documento incluyen la incorporación en el derivado de enlazador de dolastatina, en el que el derivado de enlazador de dolastatina comprende un primer grupo reactivo; y poner en contacto el derivado enlazador de dolastatina con una molécula (que incluye, entre otros, una segunda proteína o polipéptido o análogo de polipéptido; un anticuerpo o fragmento de anticuerpo; y cualquier combinación de los mismos) que comprende un segundo grupo reactivo. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto de hidroxilamina y el segundo grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo, por lo que se forma un enlace oxima. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo y el segundo grupo reactivo es un resto oxima, por lo que se forma un enlace oxima. En ciertas realizaciones, el primer grupo reactivo es un resto oxima y el segundo grupo reactivo es un resto carbonilo o dicarbonilo, por lo que se produce una reacción de intercambio de oxima.

[0314] En algunos casos, la incorporación de los derivados del enlazador de dolastatina se combinará con otras adiciones, sustituciones o eliminaciones dentro del polipéptido para afectar otros rasgos químicos, físicos, farmacológicos y/o biológicos. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o deleciones pueden aumentar la estabilidad (incluida, entre otras, la resistencia a la degradación proteolítica) del polipéptido o aumentar la afinidad del polipéptido por su receptor, ligando y/o proteínas de unión apropiados. En algunos casos, las otras adiciones, sustituciones o eliminaciones pueden aumentar la solubilidad (incluyendo pero sin limitación, cuando se expresan en *E. coli* u otras células huésped) del polipéptido. En algunas realizaciones, los sitios se seleccionan para la sustitución con un aminoácido codificado de forma natural o no natural, además de otro sitio para la incorporación de un aminoácido no natural con el propósito de aumentar la solubilidad del polipéptido después de la expresión en *E. coli*, u otras células huésped recombinantes. En algunas realizaciones, los polipéptidos comprenden otra adición, sustitución o eliminación que modula la afinidad por el ligando asociado, las proteínas de unión y/o el receptor, modula (incluyendo pero no limitado a, aumenta o disminuye) la dimerización del receptor, estabiliza los dímeros del receptor, modula la vida media en circulación, modula la liberación o la biodisponibilidad, facilita la purificación, o mejora o altera una vía particular de administración. De manera similar, el polipéptido de aminoácido no natural puede comprender secuencias de escisión química o enzimática, secuencias de escisión de proteasas, grupos reactivos, dominios de unión a anticuerpos (incluidos, entre otros, FLAG o poli-His) u otras secuencias basadas en afinidad (incluidas pero no limitado a, FLAG, poli-His, GST, etc.) o moléculas unidas (incluyendo pero no limitado a, biotina) que mejoran la detección (incluyendo pero no limitado a, GFP), purificación, transporte a través de tejidos o membranas celulares, liberación o activación de profármacos, reducción de tamaño u otros rasgos del polipéptido.

VII. Expresión de anti-CD 70 e interacción de ligandos como ejemplo

[0315] Los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en este documento no se limitan a un tipo, clase o familia particular de polipéptidos o proteínas. De hecho, virtualmente cualquier polipéptido puede diseñarse o modificarse para incluir al menos un aminoácido no natural "modificado o no modificado" que contiene un derivado de enlazador de dolastatina descrito en el presente documento. Solo a modo de ejemplo, el polipéptido puede ser homólogo a una proteína terapéutica seleccionada del grupo que consiste en: alfa-1 antitripsina, angiostatina, factor antihemolítico, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, anticuerpo monoclonal (por ejemplo, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, infliximab, adalimumab, basiliximab, daclizumab, omalizumab, ustekinumab, etanercept, gemtuzumab, alemtuzumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab, palivizumab, y abciximab), apolipoproteína, apoproteína, factor natriurético atrial, polipéptido natriurético atrial, péptido atrial, quimiocina C-X-C, T39765, NAP-2, ENA-78, gro-a, gro-b, gro-c, IP-10, GCP-2, NAP-4, SDF-1, PF4, MIG, calcitonina, ligando c-kit, citocina, quimiocina CC, proteína-1 quimioatrayente monocito, proteína-2 quimioatrayente monocitos, proteína-3 quimioatrayente monocitos, proteína alfa-1 inflamada de monocitos, proteína-i beta inflamada de monocitos, RANTES, 1309, R83915, R91733, HCC1, T58847, D31065, T64262, CD40, ligando CD40, ligando c-kit, colágeno, colonia st factor de imitación (LCR), factor de complemento 5a, inhibidor del complemento, receptor de complemento 1, citoquina, péptido activador de neutrófilos epiteliales-78, MIP-16, MCP-1, factor de crecimiento epidérmico (eGF), péptido activador de neutrófilos epiteliales, eritropoyetina (EPO), toxina exfoliante, factor IX, factor VII, factor VIII, factor X, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), fibrinógeno, fibronectina, proteína del paquete de cuatro hélices, G-CSF, LPG-1, GM-CSF, glucocerebrosidasa, gonadotropina, crecimiento factor, receptor del factor de crecimiento, grf, proteína hedgehog, hemoglobina, factor de crecimiento de hepatocitos (hGF), hirudina, hormona del crecimiento humano (hGH), albúmina de suero humano, ICAM-1, receptor de ICAM-1, LFA-1, receptor de LFA-1, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), IGF-I, IGF-II, interferón (IFN), IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, interleucina (ILO), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, factor de crecimiento queratinocito (KGF), lactoferrina, factor inhibidor de la leucemia, luciferasa, luciferina, factor inhibidor de neutrófilos (NIF), oncostatina M, proteína osteogénica, producto oncogénico, paracitonina, hormona paratiroidea, PD-ECSF, PDGF, hormona peptídica, pleiotropina, proteína A, proteína G, pth, exotoxina pirogénica A, exotoxina pirogénica B, exotoxina pirogénica C, ppy, relaxina, renina, SCF, pequeña proteína biosintética, receptor soluble del complemento I, I-CAM soluble, receptor soluble de la interleucina, receptor soluble de TNF, somatomedina, somatostatina, somatotropina, estreptoquinasa, superantígenos, enterotoxina estafilococo, SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, receptor de hormonas esteroides, dismutasa de superóxido, toxina del síndrome de choque tóxico, timosina alfa 1, activador de plasminógeno tisular, factor de crecimiento tumoral (TGF), factor de necrosis tumoral, factor de necrosis tumoral alfa, factor de necrosis tumoral beta, receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), proteína VLA-4, proteína VCAM-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uroquinasa, mos, ras, raf, met, p53, tat, fos,

Mic, jun, myb, rel, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor de testosterona, receptor de aldosterona, receptor de LDL y corticosterona.

[0316] Por lo tanto, la siguiente descripción de un ADC ARX-anti-CD70, anti-CD70-2H5-HA119-NCA, y CD70-2H5-HA119-NCA1 se proporciona con fines ilustrativos y a modo de ejemplo no limitativo de Alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en este documento.

[0317] CD70-2H5-HA119-NCA1 es un conjugado de fármaco con anticuerpo monoclonal humanizado que interactúa con el ligando CD27 que funciona, por ejemplo no limitativo, al promover la supervivencia celular y la expansión de las células T CD8 cebadas con antígeno, formación de células T de memoria y proliferación de células B. Se han encontrado receptores CD70 en densidades altas en tejido canceroso, por ejemplo 34000-189000 copias por célula (Caki-1, 786-O, L-428, UMRC3, LP-1, DBTRG-05 MG) (anticuerpo dirigido contra CD70)-conjugado de fármaco con índice terapéutico incrementado, Molecular Cancer Therapeutics, 2008) y en tejido no canceroso y/o tejido normal, los receptores se encuentran en 5%-15% de células T activadas y 10%-25% de células B activadas. Se ha encontrado expresión de CD70 en ~ 40% de los aislamientos de mieloma múltiple (Caracterización preclínica de SGN-70, un anticuerpo humanizado dirigido contra CD70, Cancer Therapy; Preclinical, 2008) y confirmó la expresión de CD70 en un alto porcentaje de, por ejemplo, linfoma de Hodgkin Células de Reed-Sternberg, linfoma no Hodgkin y tumores de carcinoma de células renales. CD70 es una proteína de membrana integral de tipo II de la familia TNF. Para los fines de esta invención, es posible que el anticuerpo α CD70 sea cualquier anticuerpo CD70 conocido con un ácido amino no codificado de forma natural. Para propósitos de ilustración, los anticuerpos CD70-2H5-HA119-NCA1 se describen en la Tabla 1,

[0318] En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una región constante anti-CD70 que comprende la SEQ ID NO: 3 con un aminoácido no codificado de forma natural. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una región constante anti-CD70 que comprende la SEQ ID NO: 4. En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una región constante anti-CD70 que comprende la SEQ ID NO: 3 en donde un aminoácido es un aminoácido no codificado de forma natural. En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una región constante anti-CD70 que comprende la SEQ ID NO: 3 en la que el primer aminoácido es un aminoácido no codificado de forma natural. En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una región constante anti-CD70 que comprende la SEQ ID NO: 4 en la que un aminoácido es un aminoácido no codificado de forma natural. En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una región anti-CD70 que comprende la SEQ ID NO: 4 en la que el primer aminoácido es un aminoácido no codificado de forma natural. En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 con una cadena pesada variable de SEQ ID NO: 1, En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 con una cadena pesada variable de SEQ ID NO: 10. En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 con una cadena ligera variable de SEQ ID NO: 2, En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 con una cadena ligera variable de SEQ ID NO: 11, En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 1 y una cadena ligera de SEQ ID NO. 2, en otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 10 y una cadena ligera de SEQ ID NO. 11, En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 1 y una luz ligera de SEQ ID NO. 2 y una región constante. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 10 y una cadena ligera de SEQ ID NO. 11 y una región constante. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 10 y una cadena ligera de SEQ ID NO. 11 y una región constante que comprende la SEQ ID NO.3. En otra realización de la presente invención, hay un aminoácido no codificado de forma natural en la secuencia de anticuerpo anti-CD70. En otra realización de la presente invención, hay más de un aminoácido no codificado de forma natural en la secuencia de anticuerpo anti-CD70. En otra realización de la presente invención, el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con un aminoácido no codificado de forma natural. En otra realización de la presente invención, el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con un aminoácido no codificado de forma natural. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada de SEQ ID NO. 1 y una cadena ligera de SEQ ID NO. 2 y una región constante que comprende la SEQ ID NO. 3, En otras realizaciones de la presente invención, más de un aminoácido no codificado de forma natural está sustituido en el anticuerpo anti-CD70. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos no codificados de forma natural. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo α CD70 comprende la SEQ ID NO. 4 y regiones variables anti-CD70 proporcionadas en la Solicitud de patente de EE.UU. publicada 20100150950.

[0319] En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 90% con la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 90% con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y un 90% de homología con la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos

codificados de forma no natural y 95 % de homología con la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 95% con la SEQ ID. NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 95% con la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y un 96% de homología con la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y un 96% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y un 96% de homología con la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados naturalmente y una homología del 97% con la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 97% con la SEQ ID. NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 97% con la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y un 98% de homología con la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y un 98% de homología con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural y un 98% de homología con la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos de aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 99% con la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos, aminoácidos no codificados de forma natural y una homología del 99% con la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo α CD70 que comprende una secuencia de aminoácidos, un aminoácido no codificado de forma natural y una homología del 99% con la SEQ ID NO: 3. La selección del sitio del aminoácido no codificado de forma natural se describe dentro de esta especificación, y como se refiere específicamente a los anticuerpos α -CD70, se seleccionaron los sitios en función de la exposición a la superficie/accesibilidad al sitio dentro del anticuerpo y se seleccionaron los sitios hidrófago/aminoácido neutro para mantener la carga en el anticuerpo.

Tabla 1: SECUENCIAS DE AMINOÁCIDO DE ANTICUERPO Y NUCLEÓTIDOS

SEQ ID NO.	IDENTIFICADOR	SECUENCIA
1	Aminoácido 7F2 VH humanizado	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYFTFDYYMNWVQQA PGKGLEWMGIINPYNGGTHYNQKFKGRVTTTADTSTIDTAYM ELSSLRSEDVAVYYCATSGYDLYFDYWGQGLVTVSS* (Sustitución ámbar en A119)
2	Aminoácido 7F2 VL humanizado	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGTAFAVAWYQQKPG QAPRLLIYSAFNRYNGIPARFSGSGPGTDFLTITSSLQSEDFAV YYCQQYSTYPLTFGGGKVEIK
3	Región constante, 234-236 mutaciones aminoácido	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKCKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

(Continuado)

SEQ ID NO.	IDENTIFICADOR	SECUENCIA
4	Región constante, aminoácido de tipo salvaje	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
5	Aminoácido Kappa humanizado 7F2	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC*
6	Nucleótido VH humanizado 7F2	GAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGGGCCGAGGTGAAAAGC CTGGGGCCACCGTGAAAATTTCTTGTAAGTTTCTGGATAT ACCTTCACCGATTACTATATGAACTGGGTTTCAGCAAGCCC CTGGAAAAGGGACTGGAGTGGATGGGGATAATTAACCCATA TAACGGCGGCACCCACTATAACCAAAAAGTTCAAAGGGAG GGTTACCATCACTGCAGACACCAGCACCGACACCGCTTAT ATGGAGCTGAGTAGCCTGAGGTCCGAGGATACTGCAGTTT ACTATTGTGCGACTTCCGGCTACGATCTGTACTTTGACTAC TGGGGCCAGGGAACCCCTCGTTACCGTCTCCTCA
7	Nucleótido VL humanizado 7F2	GAAATTGTGATGACACAGTCTCCGGCCACCCTGTCTGTTTC TCCGGGGGAAAGAGCTACCCTGAGTTGCAAAGCCAGTCAG AACGTTGGGACCGCCGTTGCCTGGTACCAACAGAAACCTG GCCAGGCCCCCCGTCCTCATCTATTCCGCATTCAACAGG TATAACGGCATCCAGCAAGGTTCTCCGGCAGTGGGCCAG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGAGCGA GGACTTCGCAGTTTATTATTGTCAGCAGTACAGTACCTACC CTCTCACTTTCCGAGGAGGCACTAAAGTTGAGATCAAA
8	Región constante 7F2, mutaciones nucleótido 234-236	GCACCTCCCGTCGCCGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT

(Continuado)

SEQ ID NO.	IDENTIFICADOR	SECUENCIA
		<p>CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCAATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTGA</p>
9	Nucleótido Kappa 7F2 humanizado	<p>CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATC TGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACIGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC CTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA AACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAGGGCCT GAGCTCGCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TGA</p>
10	Aminoácido 8A1 VH humanizado	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFSDYYMNWVRQA PGQGLEWMGEINPTTGGATYNQKFKARVITTADESTSTAYM ELSSLRSEDYAVYYCARSLFPANYAGFVYWGQGLVTVSS* (Sustitución de ámbar en A122)</p>
11	Aminoácido 8A1 VL humanizado	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCASSSVSYMYWYQQKPGKA PKLLIYDTSKSLASGVPSRFSGSGSDYFTFTISLQPEDIA'ITYY CQQWSSYPWTFGQGTKVEIK</p>
12	Aminoácido 8A1 Kappa humanizado	<p>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*</p>
13	Nucleótido 8A1 VH humanizado	<p>CAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGGGCCGAGGTGAAAAAGC CTGGGTCTTCTGTGAAAGTTTCTTGTAAGCAAGTGGATAT TCTTTCAGTGATTACTATATGAACTGGGTTAGGCAGGCCCC TGGCCAAGGACTCGAGTGGATGGGGGAGATTAACCCAACC ACCGGCGGGGCAACCTATAACCAAAAAGTTCAAAGCAAGG GTTACCATCACTGCTGACGAGAGCACTTCAACTGCTTATAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGGTCCGAGGATACCGCAGTTTAC TATTGTGCGAGATCCCTCTTCCCTGCAAACACTACGCAGGCTT CGTTTACTGGGGACAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA</p>

(Continuado)

SEQ ID NO.	IDENTIFICADOR	SECUENCIA
14	Nucleótido 8A1 VL humanizado	GATATTCAGATGACACAGTCTCCGTCTTCTCTGTCTGCCAG TGTTGGGGATAGAGTTACCATTACCTGCAGTGCCAGTTCTA GTGTTTCCTACATGTAAGTGGTACCAACAGAAACCTGGCAA GGCCCCAAACTCCTCATCTATGACACCTCCAAACTCGCA AGTGGCGTTCATCCAGGTTCTCCGGCAGTGGGAGTGGGA CAGACTATACTTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCTGAGGA CATCGCAACCTATTATTGTTCAGCAGTGGAGTAGCTACCCTT GGACTTTCGGACAGGGAACGAAAGTTGAGATCAAACGTAC GGTGGCTGCACCATCTGT
15	Región constante 8A1, 234-236 mutaciones nucleótido	TAGAGCACCAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCT CCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCG TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC CGGCTGTCCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC ACATGCCACCCGTGCCAGCACCTCCCGTCGCCGGGGGAC CGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAG CGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTTGA
16	Nucleótido Kappa 8A1 humanizado	CTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAATAACTTCTATCCAGA

(Continuado)

SEQ ID NO.	IDENTIFICADOR	SECUENCIA
		GAGGCCAAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
17	ARX-anti-CD70 2H5 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTSSYIMHWVRQAP GKGLEWVAVISYDGRNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDTDGYDFDYWGQGLVTVSS
18	ARX-anti-CD70 2H5 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISISLEPEDFAVY YCQQR TNWPLTFGGG TKVEIK

[0320] En una realización, la presente invención proporciona un conjugado de fármaco de anticuerpo α CD70 (ADC o un α CD70-ADC) en el que el anticuerpo es un α CD70 que comprende una cadena ligera y pesada. En otra realización de la presente invención se proporciona un α CD70-ADC que comprende una cadena pesada (SEQ. ID NO.: 1). En otra realización de la presente invención, se proporciona un α CD70-ADC que comprende una luz (SEQ. ID. NO.: 2). En otra realización de la presente invención se proporciona un α CD70-ADC que comprende una cadena pesada (SEQ. ID. NO.: 10). En otra realización de la presente invención se proporciona un α CD70-ADC que comprende una luz (SEQ. ID. NO.: 11). En otra realización de la presente invención, se proporciona un α CD70-ADC que comprende una cadena ligera (SEQ. ID. NO.: 2) y pesada (SEQ. ID. NO.: 1). En otra realización de la presente invención se proporciona un α CD70-ADC que comprende una cadena ligera (SEQ. ID. NO.: 11) y pesada (SEQ. ID. NO.: 10). En algunas realizaciones de la presente invención, la región constante, SEQ ID NO. 3 o 4, ha mutado cualquiera de las posiciones de aminoácidos seleccionadas del grupo 115, 116, 117. En algunas realizaciones de la presente invención, se hacen mutaciones en el anticuerpo para inhibir la función de ADCC. En algunas realizaciones de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural sustituidos en una o más posiciones de la SEQ ID NO: 1, En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural sustituidos en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de la SEQ ID NO: 1. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con un aminoácido no codificado de forma natural sustituido en una posición en la SEQ ID NO: 1, otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con un aminoácido no codificado naturalmente sustituido en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de la SEQ ID NO: 1. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende es un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos no codificados naturalmente sustituidos en una o más posiciones de la SEQ ID NO: 2, En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más amino codificados de forma no natural ácidos sustituidos en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de la SEQ ID NO: 2. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con un aminoácido no naturalmente codificado sustituido en una posición en la SEQ ID NO: 2. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con un aminoácido no codificado de forma natural sustituido en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de SEQ ID NO: 2.

[0321] En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural sustituidos en una o más posiciones de la SEQ ID NO: 3. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos codificados de forma no natural sustituidos en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de la SEQ ID NO: 3. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con un aminoácido no codificado de forma natural sustituido en una posición en la SEQ ID NO: 3. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con anticuerpos no naturalmente codificados sustituidos en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de la SEQ ID NO: 3.

[0322] En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos no codificados de forma natural sustituidos en una o más posiciones de la SEQ ID NO: 10. En otra

realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos codificados de forma no natural sustituidos en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 posiciones de la SEQ ID NO: 2. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos codificados de forma no natural sustituidos en las posiciones 1, 2, 3, 4 o 5 de la SEQ ID NO: 2. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos no codificados naturalmente sustituidos en 1, 2 o 3 posiciones de la SEQ ID NO: 2. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con uno o más aminoácidos no codificados naturalmente sustituidos en 1 o 2 posiciones de la SEQ ID NO: 2. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con dos aminoácidos no codificados naturalmente sustituidos en 2 posiciones de la SEQ ID NO: 2. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende un anticuerpo α CD70 con un aminoácido no codificado de forma natural sustituido en una posición de la SEQ ID NO: 2. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de la SEQ ID NO: 9. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de la SEQ ID NO: 10. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de la SEQ ID NO: 11. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de la SEQ ID NO: 12. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de la SEQ ID NO: 13. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de la SEQ ID NO: 14. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera de anticuerpo α CD70. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera de anticuerpo α CD70. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera de anticuerpo α CD70. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera de anticuerpo α CD70. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de SEQ ID NO: 12 y una cadena ligera de anticuerpo α CD70. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de la SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera de anticuerpo α CD70. En otra realización de la presente invención, el anticuerpo comprende el anticuerpo α CD70 de la SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera de anticuerpo α CD70.

[0327] Como un ejemplo adicional, no limitativo, la siguiente descripción del trastuzumab del anticuerpo HER2 se proporciona con fines ilustrativos y solo a modo de ejemplo, y no como un límite en el alcance de los métodos, composiciones, estrategias y técnicas descritas en este documento. Además, la referencia al trastuzumab en esta solicitud está destinada a utilizar el término genérico como ejemplo de cualquier anticuerpo. Por lo tanto, se entiende que las modificaciones y los compuestos químicos descritos en el presente documento con referencia al trastuzumab pueden aplicarse igualmente a cualquier anticuerpo o anticuerpo monoclonal, incluidos los enumerados específicamente en este documento.

[0328] Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio IV del segmento extracelular del receptor HER2/neu. El gen HER2 (también conocido como HER2/neu y el gen ERbb2) se amplifica en 20-30% de los cánceres de mama en etapa temprana, lo que lo hace sobreexpresado. Además, en el cáncer, el HER2 puede enviar señales sin que lleguen mitógenos y se unan a cualquier receptor, haciéndolo hiperactivo.

[0329] HER2 se extiende a través de la membrana celular y transporta señales desde el exterior de la célula hacia el interior. En personas sanas, los compuestos de señalización llamados mitógenos llegan a la membrana celular y se unen a la parte externa de otros miembros de la familia de receptores HER. Esos receptores enlazados se enlazan (dimerizan) con HER2, activándolo. HER2 luego envía una señal al interior de la célula. La señal pasa por diferentes vías bioquímicas. Esto incluye la ruta PI3K/Akt y la ruta MAPK. Estas señales promueven la invasión, la supervivencia y el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) de las células.

[0330] Las células tratadas con trastuzumab se detienen durante la fase G1 del ciclo celular, por lo que se reduce la proliferación. Se ha sugerido que el trastuzumab induce parte de su efecto mediante la regulación a la baja de HER2/neu, que conduce a la interrupción de la dimerización del receptor y la señalización a través de la cascada PI3K en sentido descendente. P27Kip1 entonces no está fosforilado y es capaz de entrar en el núcleo e inhibir la actividad de cdK2, causando la detención del ciclo celular. Además, el trastuzumab suprime la angiogénesis mediante la inducción de factores antiangiogénicos y la represión de los factores proangiogénicos. Se cree que una contribución al crecimiento no regulado observado en el cáncer podría deberse a la escisión proteolítica de los resultados de HER2/neu en la liberación del dominio extracelular. Se ha demostrado que el trastuzumab inhibe la división de ectodominio HER2/neu en células de cáncer de mama.

VIII. Captación celular de aminoácidos no naturales.

[0331] La captación de aminoácidos no naturales por una célula eucariota es una cuestión que se considera típicamente al diseñar y seleccionar aminoácidos no naturales, que incluyen, entre otros, la incorporación a una proteína. Por ejemplo, la alta densidad de carga de los α -aminoácidos sugiere que es poco probable que estos compuestos sean permeables a las células. Los aminoácidos naturales son absorbidos por las células eucariotas a través de una colección de sistemas de transporte basados en proteínas. Se puede hacer un examen rápido que evalúa qué aminoácidos no naturales, si los hay, son captados por las células (los ejemplos 15 y 16 en este

documento ilustran ejemplos no limitativos de pruebas que pueden realizarse con aminoácidos no naturales). Véase, por ejemplo, los ensayos de toxicidad en, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2004/198637 titulada "Protein Arrays" y Liu, DR & Schultz, PG (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS United States 96: 4780-4785. Aunque la captación se analiza fácilmente con varios ensayos, una alternativa al diseño de aminoácidos no naturales que son susceptibles a las vías de captación celular es proporcionar rutas biosintéticas para crear aminoácidos *in vivo*.

[0332] Típicamente, el aminoácido no natural producido a través de la captación celular como se describe en este documento se produce en una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficiente, que incluye, entre otros, una cantidad celular natural, pero no en un grado tal que afectar la concentración de los otros aminoácidos o agotar los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM.

IX. Biosíntesis de aminoácidos no naturales

[0333] Ya existen muchas rutas biosintéticas en las células para la producción de aminoácidos y otros compuestos. Mientras que un método biosintético para un aminoácido no natural particular puede no existir en la naturaleza, incluyendo pero no limitado a, en una célula, los métodos y composiciones descritas en el presente documento proporcionan dichos métodos. Por ejemplo, las rutas biosintéticas para aminoácidos no naturales pueden generarse en la célula huésped agregando nuevas enzimas o modificando las rutas existentes de la célula huésped. Nuevas enzimas adicionales incluyen enzimas naturales o enzimas desarrolladas artificialmente. Por ejemplo, la biosíntesis de *p*-aminofenilalanina (como se presenta en un ejemplo en el documento WO 2002/085923 titulado "In vivo incorporation of unnatural amino acids") se basa en la adición de una combinación de enzimas conocidas de otros organismos. Los genes para estas enzimas pueden introducirse en una célula eucariota transformando la célula con un plásmido que comprende los genes. Los genes, cuando se expresan en la célula, proporcionan una vía enzimática para sintetizar el compuesto deseado. En este documento se proporcionan ejemplos de los tipos de enzimas que se añaden opcionalmente. Secuencias adicionales de enzimas se encuentran, por ejemplo, en Genbank. Las enzimas desarrolladas artificialmente se pueden agregar a una célula de la misma manera. De esta manera, la maquinaria celular y los recursos de una célula se manipulan para producir aminoácidos no naturales.

[0334] Se dispone de una variedad de métodos para producir nuevas enzimas para uso en rutas biosintéticas o para la evolución de rutas existentes. Por ejemplo, la recombinación recursiva, que incluye pero no se limita a, según lo desarrollado por Maxygen, Inc. (disponible en la web en www.maxygen.com), puede usarse para desarrollar nuevas enzimas y vías. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370 (4): 389-391; y, Stemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl Acad Sci. EE.UU., 91: 10747-10751. De manera similar, DesignPath™, desarrollado por Genencor (disponible en la red mundial en genencor.com) se usa opcionalmente para la ingeniería de vías metabólicas, que incluye, entre otros, diseñar una vía para crear un aminoácido no natural en una célula. Esta tecnología reconstruye las rutas existentes en los organismos hospedadores utilizando una combinación de nuevos genes, incluidos, entre otros, los identificados a través de la genómica funcional, la evolución molecular y el diseño. Diversa Corporation (disponible en la red mundial en diversa.com) también proporciona tecnología para seleccionar rápidamente bibliotecas de genes y vías genéticas, incluidas, entre otras, crear nuevas rutas para la producción bio sintética de aminoácidos no naturales.

[0335] Típicamente, el aminoácido no natural producido con una ruta biosintética diseñada como se describe en este documento se produce en una concentración suficiente para una biosíntesis de proteínas eficiente, que incluye pero no se limita a una cantidad celular natural, pero no en un grado tal como afectar la concentración de los otros aminoácidos o agotar los recursos celulares. Las concentraciones típicas producidas *in vivo* de esta manera son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 0,05 mM. Una vez que una célula se transforma con un plásmido que comprende los genes utilizados para producir las enzimas deseadas para una ruta específica y se genera un aminoácido no natural, las selecciones *in vivo* se usan opcionalmente para optimizar aún más la producción del aminoácido no natural para síntesis de proteínas ribosómicas y crecimiento celular.

X. Metodología sintética adicional.

[0336] Los aminoácidos no naturales descritos en el presente documento pueden sintetizarse usando metodologías descritas en la técnica o usando las técnicas descritas en el presente documento o mediante una combinación de las mismas. Como ayuda, la siguiente tabla proporciona varios electrófilos y nucleófilos de partida que pueden combinarse para crear un grupo funcional deseado. La información proporcionada pretende ser ilustrativa y no limitativa a las técnicas sintéticas descritas en este documento.

Tabla 2: Ejemplos de enlaces covalentes y sus precursores

Producto de enlazador covalente	Electrófilo	Nucleófilo
Carboxamidas	Ésteres activados	aminas/anilinas
Carboxamidas	azidas de acilo	aminas/anilinas
Carboxamidas	haluros de acilo	aminas/anilinas
Ésteres	haluros de acilo	alcoholes/fenoles
Ésteres	nitrilos de acilo	alcoholes/fenoles
Carboxamidas	nitrilos de acilo	aminas/anilinas
Iminas	Aldehídos	aminas/anilinas
Hidrazonas	aldehídos o cetonas	Hidrazinas
Oximas	aldehídos o cetonas	Hidroxilaminas
Aminas de alquilo	haluros de alquilo	aminas/anilinas
Ésteres	haluros de alquilo	ácidos carboxílicos
Tioéteres	haluros de alquilo	Tioles
Éteres	haluros de alquilo	alcoholes/fenoles
Producto de enlazador covalente	Electrófilo	Nucleófilo
Tioéteres	sulfonatos de alquilo	Tioles
Ésteres	sulfonatos de alquilo	ácidos carboxílicos
Éteres	sulfonatos de alquilo	alcoholes/fenoles
Ésteres	Anhídridos	alcoholes/fenoles
Carboxamidas	Anhídridos	aminas/anilinas
Tiofenoles	Arilo haluros	Tioles
Aminas de arilo	Arilo haluros	Aminas
Tioéteres	Azindinas	Tioles
Ésteres de boronato	Boronatos	Glicoles
Carboxamidas	ácidos carboxílicos	aminas/anilinas
Ésteres	ácidos carboxílicos	Alcoholes
Hidrazinas	Hidrazidas	ácidos carboxílicos
N-aciloureas o Anhídridos	carbodiimidas	ácidos carboxílicos
Ésteres	diazoalcanos	ácidos carboxílicos
Tioéteres	Epóxidos	Tioles
Tioéteres	haloacetamidas	Tioles
Ammotriazinas	halotriazinas	aminas/anilinas
Éteres de triazinilo	halotriazinas	alcoholes/fenoles
Amidinas	Ésteres de imido	aminas/anilinas
Ureas	Isocianatos	aminas/anilinas
Urethanes	Isocianatos	alcoholes/fenoles
Tioureas	isotiocianatos	aminas/anilinas
Tioéteres	Maleimidas	Tioles
Fosfite Ésteres	fosforamiditas	Alcoholes
Sililo éteres	haluros de sililo	Alcoholes
Aminas de alquilo	Ésteres de sulfonato	aminas/anilinas
Tioéteres	Ésteres de sulfonato	Tioles
Ésteres	Ésteres de sulfonato	ácidos carboxílicos
Éteres	Ésteres de sulfonato	Alcoholes
Sulfonamidas	haluros de sulfonilo	aminas/anilinas
Sulfonato Ésteres	haluros de sulfonilo	fenoles/alcoholes

[0337] En general, los electrófilos de carbono son susceptibles de ser atacados por nucleófilos complementarios,

incluidos los nucleófilos de carbono, en donde un nucleófilo atacante trae un par de electrones al electrófilo de carbono para formar un nuevo enlace entre el nucleófilo y el electrófilo de carbono.

5 [0338] Los ejemplos no limitantes de nucleófilos de carbono incluyen, pero no se limitan a reactivos de alquilo, alqueno, arilo y alquino de Grignard, organolitio, organozinc, alquilo, alqueno, arilo y alquino de estaño (organoestano), reactivos de alquilo, alqueno, arilo y alquino-borano (organoboranos y organoboratos); estos nucleófilos de carbono tienen la ventaja de ser cinéticamente estables en agua o en disolventes orgánicos polares. Otros ejemplos no limitantes de nucleófilos de carbono incluyen los reactivos de iluros de fósforo, enol y enolato; estos nucleófilos de carbono tienen la ventaja de ser relativamente fáciles de generar a partir de precursores bien conocidos por los expertos en la técnica de la química orgánica sintética. Los nucleófilos de carbono, cuando se utilizan junto con los electrófilos de carbono, generan nuevos enlaces carbono-carbono entre el nucleófilo de carbono y el electrófilo de carbono.

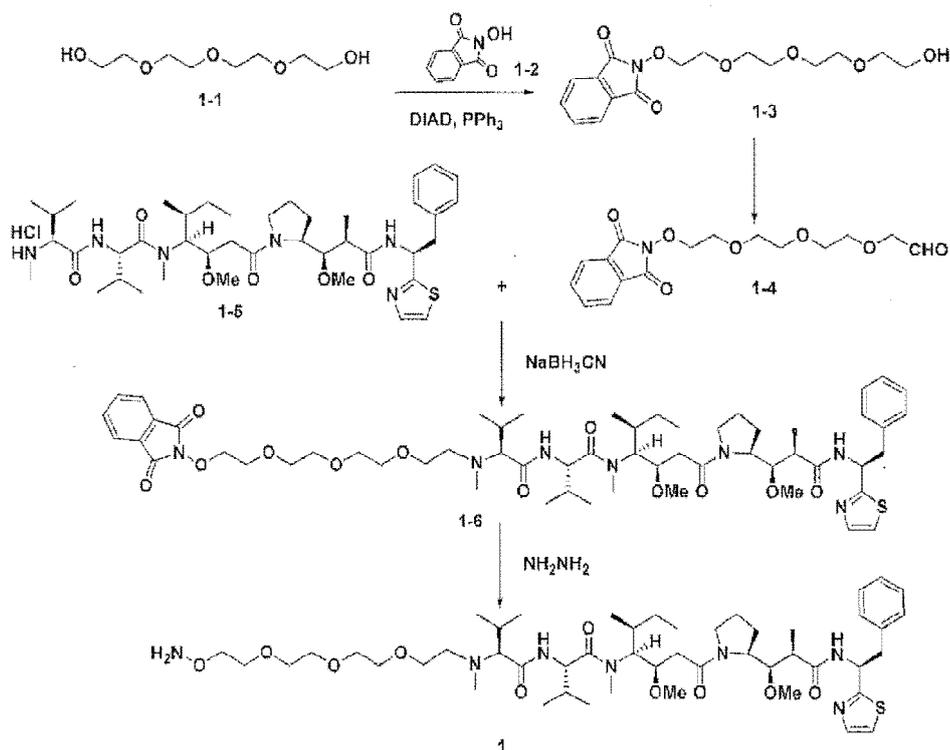
15 [0339] Los ejemplos no limitantes de nucleófilos no carbonosos adecuados para acoplamiento a electrófilos de carbono incluyen, pero no se limitan a, aminas primarias y secundarias, tioles, tioatos y tioéteres, alcoholes, alcóxidos, azidas, semicarbazidas y similares. Estos nucleófilos que no son carbono, cuando se usan junto con electrófilos de carbono, típicamente generan enlaces heteroátomos (C-X-C), en donde X es un heteroátomo, que incluye, entre otros, oxígeno, azufre o nitrógeno.

20 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis del Compuesto 1

25 [0340]

Esquema 1



60 [0341] **Compuesto 1-3:** se disolvieron tetra (etilenglicol) 1-1 (10 g, 51,5 mmol), N-hidroxiftalimidida 1-2 (8,4 g, 51,15 mmol) y trifetilfosfina (17,6 g, 67 mmol) en 300 ml de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (12,8 ml, 61,78 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 5,47 g (31%) del compuesto 1-3,

65 [0342] **Compuesto 1-4:** a una solución de compuesto 1-3 (200 mg, 0,59 mmol) en 15 ml de diclorometano, se agregó Periodinano Dess-Martin (300 mg, 0,71 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se detuvo con la solución de bisulfito de sodio en 15 ml de bicarbonato de sodio saturado. La mezcla se separó. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó

sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 150 mg (75%) del compuesto **1-4**,

[0343] Compuesto 1-6: a una solución de sal de hidrocloreto de monometildolastatina **1-5** (50 mg, 0,062 mmol) en 1 ml de DMF se añadió el compuesto **1-4** (63 mg, 0,186 mmol) y 70 ml de ácido acético, seguido de la adición de 8 mg de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 60 mg (80%) del compuesto **1-6**, MS (ESI) m/z 547 [M+2H], 1092 [M+H].

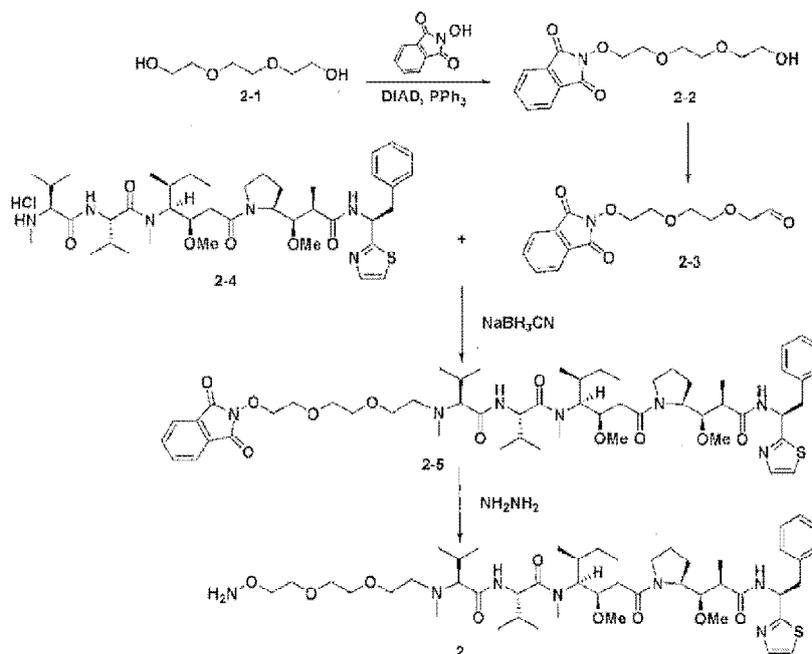
1d.

[0344] Compuesto 1: el compuesto **1-6** (60 mg, 0,05 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 32 μ l de hidrazina. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de hidrocloreto IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 33 mg (55%) del compuesto **1**. MS (ESI) m/z 482 [M+2H], 962 [M+H].

Ejemplo 2: Síntesis del Compuesto 2

[0345]

Esquema 2

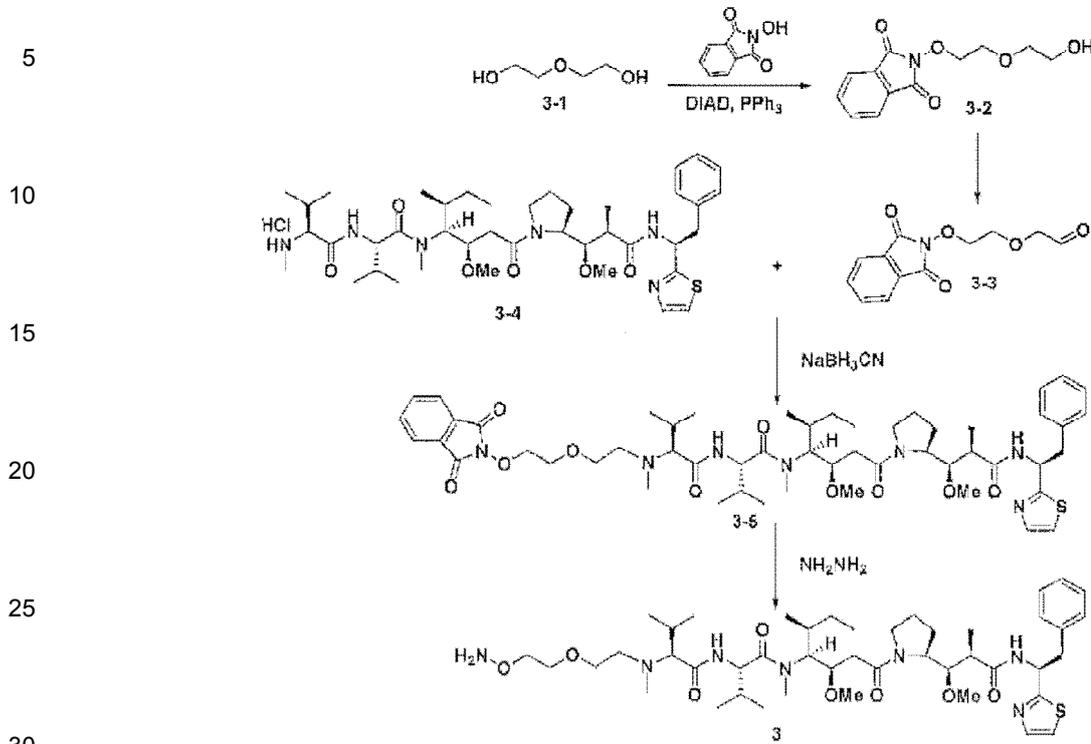


[0346] El compuesto **2** se sintetizó por una ruta sintética similar a la descrita en el Ejemplo 1. MS (ESI) m/z 460 [M+2H], 918 [M+H].

Ejemplo 3: Síntesis del Compuesto 3

[0347]

Esquema 3

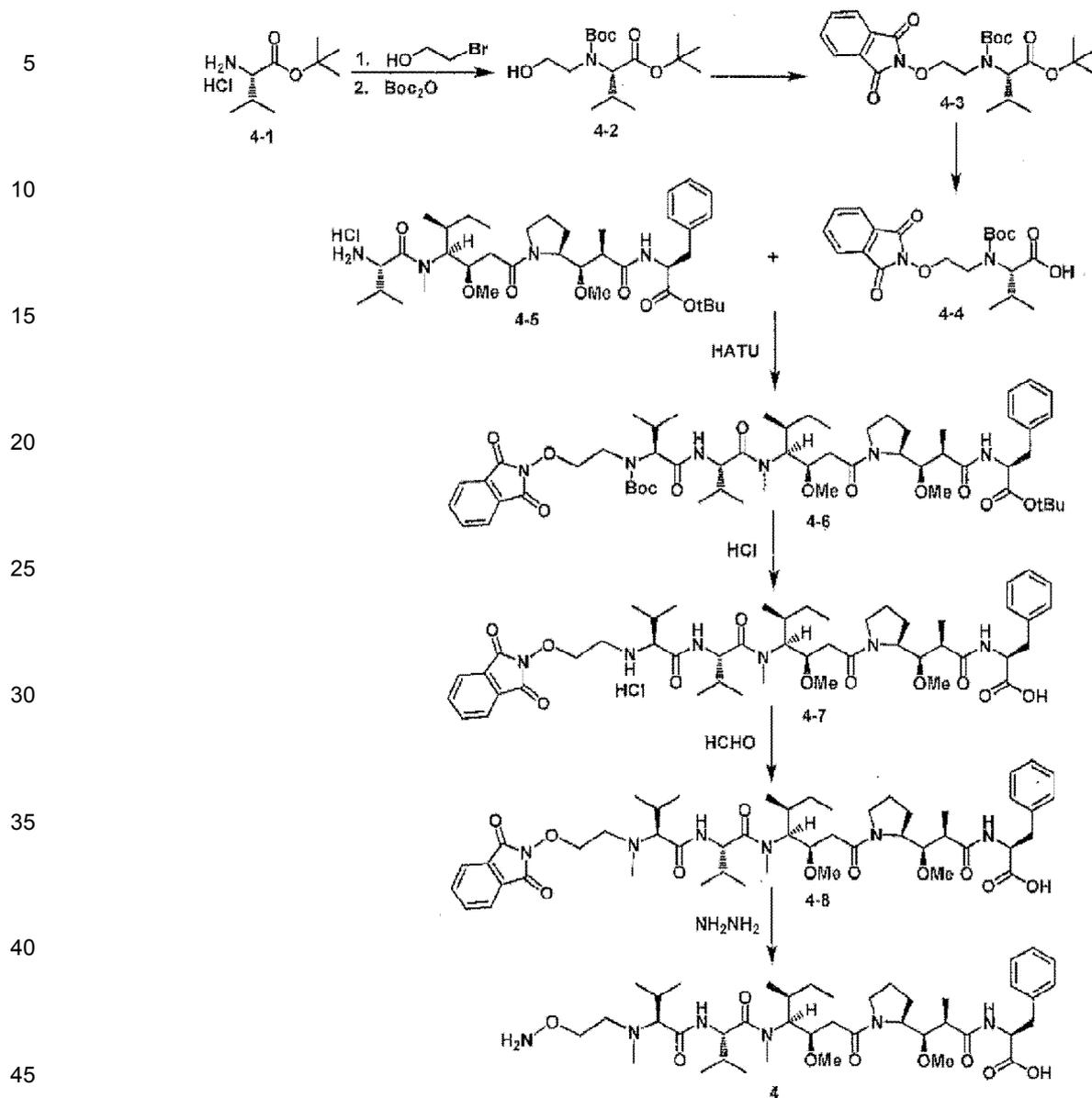


[0348] El compuesto 3 se sintetizó por una ruta sintética similar al Ejemplo 1, MS (ESI) m/z 438 [M+2H], 974 [M+H].

Ejemplo 4: Síntesis del Compuesto 4

[0349] **Compuesto 4-2:** A una solución de Val (OtBu)-OH.HCl **4-1** (1 g, 4,77 mmol) y bromoetanol (304,7 µl, 4,3 mmol) en 10 ml de DMF, se agregaron 1,68 ml de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. Se añadieron 4,8 mmol de BoC₂O a la mezcla de reacción, seguido de 0,84 ml de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 0,66 g de compuesto **4-2**.

Esquema 4



[0350] **Compuesto 4-3:** A una solución del compuesto **4-2** (500 mg, 1,58 mmol), N-hidroxiftalimida (261 mg, 1,6 mmol) y trifetilfosfina (538 mg, 2,05 mmol) en 15 ml. Se añadió THF DIAD (394 μ l, 1,9 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 0,68 g del compuesto **4-3**,

[0351] **Compuesto 4-4:** El compuesto **4-3** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en DMF y se trató con BoC_2O (230 ml, 1 mmol) y DIEA (352 ml, 2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 100 mg del compuesto **4-4**.

[0352] **Compuesto 4-5:** a una solución de compuesto Boc-Val-Dil-metilDap-OH en DMF se agrega phe(OtBu)-OH.HCl, HATU y N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mLX1, 50 mL X2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía flash. El compuesto resultante se trata con HCl/EtOAc para dar el compuesto **4-5**.

[0353] **Compuesto 4-6:** A la solución del compuesto **4-5** en DMF se le agrega el compuesto **4-4**, HATU y DIEA. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mLX1, 50 mL X2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca

sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía flash para dar el compuesto **4-6**.

[0354] Compuesto 4-7: El compuesto **4-6** se disuelve en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentra al vacío para dar el compuesto **4-7**.

[0355] Compuesto 4-8: A una solución de compuesto **4-7** en 1 ml de DMF se le agrega formaldehído y ácido acético, seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua y se purifica por HPLC para dar el compuesto **4-8**.

[0356] Compuesto 4: el compuesto **4-8** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de hidrocloreuro 1N. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Compuesto **4**.

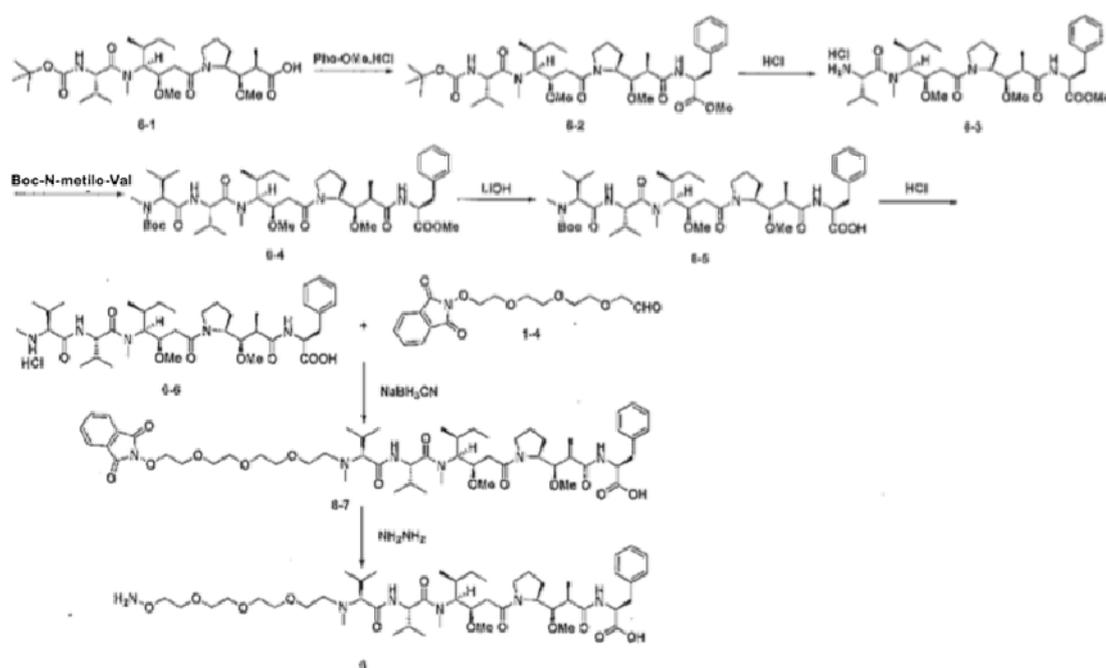
Ejemplo 5: Síntesis del Compuesto 5

[0357] El compuesto **4-7** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de hidrocloreuro 1N. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Compuesto **5**.

Ejemplo 6: Síntesis del Compuesto 6

[0358]

Esquema 6



[0359] Compuesto 6-2: a una solución del compuesto **6-1** (500 mg, 0,875 mmol) en 3 ml de DMF se agregaron 283 mg de hidrocloreuro de fenilalanina, 433 mg de HATU y 581 ml de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash para dar 560 mg (76%) del compuesto **6-2**.

[0360] Compuesto 6-3: el compuesto **6-2** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 511 mg del compuesto **6-3**.

[0361] Compuesto 6-4: A una solución del compuesto **6-3** (368 mg, 0,55 mmol) en 3 ml de DMF se agregaron 255 mg de Boc-N-Metilo valina, 314 mg de HATU y 303 ml de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash para dar 370 mg (79%) del compuesto **6-4**.

[0362] **Compuesto 6-5:** A una solución del compuesto **6-4** (170 mg) en 10 ml de MeOH, se agregaron 5 eq. de 1N LiOH. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con 1N HCl y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para dar 150 mg (90%) de compuesto **6-5**.

[0363] **Compuesto 6-6:** el compuesto **6-5** se disolvió en 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío y se purificó por HPLC para dar 150 mg de compuesto **6-6**,

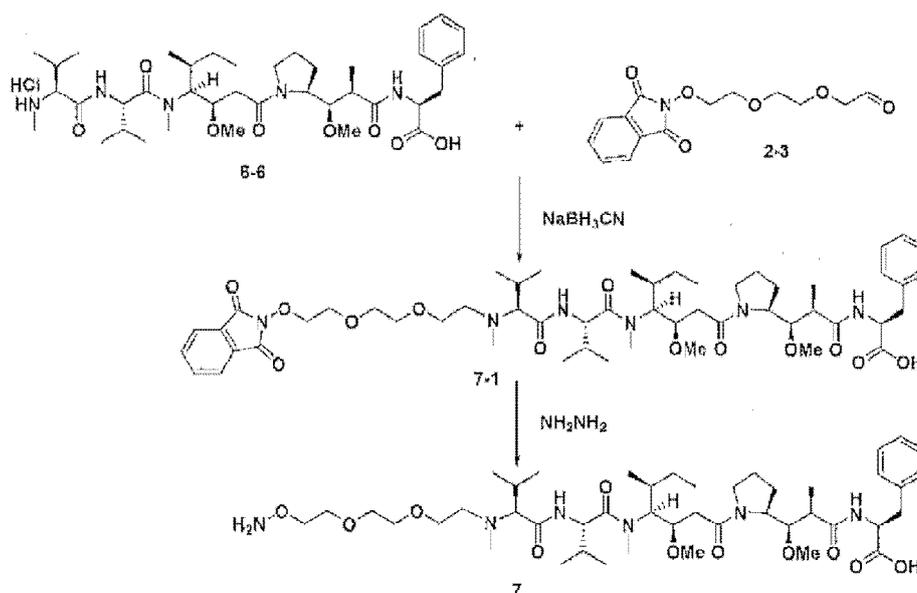
[0364] **Compuesto 6-7:** A una solución del compuesto **6-6** (50 mg, 0,062 mmol) en 1 ml de DMF se agregó el compuesto 1-4 (63 mg, 0,186 mmol) y 70 ml de ácido acético, seguido de la adición de 8 mg. de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 60 mg (80%) del compuesto **6-7**,

[0365] **Compuesto 6:** el compuesto **6-7** (60 mg, 0,05 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 32 μ l de hidrazina. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrócloruro 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 33 mg (55%) del Compuesto **6**.

Ejemplo 7: Síntesis del Compuesto 7

[0366]

Esquema 7

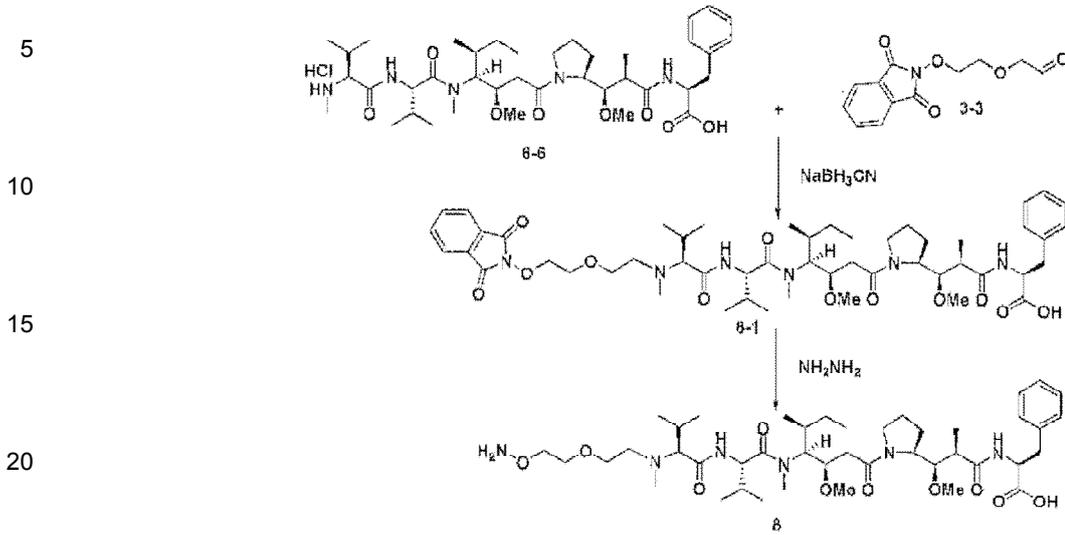


[0367] El compuesto **7** se sintetizó por una ruta sintética similar al compuesto **1**, MS (ESI) m/z 440 $[\text{M}+2\text{H}]$, 879 $[\text{M}+\text{H}]$.

Ejemplo 8: Síntesis del Compuesto 8

[0368]

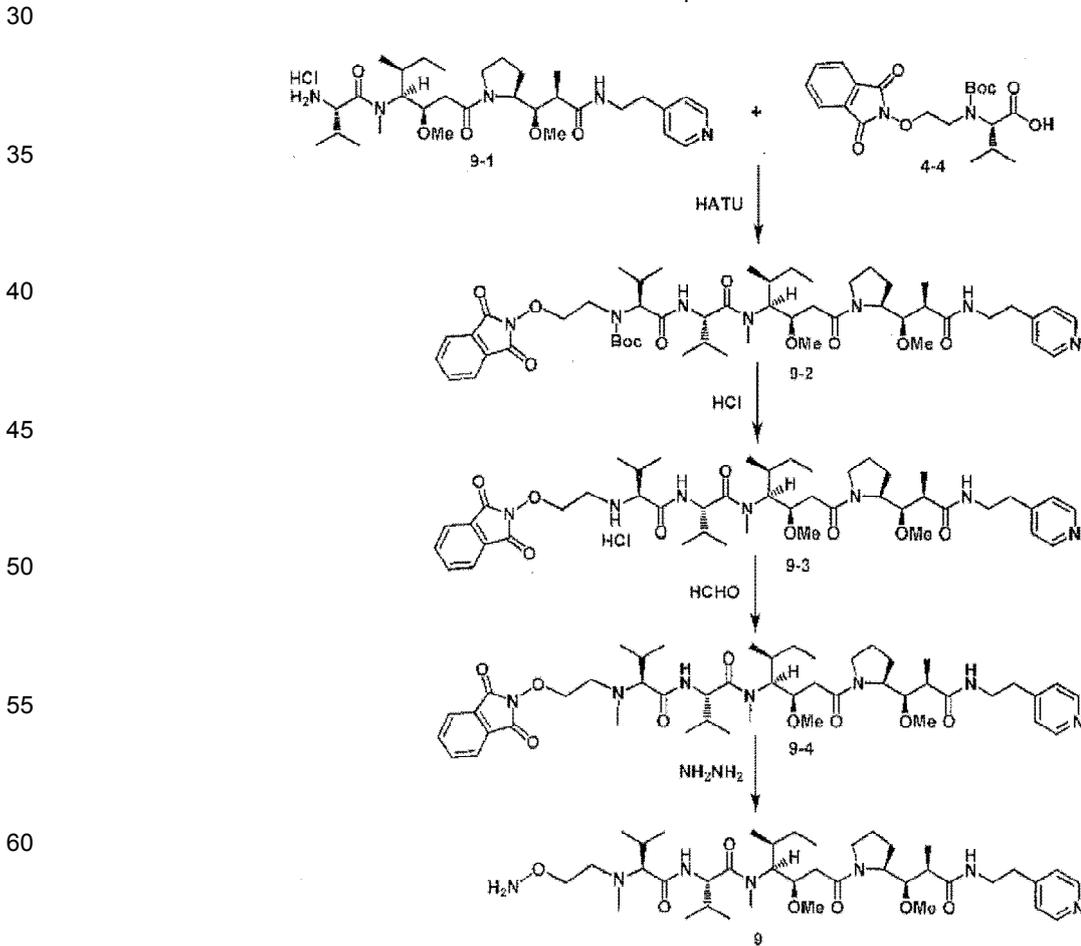
Esquema 8



[0369] El compuesto 8 se sintetizó mediante una ruta sintética similar al compuesto 1, MS (ESI) m/z 418 [M+2H], 835 [M+H].

Ejemplo 9: Síntesis del Compuesto 9

Esquema 9



[0371] Compuesto 9-1: A una solución de compuesto Boc-Val-Dil-metilDap-OH en DMF se le añade 4-(2-

aminoetilo)piridina, HATU y N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía flash. El compuesto resultante se trata con HCl/EtOAc para dar el compuesto **9-1**.

[0372] Compuesto 9-2: A la solución del compuesto **9-1** en DMF se le agrega el compuesto **4-4**, HATU y DIEA. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentra al vacío y se extrae con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combina y se lava con salmuera, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra al vacío. El residuo se purifica por cromatografía flash para dar el compuesto **9-2**.

[0373] Compuesto 9-3: El compuesto **9-2** se disuelve en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentra al vacío para dar el compuesto **9-3**.

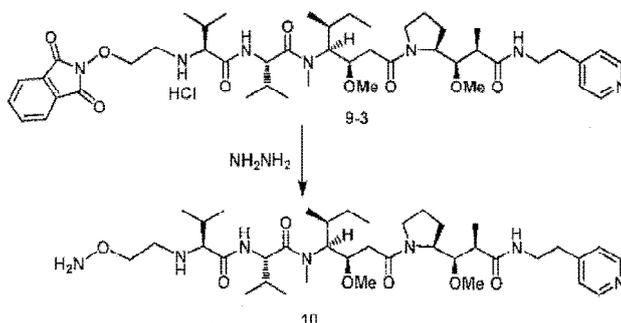
[0374] Compuesto 9-4: A una solución de compuesto **9-3** en 1 ml de DMF se le agrega formaldehído y ácido acético, seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluye con agua y se purifica por HPLC para dar el compuesto **9-4**.

[0375] Compuesto 9: El compuesto **9-4** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de hidrocloreuro IN. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el compuesto **9**.

Ejemplo 10: Síntesis del Compuesto 10

[0376]

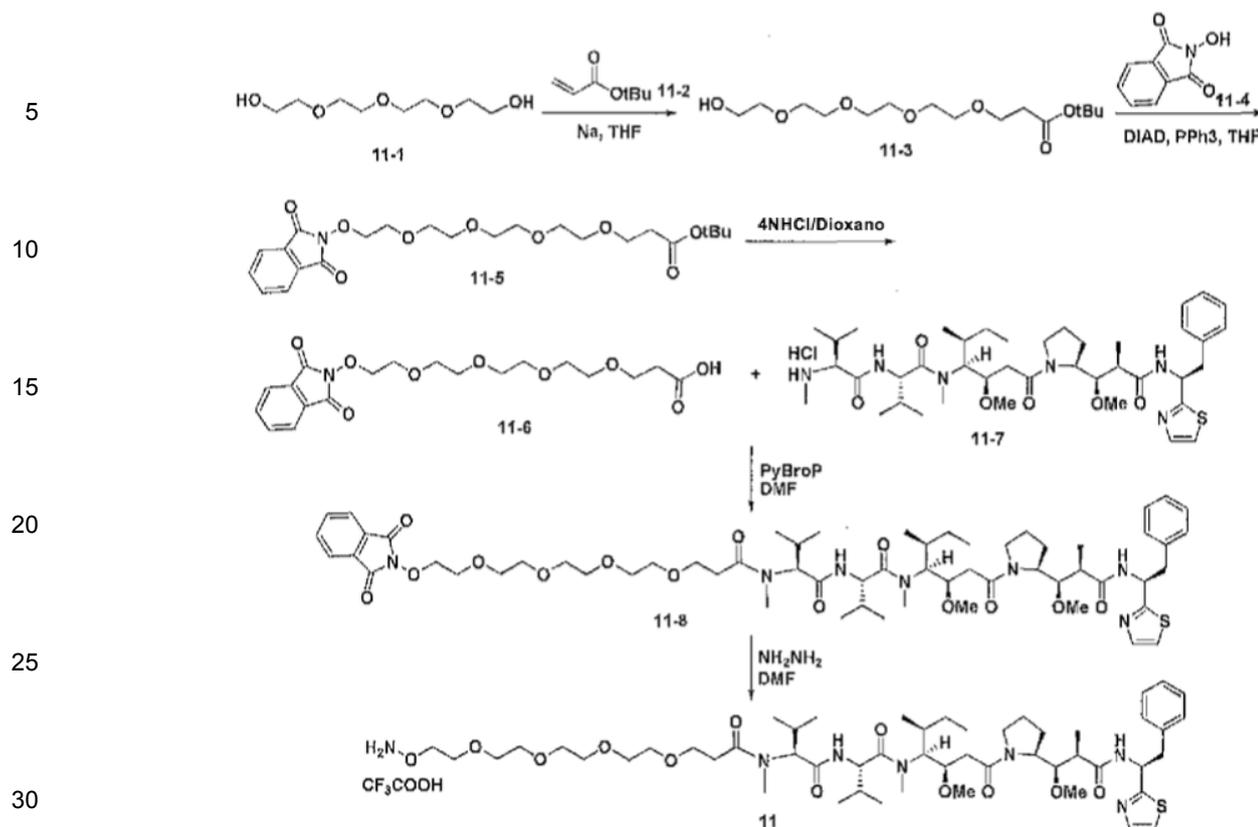
Esquema 10



[0377] Compuesto 10: El compuesto **9-3** se disuelve en 1 ml de DMF. Se añade hidrazina. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se interrumpe con una solución de hidrocloreuro IN. La mezcla de reacción se purifica por HPLC para dar el Ejemplo **10**.

Ejemplo 11: Síntesis del Compuesto 11

[0378]



35 **[0379] Compuesto 11-3:** A una solución de tetra (etilenglicol) **11-1** (40,6 ml, 235 mmol) en 100 ml de tetraedrofurano, se agregaron 47 mg de sodio. Se añadieron 12 ml de acrilato de terc-butilo después de disolver el sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se detuvo con 2 ml de 1N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 mLX1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío para dar 6,4 g (23%) del compuesto **11-3**.

40 **[0380] Compuesto 11-5:** El Compuesto **11-3** (1,0 g, 3,12 mmol), la N-hidroxiftalimida **11-4** (611 mg, 3,744 mmol) y la trifetilfosfina (1,23 g, 4,68 mmol) se disolvieron en 20 ml de tetrahidrofurano seguido por adición de DIAD (0,84 ml, 4,06 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna utilizando cartuchos SiliaSep (80 g), eluyendo con acetato de etilo al 0-100%/hexanos, para dar 1,0 g (100%) del compuesto **11-5**.

45 **[0381] Compuesto 11-6:** El compuesto **11-5** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 1,0 g del compuesto **11-6**.

50 **[0382] Compuesto 11-8:** A una solución de 30 mg (0,0372 mmol) de hidrocloreto de monometildolastatina, se agregaron 31 mg (0,0744 mmol) de compuesto **11-6** y 38,2 mg (0,082 mmol) de PyBroP en 1 ml de DMF 33 mL (0,186 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 28 mg (65%) del compuesto **11-8**. MS (ESI) m/z 785 [M+2H], 1164 [M+H].

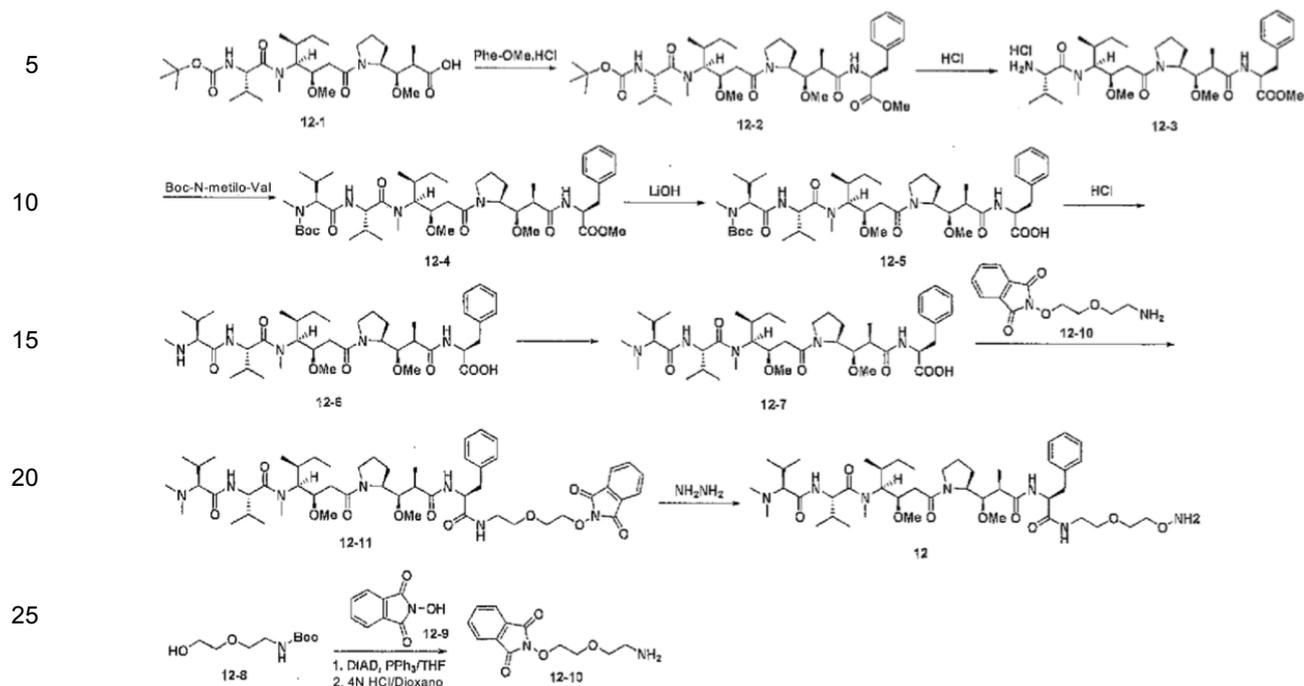
55 **[0383] Compuesto 11:** El compuesto **11-8** (28 mg, 0,024 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 23 µl (0,72 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se detuvo con una solución de hidrocloreto 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 20 mg (66%) del Compuesto 11, MS (ESI) m/z 518 [M+2H], 1034 [M+H].

Ejemplo 12: Síntesis del Compuesto 12

60 **[0384]**

65

Esquema 12



30 **[0385] Compuesto 12-2:** A una solución del compuesto **12-1** (500 mg, 0,875 mmol) en 3 ml de DMF se agregaron 283 mg de hidrocloreto de fenilalanina, 433 mg de HATU y 581 μ l de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash para dar 560 mg (76%) del compuesto **12-2**.

35 **[0386] Compuesto 12-3:** El compuesto **12-2** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 511 mg de compuesto **12-3**.

40 **[0387] Compuesto 12-4:** A una solución de compuesto **12-3** (368 mg, 0,55 mmol) en 3 ml de DMF se agregaron 255 mg de Boc-N-Metilo valina, 314 mg de HATU y 303 μ l de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se extrajo con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash para dar 370 mg (79%) del compuesto **12-4**.

45 **[0388] Compuesto 12-5:** A una solución del compuesto **12-4** (170 mg) en 10 ml de MeOH, se agregaron 5 ec. de 1N LiOH. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con 1N HCl y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para dar 150 mg (90%) del compuesto **12-5**.

50 **[0389] Compuesto 12-6:** El compuesto **12-5** se disolvió en 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío y se purificó por HPLC para dar 150 mg de compuesto **12-6**.

55 **[0390] Compuesto 12-7:** A una solución de compuesto **12-6** en DMF se le añadió formaldehído (3 ec.) y 20 ec. de ácido acético, seguido de la adición de 2 ec. de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar el compuesto **12-7**.

60 **[0391] Compuesto 12-10:** 2-(2-hidroxietoxi)etilcarbamato de terc-butilo (2,05 g, 10 mmol), N-hidroxitftavalimida (1,8 g, 11 mmol) y trifetilfosfina (3,67 g, 14 mmol) se disolvieron en 100 ml de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (2,48 ml, 12 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se trató con 50 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para obtener 2,6 g (91%) de compuesto **12-10**, MS (ESI) m/z 251 [M+H].

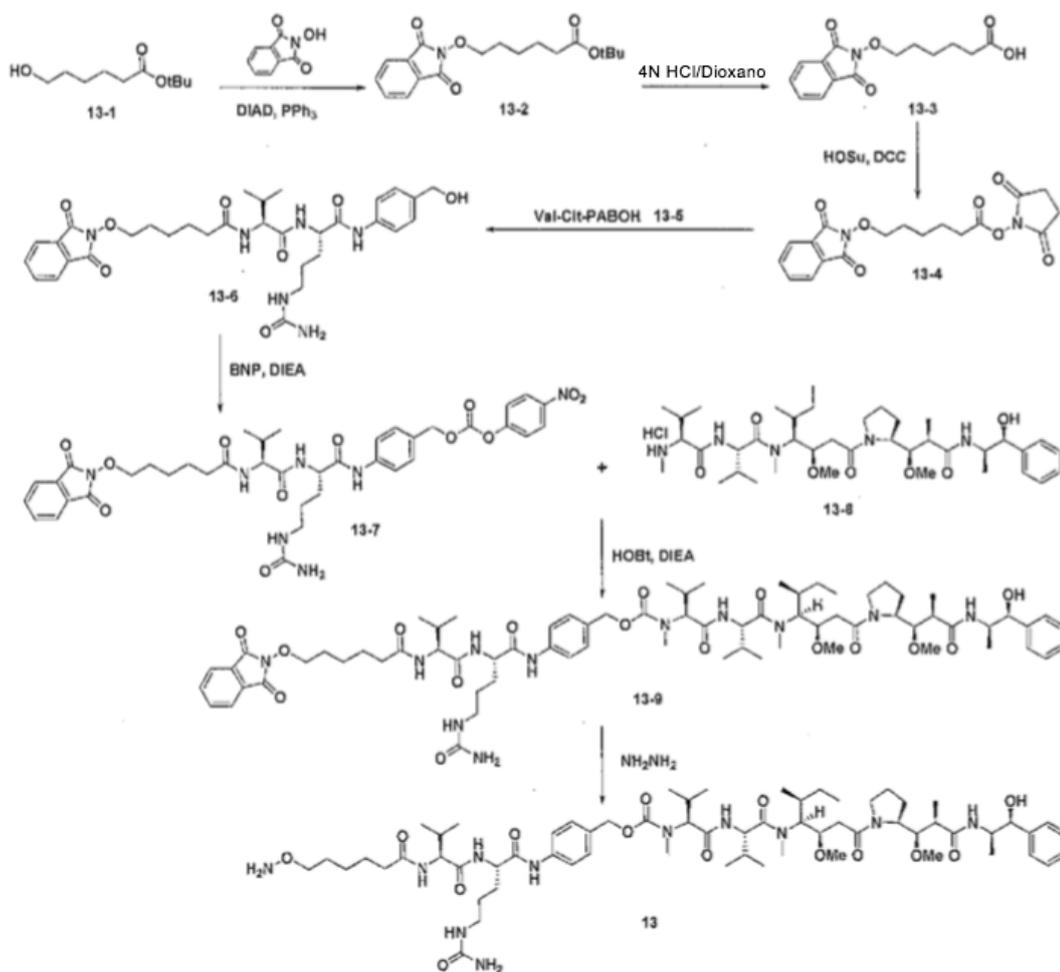
65 **[0392] Compuesto 12-11:** A una solución del compuesto **12-10** (20 mg, 0,026 mmol) en 1 ml de DMF se agregaron 11,2 mg del compuesto **12-10**, 15 mg de HATU y 23 μ l de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura

ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 20 mg (70%) del compuesto **12-4**, MS (ESI) m/z 490 [M+2H], 978 [M+H].

[0393] Compuesto 12: El compuesto **12-11** (20 mg, 0,0183 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 18 μ l (0,56 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de hidrócloruro 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 min a 254 nm, para dar 14 mg (72%) del Compuesto **12**, MS (ESI) m/z [M+2H], 848 [M+H].

Ejemplo 13: Síntesis del Compuesto 13

[0394]



[0395] Compuesto 13-2: 6-Hidroxihexanoato de terc-butilo **13-1** (1,5 g, 1,97 mmol), N-hidroxi-ftalimida (1,42 g, 8,76 mmol) y trifetilfosfina (2,82 g, 10,76 mmol) se disolvieron en 50 ml de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (2 ml, 9,564 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 2,5 g (95%) del compuesto **13-2**.

[0396] Compuesto 13-3: El compuesto **13-2** se trató con 15 ml de 4N HCl en dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas y se concentró a sequedad a vacío para dar 900 mg (100%) del compuesto **13-3**.

[0397] Compuesto 13-4: A una solución del compuesto **13-3** (900 mg, 3,0 mmol) en 10 ml de THF se agregaron 397 mg de N-hidroxisuccinimida, seguido de la adición de 669 mg de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró y se trató con 10 ml de DCM. La solución de DCM se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora y se filtró. La filtración se concentró y se purificó por cromatografía

flash en columna para dar 800 mg (71%) del compuesto **13-4**.

[0398] Compuesto 13-6: La mezcla del compuesto **13-4** (435 mg, 1,16 mmol) y Val-Cit-PABOH 13-51 (400 mg, 1,054 mmol) en 12 ml de DMF se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró y se lavó con éter. El sólido se secó al vacío para dar 660 mg (98%) del compuesto **13-6**.

[0399] Compuesto 13-7: A la solución del compuesto **13-6** (200 mg, 0,313 mmol) en 6 ml de DMF se le añadió bis(*p*-nitrofenilo)carbonato (286 mg, 0,94 mmol), seguido de la adición de 110,2 ml. de DIEA. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y se concentró. El residuo se trató con éter y se filtró. El sólido recogido se lavó con éter, ácido cítrico al 5%, agua, éter y se secó al vacío para dar 210 mg (83%) del compuesto **13-7**.

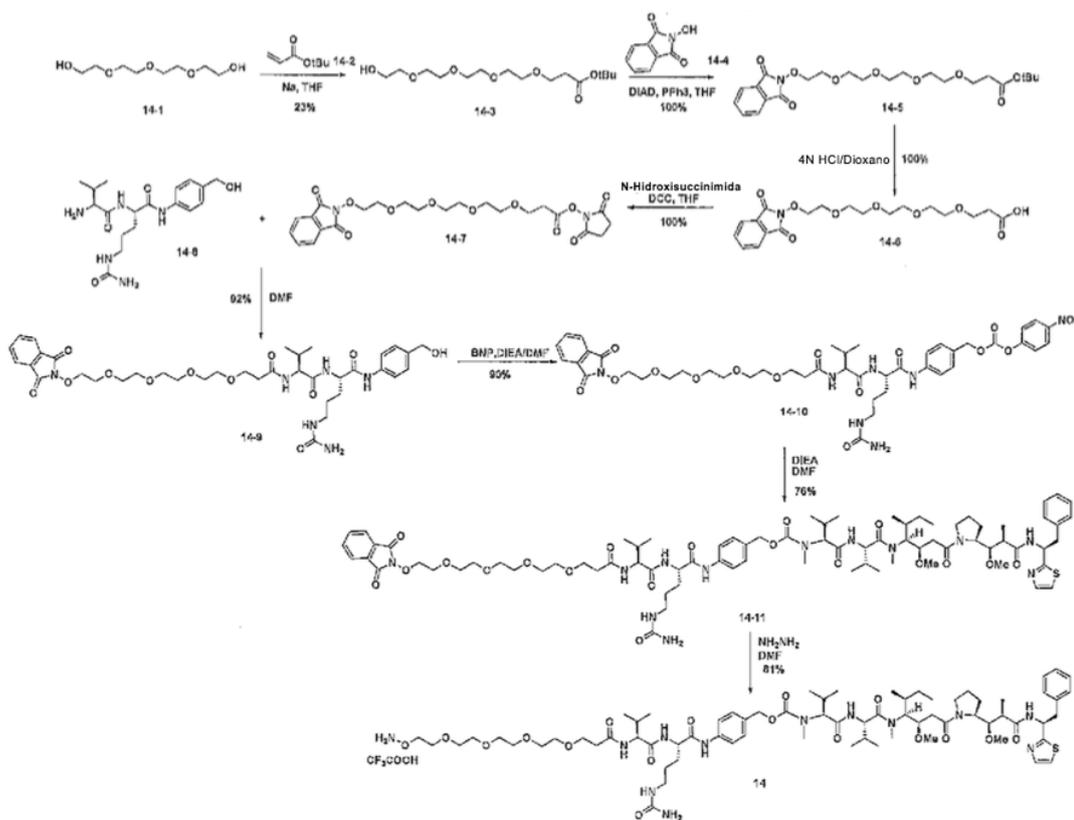
[0400] Compuesto 13-9: A una solución de sal de hidrocloreto de monometilauristatina **13-8** (100 mg, 0,1325 mmol) en 2 ml de DMF se agregó el compuesto **13-7** (159 mg, 0,2 μmol) y 10 mg de HOBt, seguido de la adición de 35,2 μL de DIEA. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se purificó por HPLC para dar 93 mg (51%) del compuesto **13-9**. MS (ESI) *m/z* 692 [M+2H], 1382 [M+H].

[0401] Compuesto 13: El compuesto **13-9** (50 mg, 0,036 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 23 μl de hidrazina. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se inactivó con solución de hidrocloreto IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 32 mg (65%) del Compuesto **13**, MS (ESI) *m/z* 638,5 [M+Na+2H], 1253,3 [M+H], 1275,8 [M+Na].

Ejemplo 14: Síntesis del Compuesto 14

[0402]

Esquema 14



5 [0403] **Compuesto 14-3:** A una solución de tetra (etilenglicol) **14-1** (40,6 ml, 235 mmol) en 100 ml de tetraedrofurano se le agregaron 47 mg de sodio. Se añadieron 12 ml de acrilato de terc-butilo después de disolver el sodio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se detuvo con 2 ml de 1N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío para dar 6,4 g (23%) del compuesto **14-3**.

10 [0404] **Compuesto 14-5:** Compuesto **14-3** (1,0 g, 3,12 mmol), N-hidroxifitalimida **14-4** (611 mg, 3,744 mmol) y se disolvieron trifenilfosfina (1,23 g, 4,68 mmol) en 20 ml de tetrahidrofurano, seguido de la adición de DIAD (0,84 ml, 4,06 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna utilizando cartuchos SiliaSep (80 g), eluyendo con acetato de etilo al 0-100%/hexanos, para dar 1,0 g (100%) del compuesto **14-5**.

15 [0405] **Compuesto 14-6:** El compuesto **14-5** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 1,0 g del compuesto **14-6**.

20 [0406] **Compuesto 14-7:** A una solución del compuesto **6** (1,93 g, 4,68 mmol) y N-hidroxisuccinimida (646 mg, 5,616 mmol) en 20 ml de tetraedrofurano, se agregaron 1,062 g (5.148 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró y se purificó por cromatografía flash en columna utilizando cartuchos SiliaSep (80 g), eluyendo con acetato de etilo al 0-100%/hexanos para dar 2,37 g (100%) del compuesto **14-7**.

25 [0407] **Compuesto 14-8:** El compuesto **14-8** se preparó de acuerdo con la bibliografía (Bioconjugat Chem. 2002, 13 (4), 855-869).

30 [0408] **Compuesto 14-9:** A una solución del compuesto **14-8** (200 mg, 0,527 mmol) en 2 ml de DMF se agregaron 295 mg (0,58 mmol) del compuesto **14-7**. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se concentró al vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para dar 402 mg (98%) del compuesto **14-9**.

35 [0409] **Compuesto 14-10:** A una solución del compuesto **14-9** (406 mg, 0,527 mmol) y carbonato de bis(*p*-nitrofenol) (481 mg, 1,58 mmol) en 10 ml de DMF, se agregaron 0,186 ml (1,054 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter, ácido cítrico al 5%, agua, éter y se secó a vacío para dar 350 mg (72%) del compuesto **14-10**.

40 [0410] **Compuesto 14-11:** A una solución de 50 mg (0,062 mmol) de hidrocloreuro de monometildolastatina, se agregaron 87,2 mg (0,093 mmol) de compuesto **14-10** y 4,7 mg (0,031 mmol) de HOBt en 1 ml de DMF 22 µL (0,124 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 41 mg (42%) del compuesto **14-11**. MS (ESI) m/z 785 [M+2H].

45 [0411] **Compuesto 14:** El compuesto **14-11** (41 mg, 0,026 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 17 µl (0,52 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con una solución de hidrocloreuro 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 min a 254 nm, para dar 22 mg (58%) del compuesto **14**. MS (ESI) m/z 720 [M+2H].

Ejemplo 15: Síntesis del Compuesto 15

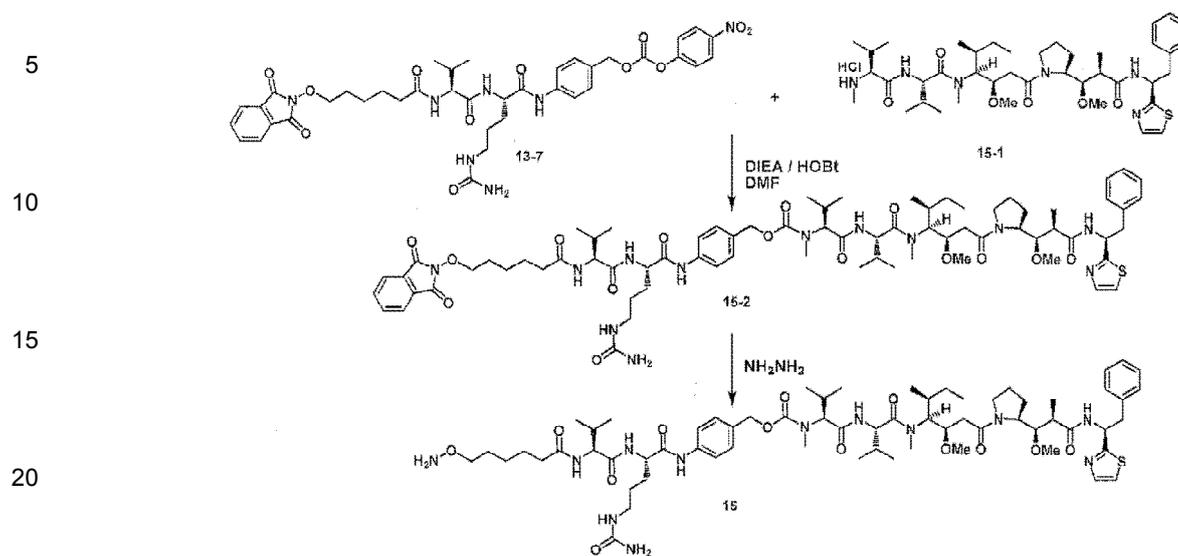
50 [0412]

55

60

65

Esquema 15



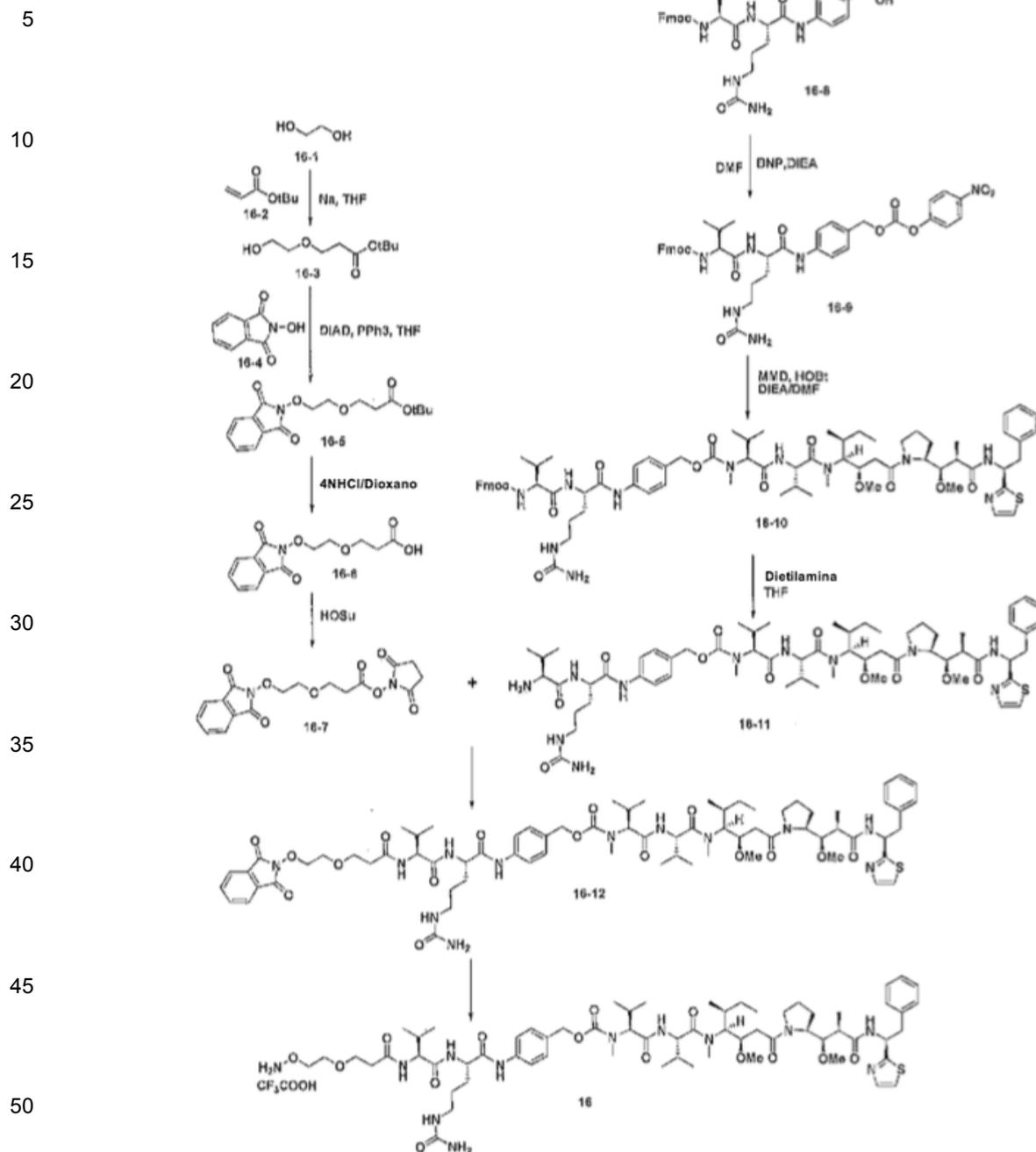
[0413] Compuesto 15-2: A una solución de 50 mg (0,062 mmol) de hidrocloreto de monometildolastatina, se agregaron 75 mg (0,093 mmol) de compuesto 13-7 y 4,7 mg (0,031 mmol) de HOBt en 1 ml de DMF 22 μ L (0,124 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 41 mg (42%) del compuesto 15-2, MS (ESI) m/z 718 [M+2H], 1435 [M+H].

[0414] Compuesto 15-2: El compuesto 15-2 (41 mg, 0,026 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 17 μ l (0,52 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de hidrocloreto IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 min a 254 nm, para dar 22 mg (58%) del ejemplo 15. MS (ESI) m/z 653 [M+2H], 1305 [M+H].

Ejemplo 16: Síntesis del Compuesto 16

[0415]

Esquema 16



55 **[0416] Compuesto 16-3:** A una solución de etilenglicol **16-1** (13,1 ml, 235 mmol) en 100 ml de tetraedrofurano, se
 agregaron 47 mg de sodio. Se añadieron 12 ml de acrilato de terc-butilo después de disolver el sodio. La mezcla de
 60 reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se
 detuvo con 2 µl de 1N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 mLX1, 50 mL
 X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El
 residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 5,2 g (24%) del compuesto **16-3**.

[0417] Compuesto 16-5: El compuesto **16-3** (2,0 g, 10,5 mmol), se disolvió N-hidroxifthalimida (2,05 g, 12,6 mmol) y
 65 trifetilfosfina (3,58 g, 13,65 mmol) en 50 ml de tetrahidrofurano seguido de la adición de DIAD (3,26 ml, 15,75 mmol)
 a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El
 residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar el compuesto **16-5**.

[0418] **Compuesto 16-6:** El compuesto **16-5** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar el compuesto **16-6**.

[0419] **Compuesto 16-7:** A una solución del compuesto **16-6** (5.16 mmol) y N-hidroxisuccinimida (722 mg, 6,7 mmol) en 20 ml de tetraedrofurano se añadieron 1,28 g (6,2 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida para dar 500 mg de compuesto **16-7**.

[0420] **Compuesto 16-8:** El compuesto **16-8** se preparó de acuerdo con la bibliografía (Bioconjugat Chem. 2002, 13 (4), 855-869).

[0421] **Compuesto 16-9:** A una solución del compuesto **16-8** (5,0 g, 8,3 mmol) y carbonato de bis(*p*-nitrofenol) (7,6 g, 25 mmol) en 100 ml de DMF se agregaron 2,92 ml (16,6 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter, ácido cítrico al 5%, agua, éter y se secó a vacío para dar 5,0 g (81%) del compuesto **16-9**.

[0422] **Compuesto 16-10:** A una solución de 1,0 g (1,24 mmol) de hidrocloreuro de monometildolastatina, se agregaron 1,42 g (1,8575 mmol) del compuesto **16-9** y 95 mg (0,62 mmol) de HOBt en 10 ml de DMF 437 mL (2,48 mmol) de diisopropiletilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 1,0 g (58%) del compuesto **16-10**, MS (ESI) *m/z* 700 [M+2H], 1398 [M+H].

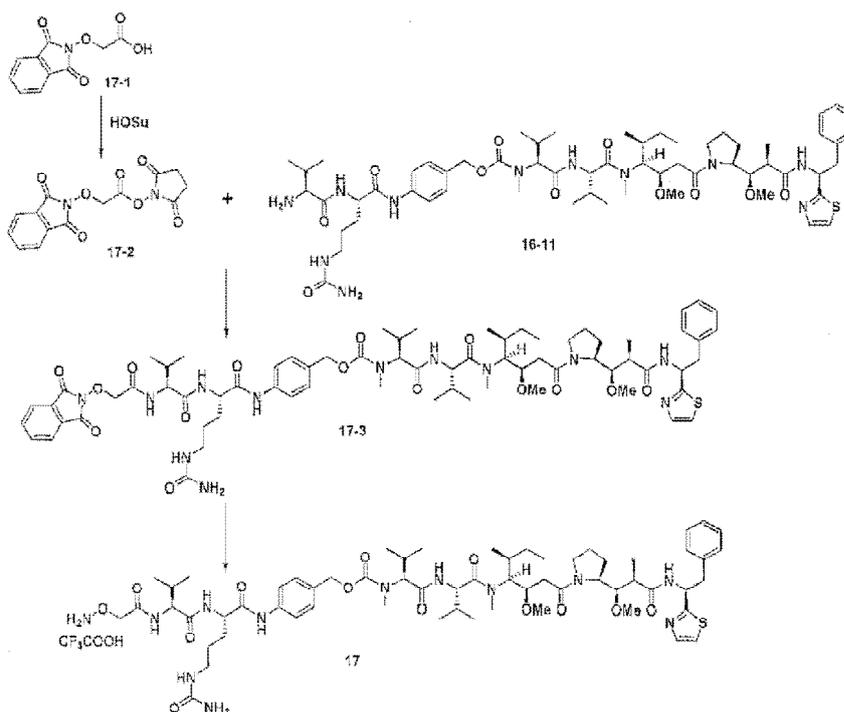
[0423] **Compuesto 16-11:** A una solución del compuesto **16-10** (1,0 g, 0,715 mmol) en 15 ml de tetraedrofurano, se agregaron 5 ml (48 mmol) de dietilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en 20 ml de DCM, se trató con 200 ml de éter y se filtró, se secó con éter y se secó al vacío para dar 860 mg del compuesto **16-11**. MS (ESI) *m/z* 589 [M+2H], 1176 [M+H].

[0424] **Compuesto 16:** A una solución de 50 mg (0,0425 mmol) del compuesto **16-11** en 1 ml de DMF se agregaron 32 mg (0,085 mmol) del compuesto **16-7**. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La HPLC y la MS mostraron reacción realizada. Se añadieron 27,2 ml (0,85 mmol) de hidrazina anhidra a la mezcla de reacción. La reacción se realizó en 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con 1N HCl y se purificó por HPLC para dar 40 mg (66%) del compuesto **16**. MS (ESI) *m/z* 654 [M+2H], 1307 [M+H].

Ejemplo 17: Síntesis del Compuesto 17

[0425]

Esquema 17



[0426] **Compuesto 17-2:** A una solución del compuesto **17-1** (1,0 g, 4,52 mmol) y N-hidroxisuccinimida (572 mg, 4,97 mmol) en 20 ml de tetraedrofurano se le agregaron 1,12 g (5,424 mmol) de DCC. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se filtró. La filtración se concentró para dar el compuesto **17-2**.

5 [0427] **Compuesto 17:** A una solución de 50 mg (0,0425 mmol) del compuesto **16-11** en 1 ml de DMF, se agregaron 41 mg (0,1275 mmol) del compuesto **17-2**. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La HPLC y la MS mostraron reacción realizada. Se añadieron 20 μ l (0,625 mmol) de hidrazina anhidra a la mezcla de reacción. La reacción se realizó en 2 horas. La mezcla de reacción se acidificó con IN HCl y se purificó por HPLC para dar 35 mg (60%) del compuesto **17**. MS (ESI) m/z 625 [M+2H], 1249 [M+H].

10

Ejemplo 18: Síntesis del Compuesto 18

[0428]

15

Esquema 18

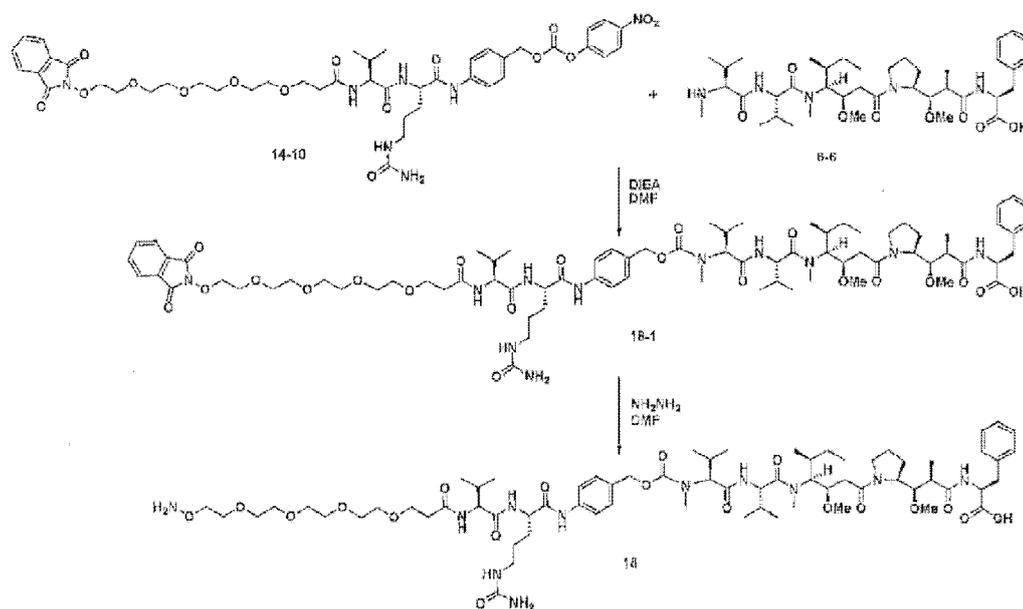
20

25

30

35

40



[0429] **Compuesto 18-1:** A una solución del compuesto **6-6**, se añadieron diisopropiletilamina a una solución de compuesto **14-10** y HOBt en 1 ml de DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar el compuesto **18-1**.

45

[0430] **Compuesto 18:** El compuesto **18-1** se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadió hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se detuvo con una solución de hidrócloruro IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar el compuesto **18**.

50

Ejemplo 19: Síntesis del Compuesto 19

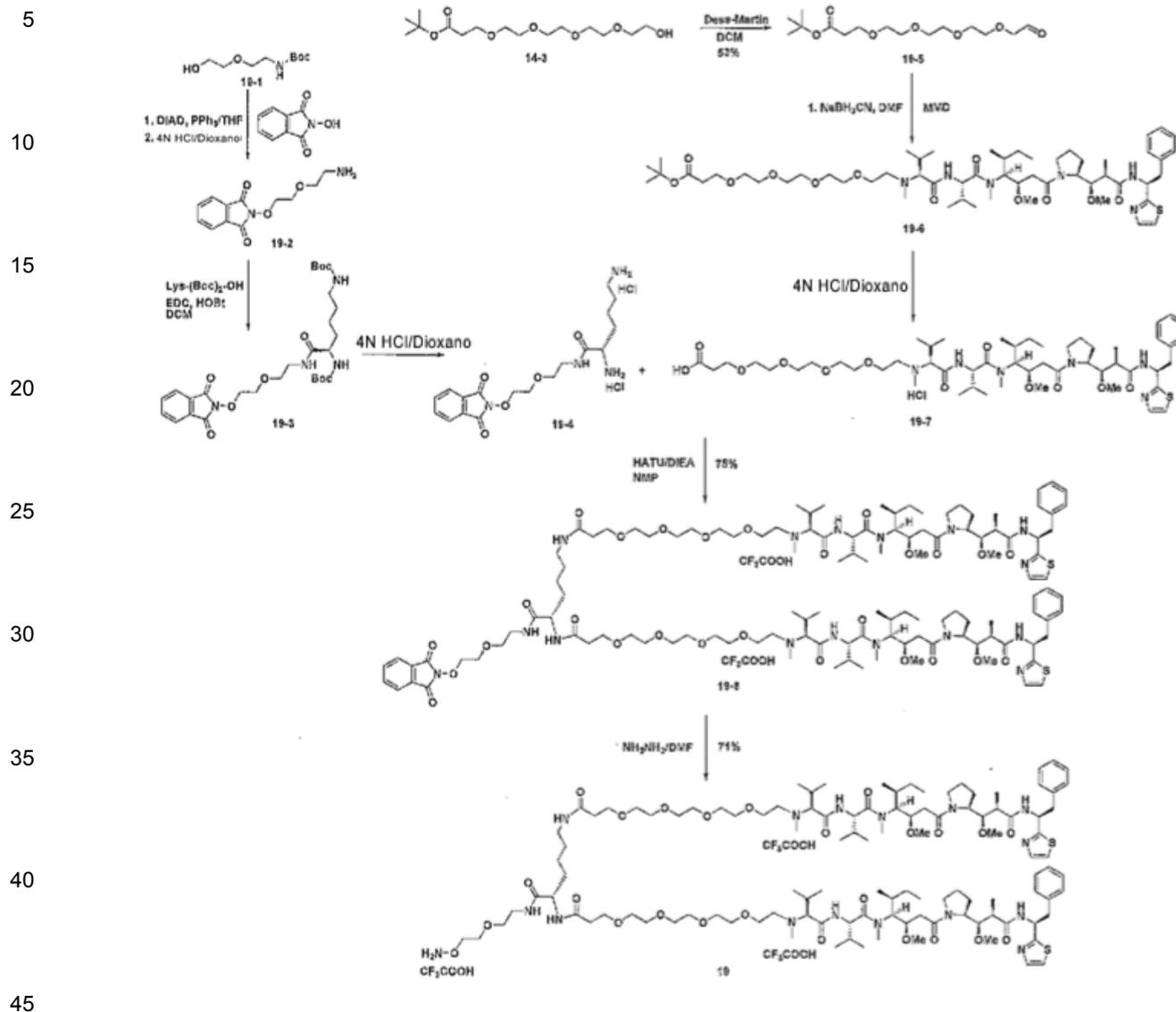
[0431]

55

60

65

Esquema 19



[0432] **Compuesto 19-2:** 2-(2-hidroxietoxi)etilcarbomato de terc-butilo 13 (2,05 g, 10 mmol), N-hidroxiftavalimida (1,8 g, 11 mmol) y trifetilfosfina (3,67 g, 14 mmol) se disolvieron en 100 ml de tetrahydrofurano seguido de la adición de DIAD (2,48 ml, 12 mmol) a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche y luego se concentró a sequedad. El residuo se trató con 50 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para obtener 2,6 g (91%) de compuesto **19-2**, MS (ESI) m/z 251 [M+H].

[0433] **Compuesto 19-3:** A la mezcla del compuesto **19-2** (315 mg, 1,1 mmol), Boc-Lys (Boc)-OH (365 mg, 1 mmol), EDC (382 mg, 2 mmol) y HOBt (306 mg, 2 mmol) en 10 ml de DCM se agregaron 1,056 ml (6 mmol) de diisopropilammina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y se extrajo con acetato de etilo, se lavó con ácido cítrico al 5%, se saturó con bicarbonato de sodio, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida utilizando cartuchos de SiliaSep (40 g), eluyendo con 0-100% de acetato de etilo/hexanos, para dar 405 mg (70%) de compuesto **19-3**.

[0434] **Compuesto 19-4:** El compuesto **19-3** se disolvió en 15 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 315 mg (98%) del compuesto **19-4**, MS (ESI) m/z 379 [M+H].

[0435] **Compuesto 19-5:** A una solución de compuesto **14-3** (322 mg, 1 mmol) en 20 ml de diclorometano se le

añadió Periodinano Dess-Martin (636 mg, 1,5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se detuvo con una solución de tiosulfato de sodio (1,4 g, 8,85 mmol) en 15 ml de bicarbonato de sodio saturado. La mezcla se separó. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna utilizando cartuchos SiliaSep (40 g), eluyendo con 0-100% acetato de etilo/hexanos para dar 170 mg (53%) del compuesto **19-5**.

[0436] Compuesto 19-6: A una solución de hidrocloreuro de monometildolastatina, se agregaron 1,19 g (3,72 mmol) del compuesto 17 a 1 g (1,24 mmol) en 20 ml de DMF, seguido de 1,4 ml (24,8 mmol) de ácido acético y 156 mg (2,48 mmol) de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. El residuo se ajustó a pH 8 con bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida usando cartuchos de SiliaSep (40 g), eluyendo con 0-5, % de metanol/DCM para dar 680 mg (51%) del compuesto **19-6**, MS (ESI) m/z 538 [M+2H], 1075 [M+H].

[0437] Compuesto 19-7: A una solución del compuesto **19-6** (680 mg, 0,632 mmol) en 5 ml de DCM se agregaron 20 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para dar 660 mg (98%) del compuesto **19-7**, MS (ESI) m/z 510 [M+2H], 1019 [M+H].

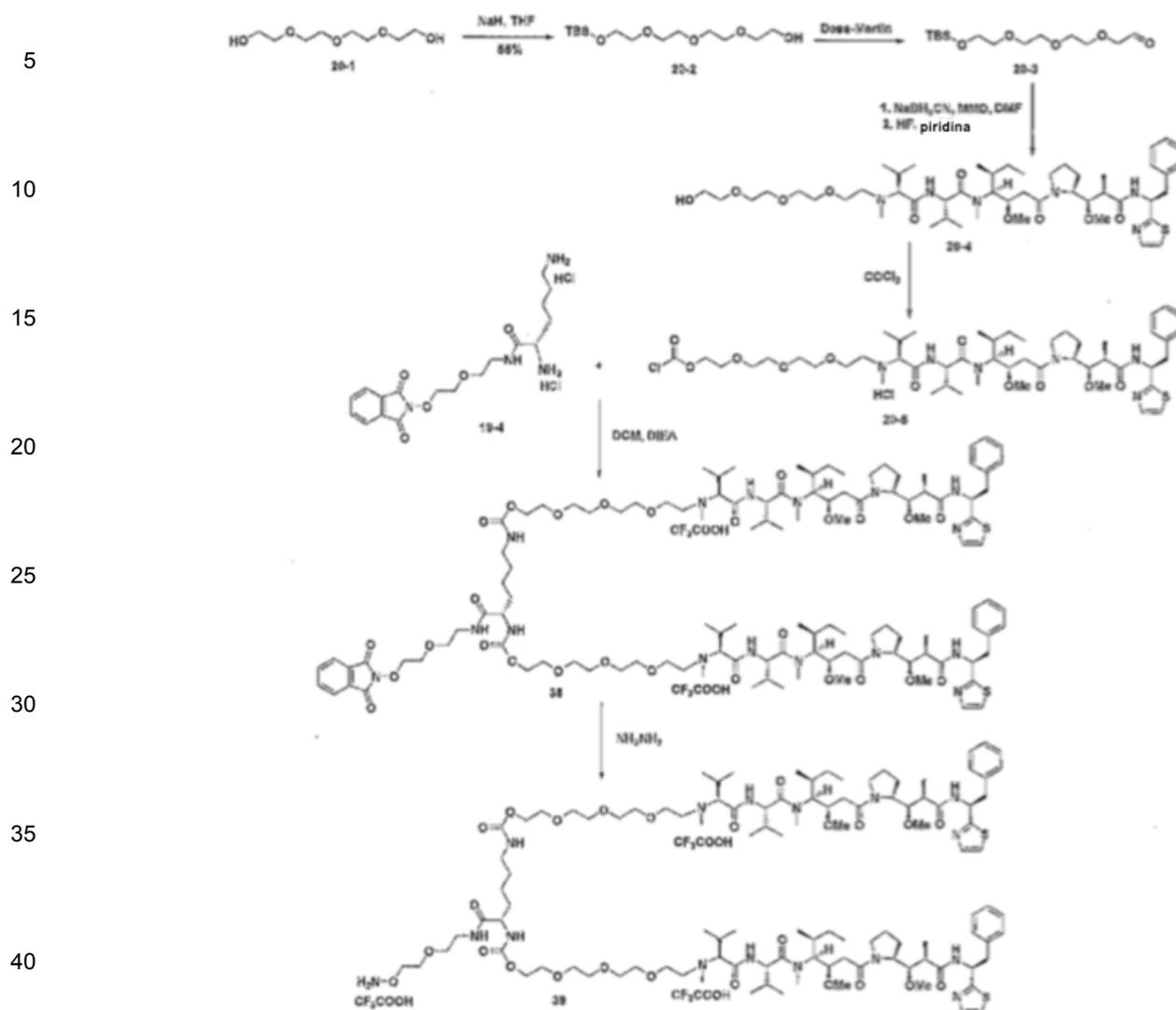
[0438] Compuesto 19-8: A una solución del compuesto **19-7** (280 mg, 0,257 mmol), compuesto 19-4 (38 mg, 0,0857 mmol) y N-metilmorfolina (0,283 ml, 2,57 mmol) en 5 ml de Se añadió N-metilpirrolidinona 98 mg (0,257 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 160 mg (71%) del compuesto **19-8**, MS (ESI) m/z 596 [M+4H], 794 [M+3H], 1191 [M+2H].

[0439] Compuesto 19: El compuesto **19-8** (160 mg, 0,0613 mmol) se disolvió en 1,5 ml de DMF. Se añadieron 20 ml (0,613 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se detuvo con una solución de hidrocloreuro IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 120 mg (75%) del compuesto 19. MS (ESI) m/z 451 [M+5H], 563 [M+4H], 751 [M+3H], 1126 [M+2H].

Ejemplo 20: Síntesis del Compuesto 20

[0440]

Esquema 20



[0441] Compuesto 20-2: A una solución de tetra (etilenglicol) **20-1** (8,0 g, 41,2 mmol) en 100 ml de tetraedrofurano, se agregaron 1,65 g de hidruro de sodio a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 6,21 g de TBS-Cl a esta solución. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se detuvo con 2 ml de 1N HCl. El residuo se suspendió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo (100 mL X1, 50 mL X2). La capa orgánica se combinó y se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 5,7 g de compuesto **20-2**.

[0442] Compuesto 20-3: A una solución de compuesto **20-2** (500 mg, 1,62 mmol) en 30 ml de diclorometano se le añadió Periodinano Dess-Martin (1,03 g, 2,43 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se detuvo con una solución de tiosulfato de sodio (1,4 g, 8,85 mmol) en 15 ml de bicarbonato de sodio saturado. La mezcla se separó. La capa orgánica se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 400 mg de compuesto **20-3**.

[0443] Compuesto 20-4: A una solución de 213 mg hidrocloreuro de monometildolastatina, se agregaron 245 mg (0,75 mmol) de compuesto **20-3** (0,263 mmol) en 4 ml de DMF seguido de 0,303 mL (5 mmol) de ácido acético y 34 mg (0,5 mmol) de cianoborohidruro de sodio. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se eliminó a vacío. Se añadieron 3 ml de acetonitrilo al 60%, seguido de 0,2 ml de HF, piridina a 0°C. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente orgánico se eliminó a vacío. El residuo se ajustó a pH 8 mediante bicarbonato de sodio y se extrajo con DCM, se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar

160 mg de compuesto **20-4**. MS (ESI) m/z 474 [M+2H], 947 [M+H].

[0444] Compuesto 20-5: A una solución del compuesto **20-4** (50 mg, 0,062 mmol) en 4 ml de DCM, se agregaron 0,3 ml de foseno/tolueno a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 3 horas y se concentró al vacío para la siguiente etapa sin purificación.

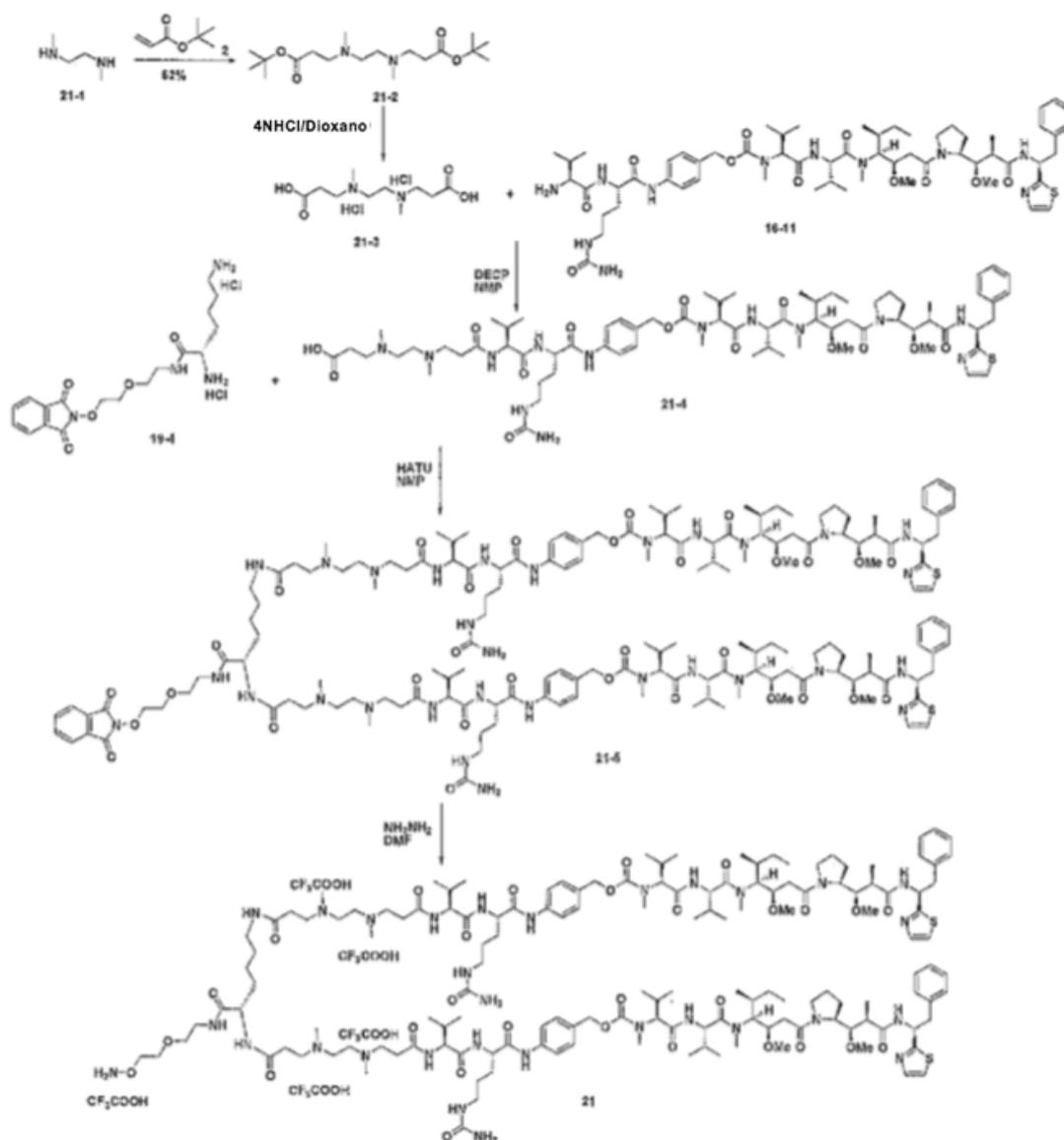
[0445] Compuesto 20-6: A una solución del compuesto **19-4** (7,6 mg, 0,017 mmol) y el compuesto **20-5** (0,062 mmol) se agregaron 25 µl de diisopropiltilamina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 33 mg del compuesto **20-6**, MS (ESI) m/z 582 [M+4H], 775 [M+3H], 1163 [M+2H].

[0446] Compuesto 20: El Compuesto **20-6** (33 mg, 0,014 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 14 µl (0,43 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de hidrocioruro IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 min a 254 nm, para dar 10 mg del compuesto **20**. MS (ESI) m/z 549 [M+4H], 732 [M+3H], 1098 [M+2H].

Ejemplo 21: Síntesis del Compuesto 21

[0447]

Esquema 21



5 [0448] **Compuesto 21-2:** La mezcla de *N,N'*-dimetileno diamina **21-1** (5 ml, 46,5 mmol) y acrilato de terc-butilo 13 ml (116 mmol) se calentó a 85°C durante 1 hora. Se añadieron otros 13 ml (116 mmol) de acrilato de terc-butilo. La mezcla de reacción se calentó de forma continua a 85°C durante 1 hora y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo se diluyó con hexanos y se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida utilizando cartuchos SiliaSep (120 g), eluyendo con metanol al 0-5%/DCM para dar 10,1 g (62%) del compuesto **21-2**, MS (ESI) m/z 345 [M+H].

10 [0449] **Compuesto 21-3:** A una solución del compuesto **21-2** (5,0 g, 14,5 mmol) en 50 ml de DCM, se agregaron 40 ml de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días y se concentró al vacío. El residuo se trató con éter, se filtró, se lavó con éter y se secó al vacío para dar 4,3 g (97%) del compuesto **21-3**.

15 [0450] **Compuesto 21-4:** A una solución de 166 mg (0,544 mmol) de compuesto **21-3** y 0,15 ml de N-metilmorfolina en 10 ml de N-metilpirralidinona, se agregaron 160 mg del compuesto **16-11**, seguido de 0,068 mL (0,408 mmol) de DECP. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con un 35-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 100 mg (50%) del compuesto **21-4**, MS (ESI) m/z 464 [M+3H], 696 [M+2H], 1391 [M+H].

20 [0451] **Compuesto 21-5:** A una solución del compuesto 19-4 (11 mg, 0,025 mmol), compuesto **21-4** (115 mg, 0,077 mmol) y N-metilmorfolina (0,028 mL, 0,25 mmol) en 1,5 mL de Se añadió N-metilpirrolidinona 29,3 mg (0,077 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 60 mg (67%) del compuesto **21-5**, MS (ESI) m/z 625 [M+5H], 781 [M+4H], 1041 [M+3H].

25 [0452] **Compuesto 21:** El compuesto **21-5** (60 mg, 0,014 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 7 ml (0,21 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de hidrocloreuro IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 29 mg (58%) del compuesto **21**. MS (ESI) m/z 599 [M+5H], 749 [M+4H], 998 [M+3H].

Ejemplo 22: Síntesis del Compuesto 22

35 [0453]

40

45

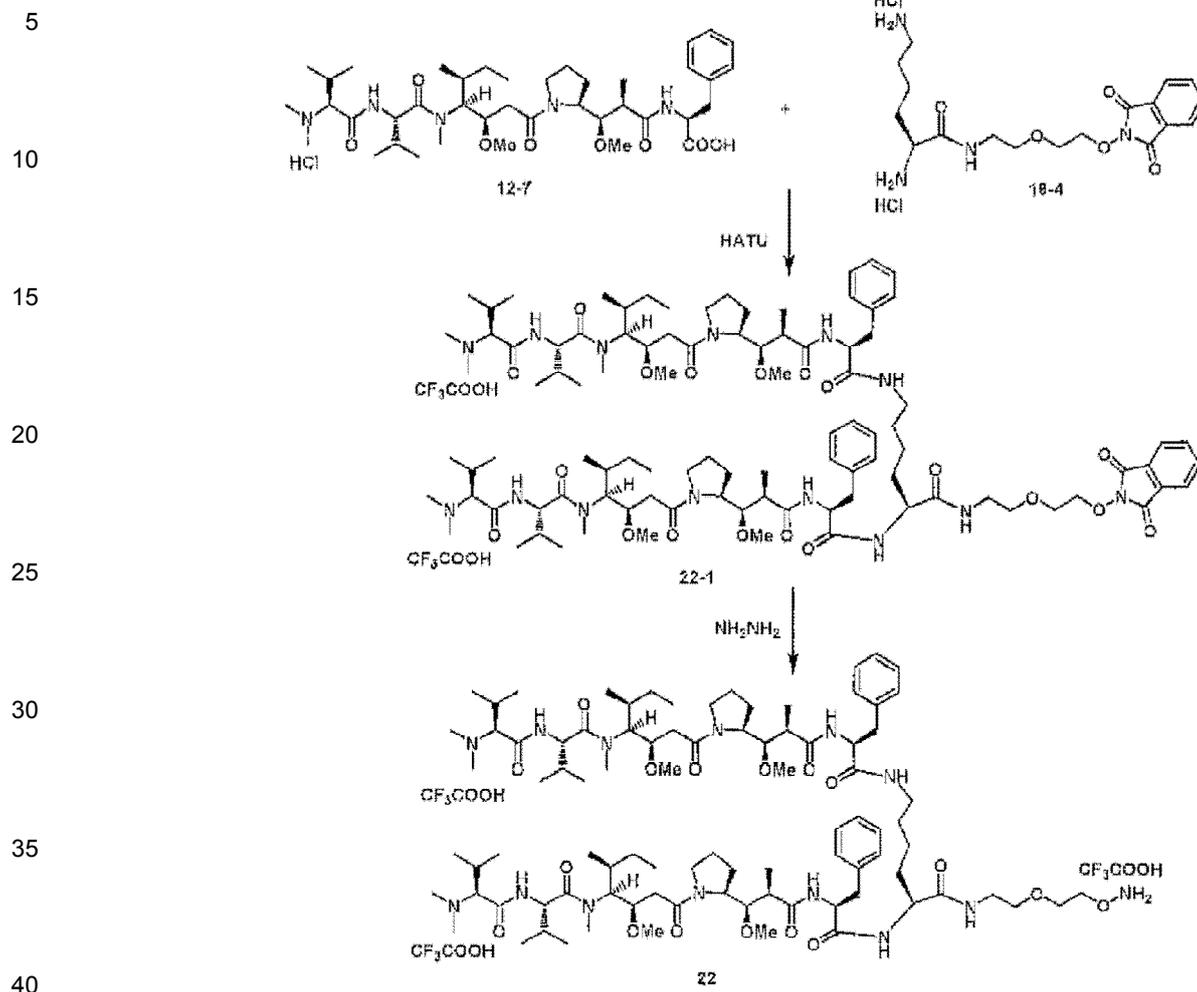
50

55

60

65

Esquema 22



45 **[0454] Compuesto 22-1:** A una solución del compuesto 19-4 (7,6 mg, 0,017 mmol), el compuesto 12-7 (40 mg, 0,051 mmol) y DIEA (0,030 mL, 0,17 mmol) en 2 ml de DMF fue Se agregaron 32 mg (0,085 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ en 20 minutos a 254 nm, para dar 24 mg (68%) del compuesto 22-1, MS (ESI) m/z 612 [M+3H], 917 [M+2H], 1834 [M+H].

50 **[0455] Compuesto 22:** El Compuesto 22-1 (24 mg, 0,012 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 12 ml (0,36 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de hidrocioruro 1N. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ en 20 min a 254 nm, para dar 15 mg (58%) del Ejemplo 21. MS (ESI) m/z 569 [M+3H], 852 [M+2H], 1726 [M+2H].

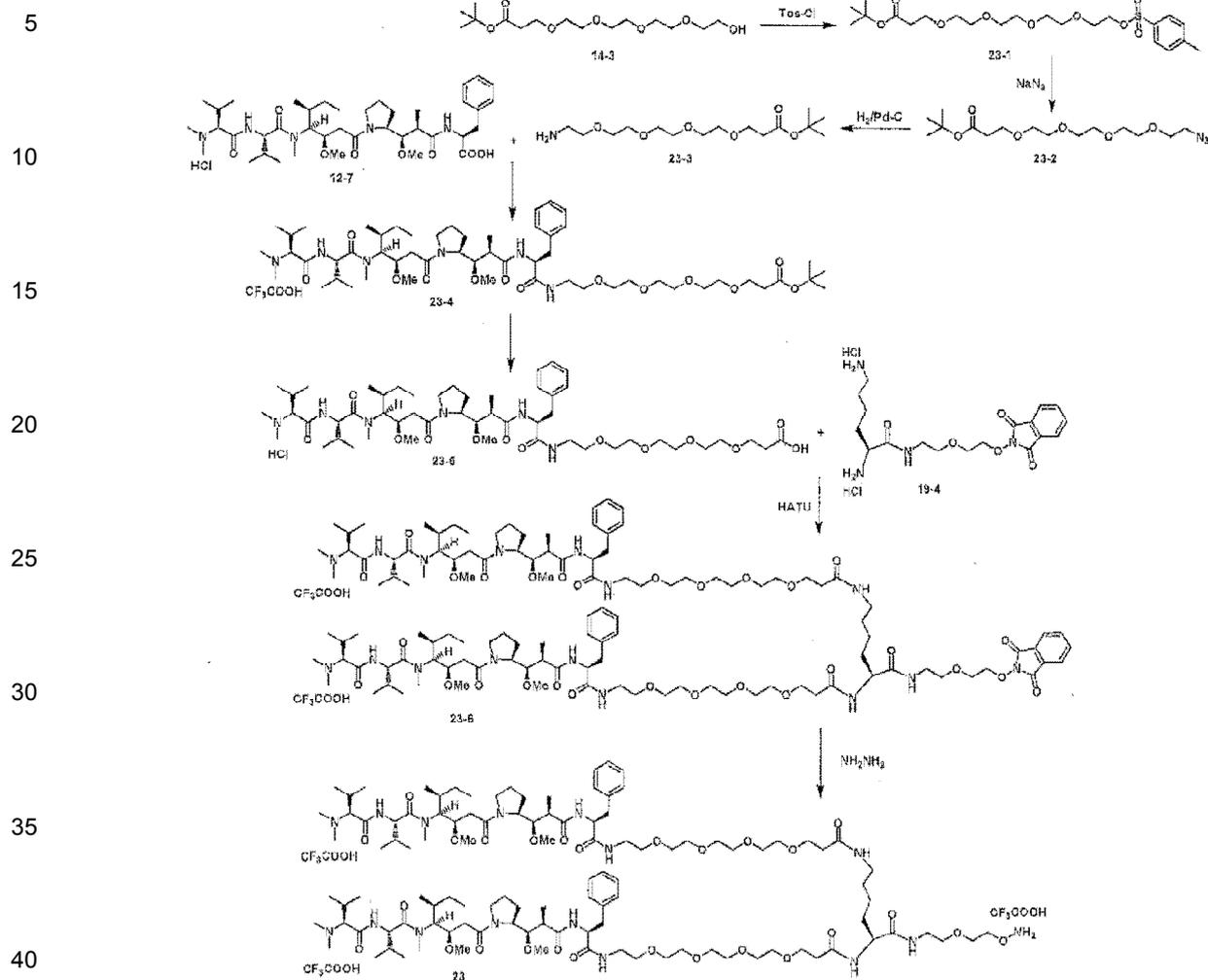
55 **Ejemplo 23: Síntesis del Compuesto 23**

60 **[0456]**

65

65

Esquema 23



[0457] Compuesto 23-1: A una solución de compuesto **14-3** (4,0 g, 12,4 mmol) y 6,6 mL (37,2 mmol) de DIEA en 50 mL de DCM se agregaron 3,31 g de cloruro de toluensulfonilo a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se combinó y se lavó con ácido cítrico al 5%, agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 3,5 g del compuesto **23-1**.

[0468] Compuesto 23-2: A una solución de compuesto **23-1** (3,5 g, 7,34 mmol) en 20 mL de DMF se le añadió azida de sodio (1,44 g, 22,02 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 50°C durante 2 días. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía flash en columna para dar 2,1 g del compuesto **23-2**.

[0469] Compuesto 23-3: A una solución del compuesto **23-2** (2,1 g, 6,05 mmol) en 50 mL de MeOH, se agregaron 400 mg (10%) de EP-C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo 1 atm H₂ durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtró y se concentró al vacío para dar 2,1 g del compuesto **23-3**, MS (ESI) m/z 322 [M+H].

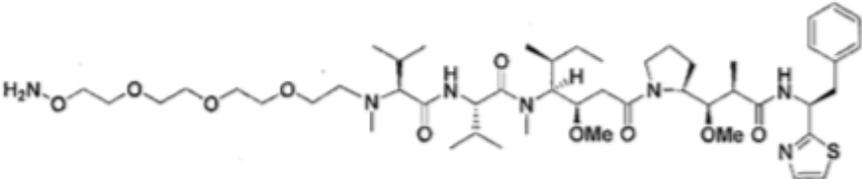
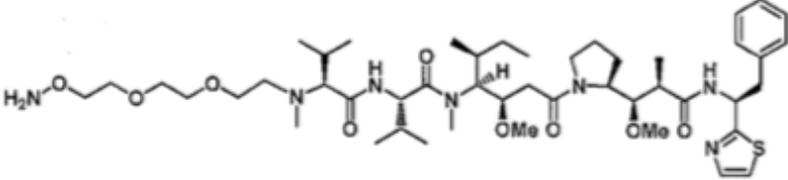
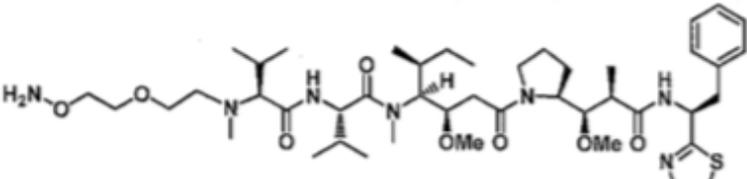
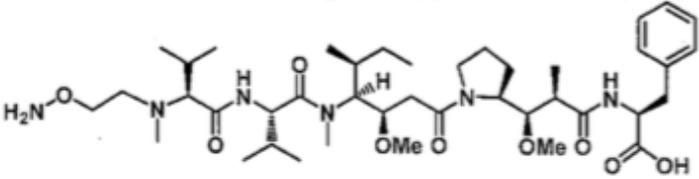
[0460] Compuesto 23-4: A una solución del compuesto **23-3** (33 mg, 0,102 mmol), compuesto **12-7** (40 mg, 0,051 mmol) y 54 mL de diisopropiltilamina en 1 mL de DMF se agregaron 38 mg de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC para dar 52 mg del compuesto **23-4**, MS (ESI) m/z 525 [M+2H], 1049 [M+H].

[0461] Compuesto 23-5: El compuesto **23-4** (52 mg, 0,045 mmol) se disolvió en 5 mL de 4N HCl/dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y se concentró al vacío para dar 52 mg (100%) del compuesto **23-5**, MS (ESI) m/z 497 [M+2H], 993 [M+H].

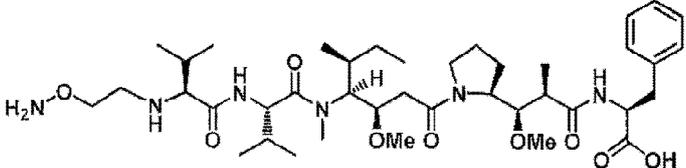
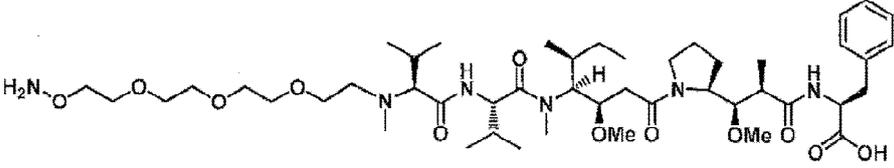
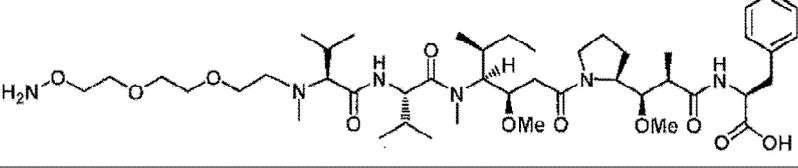
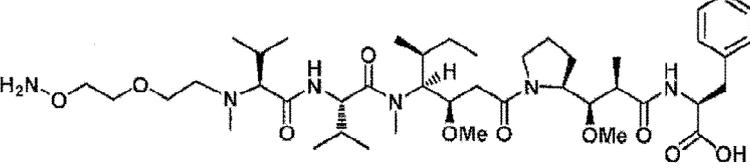
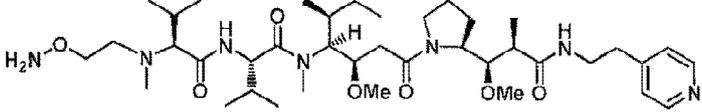
[0462] Compuesto 23-6: A una solución del compuesto **19-4** (7,6 mg, 0,017 mmol), compuesto **23-6** (52 mg, 0,051 mmol) y se añadió DIEA (0,030 ml, 0,17 mmol) en 2 ml de DMF 32 mg (0,085 mmol) de HATU. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó por HPLC, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 minutos a 254 nm, para dar 26 mg (61%) del compuesto 23-6, MS (ESI) m/z 583 [M+4H], 777 [M+3H], 1165 [M+2H].

[0463] Compuesto 23: El compuesto **23-6** (26 mg, 0,01 mmol) se disolvió en 1 ml de DMF. Se añadieron 10 ml (0,31 mmol) de hidrazina anhidra. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con solución de hidrócloruro IN. La mezcla de reacción se purificó por HPLC preparativa, eluyendo con 20-70% de CH₃CN/H₂O en 20 min a 254 nm, para dar 10 mg (40%) del Ejemplo 23, MS (ESI) m/z 550 [M+4H], 733 [M+3H], 1100 [M+2H].

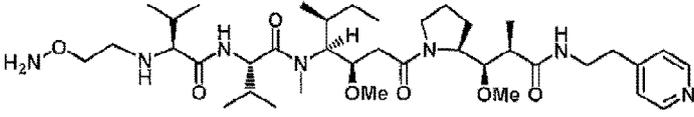
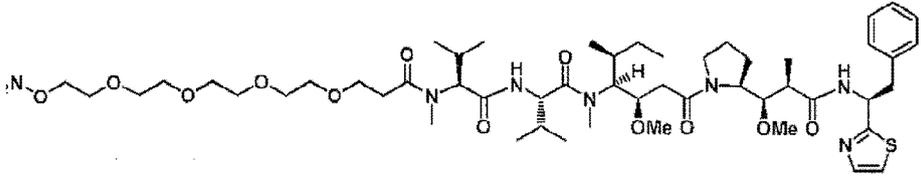
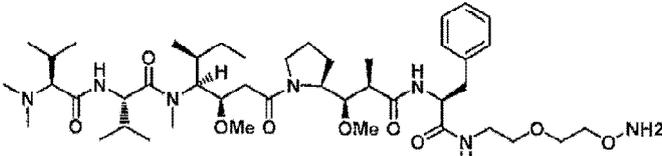
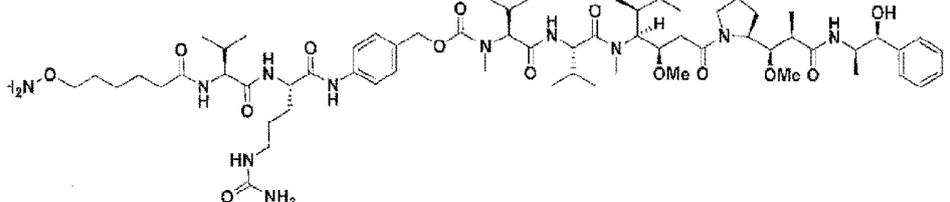
Tabla 3. Estructuras de los compuestos 1-23

Ejemplo	Estructura
1	
2	
3	
4	

(Continuado)

<p>5</p>	
<p>6</p>	
<p>7</p>	
<p>8</p>	
<p>9</p>	

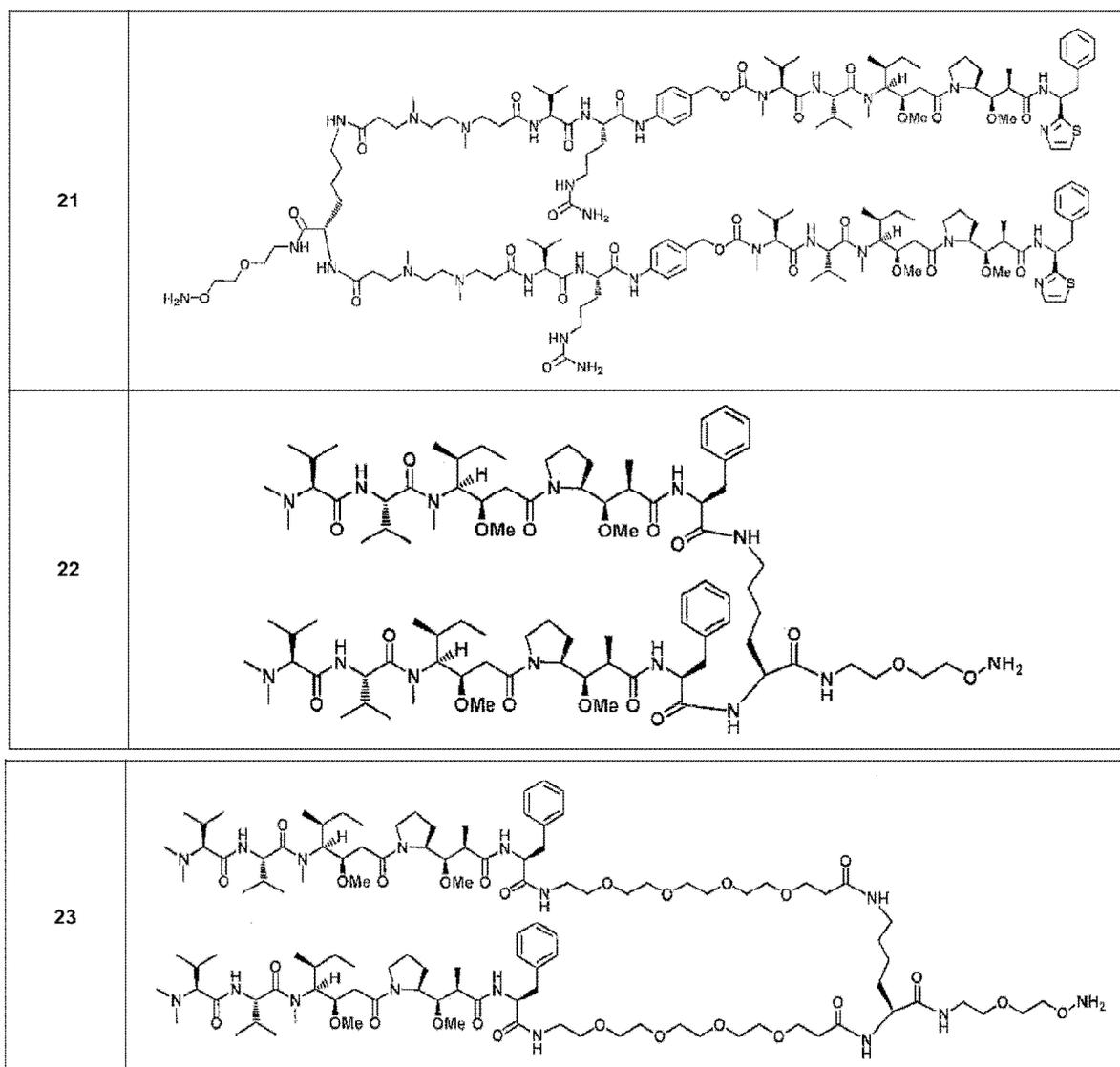
(Continuado)

<p>10</p>	
<p>11</p>	
<p>12</p>	
<p>13</p>	

(Continuado)

<p>18</p>	
<p>19</p>	
<p>20</p>	

(Continuado)

**Ejemplo 24: Transfección transitoria**

[0464] El cultivo de CHO-S se siembra a $0,75 \times 10^6$ /ml aproximadamente 16 horas antes de la transfección en medio FreeStyle Cho. Las células están listas para transfectar al día siguiente cuando el recuento de células ha alcanzado $1,4-1,6 \times 10^6$ /mL. Cuando las células alcanzan el recuento objetivo, se añaden 400 mM de stock de pAF a una concentración de cultivo final de 1,4 mM. El complejo PEI/ADN se prepara como se describe: el ADN ($1,42 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ células) se disuelve en RPMI (5% (v/v) del volumen de cultivo total), la mezcla de ADN/RPMI se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se añade la reserva de PEI (1 mg/ml) a la solución de ADN en una proporción de 3:1 (ml de PEI/ug ADN) y la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. El cultivo se agrega suavemente a la mezcla y se agita. Los matraces se transfieren a una incubadora a 32°C . En el día 6 posterior a la transfección, se realiza un análisis de transferencia Western. En el día 7 después de la transfección, se recoge el sobrenadante.

Ejemplo 25: Estudio de eficacia *in vivo* de CD70-ADC

[0465] La eficacia antitumoral de CD70-2H5-HA119-NCA1 conjugada con NCA1 se ensayó en un modelo de ratón con carcinoma de células renales. 786-0, células de carcinoma de células renales humanas, se transfirieron como fragmento de tumor para 2 pases *in vivo* a ratones hembra, de 5 semanas de edad, desnudos. Los ratones, diez por

grupo de prueba, se trataron con diferentes dosis de CD70-2H5-HA119-NCA1 en una formulación de histidina 50 mM, NaCl 100 mM, trehalosa al 5%, pH 6,0 y se midieron contra el vehículo de prueba de la formulación sin ADC por vía intravenosa una vez en el primer día del estudio. Los ratones se pesaron y se midieron para determinar el tumor en tres dimensiones usando un calibrador electrónico. El volumen del tumor individual se calculó como alturaXanchuraXlongitud. Los ratones con tumores vascularizados (determinados por la aparición de los tumores) de tamaños apropiados se asignaron al azar a grupos de tratamiento y se dosificaron por peso corporal individual en el Día 33 (tres (3) semanas después de la inyección con células). Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 2.

Tabla 4: Grupos de prueba para estudio de eficacia *in vivo* de CD70

Grupo	Tratamiento	Dosis	Concentración	Volumen de dosis	Vía	Dosificación
1	Vehículo	N/A	N/A	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
2	CD70-2H5-HA119-NCA1	1 mg/kg	0,2 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
3	CD70-2H5-HA119-NCA1	3 mg/kg	0,6 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1
4	CD70-2H5-HA119-NCA1	10 mg/kg	2 mg/mL	5 mL/kg	IV	Una vez, día 1

*Diez (10) ratones desnudos por grupos

Ejemplo 26: CD70-ADC en el modelo de linfoma de Burkitt

[0466] La eficacia antitumoral de ARX- α CD70 no conjugada y ARX- α CD70 conjugada ADC se midió en el modelo de tumor de Daudi (linfoma de Burkitt). Se usaron ratones hembra desnudos como sujetos de prueba, diez por grupo, y para comenzar, se administró una única inyección IV el día 1 a todos los grupos (N = 20). Hubo cinco grupos, 10 artículos de prueba y 10 vehículos por grupo, asignados al azar después de una semana.

Tratamiento	Dosis	vía	dosificación	N	Segunda inyección IV	N
Vehículo	N/A	IV	una vez, día 1	20	ninguna	N/A
CD70-2H5-HA119-NCA1	1 mg/kg	IV	una vez, día 1	20	una vez, aprox Día 21	10 = vehículo 10 = artículo de prueba
CD70-2H5-HA119-NCA1	3 mg/kg	IV	una vez, día 1	20	una vez, aprox Día 21	10 = vehículo 10 = artículo de prueba
CD70-2H5-HA119-NCA1	10 mg/kg	IV	una vez, día 1	20	una vez, aprox Día 21	10 = vehículo 10 = artículo de prueba
CD70-2H5-HA119-no conjugado	10 mg/kg	IV	una vez, día 1	20	una vez, aprox Día 21	10 = vehículo 10 = artículo de prueba

[0467] Se administra una segunda inyección después de 21 días (o cuando los tumores comienzan a crecer nuevamente), y los grupos que no son vehículos se dividen en grupos iguales de 10 cada uno y se les administra una segunda inyección IV.

[0468] Los ratones se pesan y se miden para el tumor de forma tridimensional utilizando un calibrador electrónico. El volumen del tumor individual se calcula como alturaXanchoXlongitud. Los ratones con tumores vascularizados (determinados por la aparición de los tumores) de tamaños apropiados se asignan al azar a grupos de tratamiento y se dosifican por peso corporal individual en el Día 33 (tres (3) semanas después de la inyección con células).

Ejemplo 27: Estudio de citotoxicidad de CD70-2H5-HA119-NCA1 786-O 96h

[0469] La citotoxicidad de los conjugados de fármaco de anticuerpo ARX- α CD70 se comparó con la dolastatina en células 786-O. La CI_{50} se midió y los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 3A.

Ejemplo 28: Estudio de citotoxicidad de 96h CD70-2H5-HA119-NCA1 Caki-1 96h

[0470] La citotoxicidad de los conjugados de fármaco de anticuerpo ARX- α CD70 se comparó con la dolastatina en células Caki-1, La CI_{50} se midió y los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 3B.

Ejemplo 29: Actividad antitumoral de tres CD70-AS269 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de riñón 786-O

[0471] El modelo de tumor de carcinoma de células renales 786-O se usó en ratones hembra desnudos. Diez grupos de diez ratones recibieron fragmentos de tumores 786-O y luego se asignaron al azar después de una semana y media cuando los tumores crecieron entre 100-300 mm³. Los grupos, uno para cada nivel de dosis y otro para el vehículo, se trataron de la siguiente manera:

- Vehículo,
- CD70-2H5-HA119-NCA1-IgG1v1 a 0,5, 1 y 3 mg/kg
- CD70-7F2-HA119-NCA1-IgG1v1 a 0,5, 1 y 3 mg/kg
- CD70-8A1-HA¹22-NCA1-IgG1v1 a 0,5, 1 y 3 mg/kg

[0472] Se administró una inyección de una sola dosis por vía intravenosa a los 100 ratones en el día 12 después del trasplante, y los resultados de estos experimentos incluyen los datos que se dan en las Figs. 4-6,

Ejemplo 30: Ensayo clínico en humanos de CD70-2H5-HA119-NCA1 para oncología

Ensayo clínico en humanos de la seguridad y/o eficacia de CD70-2H5-HA119-NCA1 para oncología

[0473] Objetivo: Comparar la seguridad y la farmacocinética de la composición administrada que comprende el derivado de dolastatina unido a ARX- α CD70.

[0474] Diseño del estudio: Este estudio será un estudio de Fase I, de centro único, abierto, aleatorizado de dosis, seguido de un estudio de Fase II en pacientes con cáncer renal. Los pacientes no deberían haber estado expuestos al derivado de dolastatina unido a α CD70 antes del ingreso al estudio. Los pacientes no deben haber recibido tratamiento para el cáncer dentro de las 2 semanas posteriores al inicio del ensayo. Los tratamientos incluyen el uso de quimioterapia, factores de crecimiento hematopoyéticos y terapia biológica como los anticuerpos monoclonales. Los pacientes deben haberse recuperado de todas las toxicidades (de grado 0 o 1) asociadas con el tratamiento previo. Se evaluó la seguridad de todos los sujetos y se recolectaron todas las colecciones de sangre para el análisis farmacocinético según lo programado. Todos los estudios se realizan con la aprobación del comité de ética institucional y el consentimiento del paciente.

[0475] Fase I: Los pacientes reciben i.v. CD70-2H5-HA119-NCA1 en los días 1, 8 y 15 de cada ciclo de 28 días. Las dosis de CD70-2H5-HA119-NCA1 pueden conservarse o modificarse por su toxicidad según las evaluaciones que se describen a continuación. El tratamiento se repite cada 28 días en ausencia de toxicidad inaceptable. Cohortes de 3-6 pacientes reciben dosis crecientes de CD70-2H5-HA119-NCA1 hasta que se determina la dosis máxima tolerada (MTD) para CD70-2H5-HA119-NCA1. La MTD se define como la dosis que precede a la que 2 de 3 o 2 de 6 pacientes experimentan toxicidad limitante de la dosis. Las toxicidades limitantes de la dosis se determinan de acuerdo con las definiciones y los estándares establecidos por el National Cancer Institute (NCI) Common Terminology for Adverse Events (CTCAE) Version 3,0 (9 de agosto de 2006).

[0476] Fase II: Los pacientes reciben CD70-2H5-HA119-NCA1 como en la fase I en la MTD determinada en la fase I. El tratamiento se repite cada 4 semanas durante 2-6 ciclos en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Después de completar 2 cursos de terapia de estudio, los pacientes que logran una respuesta completa o parcial pueden recibir 4 cursos adicionales. Los pacientes que mantienen la enfermedad estable durante más de 2 meses después de completar 6 cursos de terapia de estudio pueden recibir 6 cursos adicionales en el momento de la progresión de la enfermedad, siempre que cumplan con los criterios de elegibilidad originales.

[0477] Muestreo de sangre: Se extrae sangre en serie mediante punción venosa directa antes y después de la administración de CD70-2H5-HA119-NCA1. Las muestras de sangre venosa (5 ml) para la determinación de las concentraciones séricas se obtienen aproximadamente 10 minutos antes de la dosificación y aproximadamente en los siguientes tiempos después de la dosificación: días 1, 8 y 15. Cada muestra de suero se divide en dos alícuotas. Todas las muestras de suero se almacenan a -20°C. Las muestras de suero se envían en hielo seco.

[0478] Farmacocinética: Los pacientes se someten a recolección de muestras de plasma/suero para la evaluación farmacocinética antes del inicio del tratamiento y en los días 1, 8 y 15. Los parámetros farmacocinéticos se calculan mediante métodos independientes del modelo en un sistema informático VAX 8600 de Digital Equipment Corporation utilizando la última versión del software BIOAVL. Se determinan los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración sérica máxima (C_{max}); tiempo hasta la concentración máxima en suero (t_{max}); área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC) desde el tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo de sangre (AUC₀₋₇₂) calculado con el uso de la regla trapezoidal lineal; y vida media de eliminación terminal (t_{1/2}), calculada a partir de la constante de velocidad de eliminación. La constante de velocidad de eliminación se estima mediante regresión lineal de puntos de datos consecutivos en la región lineal terminal de la gráfica de concentración-tiempo log-lineal. La

desviación media estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) de los parámetros farmacocinéticos se calculan para cada tratamiento. Se calcula la relación de las medias de los parámetros (formulación conservada/formulación no conservada).

5 **[0479]** Respuesta del paciente a la terapia de combinación: la respuesta del paciente se evalúa mediante imágenes con rayos X, tomografías computarizadas y resonancia magnética, y las imágenes se realizan antes de comenzar el estudio y al final del primer ciclo, con imágenes adicionales realizadas cada cuatro semanas o al final de los ciclos posteriores. Las modalidades de imagen se eligen según el tipo de cáncer y la viabilidad/disponibilidad, y se utiliza la misma modalidad de imagen para tipos de cáncer similares, así como a lo largo del curso de estudio de cada paciente. Las tasas de respuesta se determinan utilizando los criterios RECIST. (Therasse y otros, J. Natl. Cancer Inst. 2000, 2 de febrero; 92 (3): 205-16; <http://ctep.cancer.gov/forms/TherasseRECISTJNCI.pdf>). Los pacientes también se someten a biopsia de cáncer/tumor para evaluar los cambios en el fenotipo de las células cancerígenas progenitoras y el crecimiento clonogénico por citometría de flujo, transferencia Western e IHC, y por los cambios en la citogenética por FISH. Después de completar el tratamiento del estudio, los pacientes son seguidos periódicamente durante 4 semanas,

Ensayos adicionales para actividades citotóxicas, citostáticas e inmunomoduladoras

20 **[0480]** Se conocen métodos para determinar si un anticuerpo media la función efectora contra una célula diana. En este documento se describen ejemplos ilustrativos y no limitativos de tales métodos.

25 **[0481]** Para determinar si un anticuerpo anti-CD70 o derivado media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo contra células inmunes activadas o células cancerosas que expresan CD70, se puede usar un ensayo que mida la muerte de la célula diana en presencia de células inmunes efectoras y de anticuerpos. Un ensayo utilizado para medir este tipo de citotoxicidad puede basarse en la determinación de la liberación de ^{51}Cr de las células diana marcadas metabólicamente después de la incubación en presencia de células efectoras y anticuerpos específicos de la diana (ver, por ejemplo, Perussia y Loza, 2000, *Methods in Molecular Biology* 121: 179-92; y "51Cr Release Assay of Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC)" in *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al. Eds., Wileyand Sons, 1993). Por ejemplo, las células inmunitarias activadas (p. ej., Linfocitos activados) o las células cancerosas que expresan CD70 marcadas con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ y se colocan en placas a una densidad de 5.000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos se pueden tratar con concentraciones variables de anticuerpo anti-CD70 durante 30 minutos luego se mezclan con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) normales durante 4 horas. La rotura de la membrana que acompaña a la muerte de la célula diana libera ^{51}Cr en el sobrenadante del cultivo, que se puede recolectar y evaluar para determinar la radioactividad como una medida de la actividad citotóxica. Otros ensayos para medir ADCC pueden involucrar marcadores no radioactivos o pueden estar basados en la liberación inducida de enzimas específicas. Por ejemplo, un ensayo no radiactivo basado en fluorometría de resolución temporal está disponible comercialmente (Delphia, Perkin Elmer). Este ensayo se basa en la carga de células diana con un éster de acetoximatilo de ligando potenciador de la fluorescencia (BATDA) que penetra en la membrana celular y luego se hidroliza para formar un ligando hidrofílico (TDA) impermeable a la membrana. Cuando se mezcla con el anticuerpo específico de la diana y las células efectoras de PBMC, el TDA se libera de las células lisadas y está disponible para formar un quelato altamente fluorescente cuando se mezcla con Europio. La señal, medida con un fluorómetro de resolución temporal, se correlaciona con la cantidad de lisis celular.

45 **[0482]** Para determinar si un anticuerpo anti-CD70 o derivado media la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos contra células inmunes activadas o células cancerosas que expresan CD70, un ensayo que mide la internalización de células diana por células inmunes efectoras (por ejemplo, macrófagos cultivados frescos o macrófagos establecidos) (Como línea celular) (véase, por ejemplo, Munn y Cheung, 1990, *J. Exp. Med.* 172: 231-37; Keler et al., 2000, *J. Immunol.* 164: 5746-52; Akewanlop et al., 2001, *Cancer Res.* 61: 4061-65). Por ejemplo, las células diana pueden marcarse con un tinte de membrana lipófila como PKH67 (Sigma), recubrirse con un anticuerpo específico de la diana y mezclarse con células inmunitarias efectoras durante 4-24 horas. Las células efectoras luego pueden identificarse mediante la contratinción con un anticuerpo marcado con fluorocromo específico para un marcador de superficie celular fagocítica (por ejemplo, CD14) y las células se pueden analizar mediante citometría de flujo de dos colores o microscopía de fluorescencia. Las células positivas dobles representan células efectoras que tienen células diana internalizadas. Para estos ensayos, las células efectoras pueden ser monocitos derivados de PBMC que se han diferenciado en macrófagos por cultivo durante 5-10 días con M-CSF o GM-CSF (véase, por ejemplo, Munn y Cheung, supra), líneas celulares humanas similares a macrófago U937 (Larrick et al., 1980, *J. Immunology* 125: 6-12) o THP-1 (Tsuchiya et al., 1980, *Int. J. Cancer* 26: 171-76) disponibles en ATCC como fuente alternativa de células fagocíticas.

60 **[0483]** También se conocen métodos para determinar si un anticuerpo media la citotoxicidad dependiente del complemento al unirse a las células diana. Se pueden aplicar los mismos métodos para determinar si un agente de unión a CD70 media CDC en células inmunes activadas o células cancerosas que expresan CD70. A continuación se describen ejemplos ilustrativos de tales métodos.

65 **[0484]** La fuente de complemento activo puede ser suero humano normal o purificado de animales de laboratorio,

incluidos conejos. En un ensayo estándar, un agente de unión a CD70 se incuba con células inmunes activadas que expresan CD70 (por ejemplo, linfocitos activados) o células cancerosas que expresan CD70 en presencia de complemento. La capacidad de dicho agente de unión a CD70 para mediar la lisis celular puede determinarse mediante varias lecturas. En un ejemplo, se utiliza un ensayo de liberación Nasup, $^{51}\text{CrO}_4$. En este ensayo, las células diana se marcan con $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$. El $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ no incorporado se lava y las células se colocan en placas a una densidad adecuada, típicamente entre 5.000 y 50.000 células/pocillo, en una placa de 96 pocillos. La incubación con el agente de unión a CD70 en presencia de suero normal o complemento purificado suele durar de 2 a 6 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 . La radioactividad liberada, que indica la lisis celular, se determina en una parte alícuota del sobrenadante del cultivo mediante el recuento de rayos gamma. La lisis celular máxima se determina liberando el tratamiento con $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ incorporado mediante detergente (0,5-1% NP-40 o Triton X-100). La lisis celular de fondo espontánea se determina en los pocillos donde solo está presente el complemento sin ningún agente de unión a CD70. El porcentaje de lisis celular se calcula como (lisis inducida por el agente de unión a CD70 - lisis espontánea)/lisis celular máxima. La segunda lectura es una reducción de los colorantes metabólicos, por ejemplo, Alamar Blue, por células viables. En este ensayo, las células diana se incuban con un agente de unión a CD70 con complemento y se incuban como se describe anteriormente. Al final de la incubación, se agrega 1/10 volumen de Alamar Blue (Biosource International, Camarillo, California). La incubación continúa hasta 16 horas a 37°C. en una atmósfera de 5% CO_2 . La reducción del azul de Alamar como una indicación de células viables metabólicamente activas se determina mediante análisis fluorométrico con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. La tercera lectura es la permeabilidad de la membrana celular al yoduro de propidio (PI). La formación de poros en la membrana plasmática como resultado de la activación del complemento facilita la entrada de PI en las células, donde se difundirá en los núcleos y se unirá al ADN. Al unirse al ADN, la fluorescencia de PI en los 600 nm aumenta significativamente. El tratamiento de las células diana con el agente de unión a CD70 y el complemento se lleva a cabo como se describe anteriormente. Al final de la incubación, se agrega PI a una concentración final de 5 .mu.g/ml. La suspensión celular se examina luego mediante citometría de flujo utilizando un láser de argón de 488 nm para la excitación. Las células lisadas se detectan por emisión de fluorescencia a 600 nm.

Modelos animales adicionales de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan CD70

[0485] Los agentes de unión anti-CD70 de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos o derivados con uno o más aminoácidos codificados de forma no natural y ADC de la invención, pueden ensayarse o validarse en modelos animales de trastornos inmunológicos o en cánceres CD70. El experto en la materia conoce una serie de modelos animales establecidos de trastornos inmunológicos o cánceres que expresan CD70, cualquiera de los cuales puede usarse para evaluar la eficacia del anticuerpo o derivado anti-CD70. Los ejemplos no limitantes de tales modelos se describen a continuación.

[0486] Ejemplos de modelos animales de enfermedades autoinmunes sistémicas y específicas de órganos que incluyen diabetes, lupus, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, encefalomiélitis autoinmune experimental (esclerosis múltiple), tiroiditis, miastenia gravis, artritis, uveítis y enfermedad intestinal inflamatoria se han descrito por Bigazzi," Animal Models of Autoimmunity: Spontaneous and Induced," in The Autoimmune Diseases (Rose y Mackay eds., Academic Press, 1998) y en "Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease," in Current Protocols in Immunology (Coligan et al. eds., Wiley and Sons, 1997).

[0487] Las afecciones alérgicas, por ejemplo, asma y dermatitis, también pueden modelarse en roedores. La hipersensibilidad de las vías respiratorias se puede inducir en ratones mediante ovalbúmina (Tomkinson et al., 2001, J. Immunol. 166: 5792-800) o antígeno de huevo de Schistosoma mansoni (Tesciuba et al., 2001, J. Immunol. 167: 1996-2003). La cepa de ratones Nc/Nga muestra un aumento marcado en la IgE sérica y desarrolla espontáneamente lesiones de tipo dermatitis atópica (Vestergaard et al., 2000, Mol. Med. Today 6: 209-10; Watanabe et al., 1997. Int. Immunol 9: 461-66; Saskawa et al., 2001, Int. Arch. Allergy Immunol. 126: 239-47).

[0488] La inyección de linfocitos donadores inmunocompetentes en un huésped histo-incompatible con radiación letal es un enfoque clásico para inducir GVHD en ratones. Alternativamente, el modelo murino B6D2F1 parental proporciona un sistema para inducir la GVHD aguda y crónica. En este modelo, los ratones B6D2F1 son progenie F1 de un cruce entre las cepas parentales de ratones C57BL/6 y DBA/2. La transferencia de células linfoides DBA/2 a ratones B6D2F1 no irradiados causa GVHD crónica, mientras que la transferencia de células linfoides C57BL/6, C57BL/10 o B10.D2 causa GVHD aguda (Slayback et al., 2000, Bone Marrow Transpl. 26: 931-938; Kataoka et al., 2001, Immunology 103: 310-318).

[0489] Además, tanto las células madre hematopoyéticas humanas como las células linfoides de sangre periférica maduras pueden injertarse en ratones SCID, y estas células linfo-hematopoyéticas humanas siguen siendo funcionales en los ratones SCID (McCune et al., 1988, Science 241: 1632-1639 Kamel-Reid y Dick, 1988, Science 242: 1706-1709; Mosier et al., 1988, Nature 335: 256-259). Esto ha proporcionado un sistema de modelo animal pequeño para la prueba directa de posibles agentes terapéuticos en células linfoides humanas. (Ver, por ejemplo, Tournoy et al., 2001, J. Immunol. 166: 6982-6991).

[0490] Además, se pueden crear pequeños modelos animales para examinar las eficacias *in vivo* de los anticuerpos o derivados anti-CD70 implantando líneas de células tumorales humanas que expresan CD70 en cepas de roedores

5 inmunodeficientes apropiadas, por ejemplo, ratones atímicos desnudos o ratones SCID. Los ejemplos de líneas celulares de linfoma humano que expresan CD70 incluyen, por ejemplo, Daudi (Ghetie et al., 1994, Blood 83: 1329-36; Ghetie et al., 1990, Int. J. Cancer 15: 481-85; de Mont et al., 2001, Cancer Res. 61: 7654-59), HS-Sultan (Cattan y Maung, 1996, Cancer Chemother. Pharmacol. 38: 548-52; Cattan y Douglas, 1994, Leuk. Res. 18: 513-22), Raji (Ochakovskaya et al., 2001, Clin. Cancer Res. 7: 1505-10; Breisto et al., 1999, Cancer Res. 59: 2944-49), y CA46 (Kreitman et al., 1999, Int. J. Cancer 81: 148-55). Un ejemplo no limitante de una línea de linfoma de Hodgkin que expresa CD70 es L428 (Drexler, 1993, Leuk. Lymphoma 9: 1-25; Dewan et al., 2005, Cancer Sci. 96: 466-473). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de carcinoma de células renales humanas que expresan CD70 incluyen 786-O (Ananth et al., 1999, Cancer Res. 59: 2210-16; Datta et al., 2001, Cancer Res. 61: 1768-75), ACHN (Hara et al., 2001, J. Urol. 166: 2491-94; Miyake et al., 2002, J. Urol. 167: 2203-08), Caki-1 (Prewett et al., 1998, Clin Cancer Res, 4: 2957-66; Shi y Siemann, 2002, Br. J. Cancer 87: 119-26), y Caki-2 (Zellweger et al., 2001, Neoplasia 3: 360-67). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo que expresan CD70 incluyen C15 y C17 (Busson et al., 1988, Int. J. Cancer 42: 599-606; Bernheim et al., 1993, Cancer Genet. Cytogenet. 66: 11 -5). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de glioma humano que expresan CD70 incluyen U373 (Palma et al., 2000, Br. J. Cancer 82: 480-7) y U87MG (Johns et al., 2002, Int. J. Cancer 98: 398-408), los ejemplos no limitantes de líneas celulares de mieloma múltiple incluyen MM.1S (Greenstein et al., 2003, Experimental Hematology 31: 271-282) y L363 (Diehl et al., 1978, Blut 36: 331-338). (Ver también Drexler y Matsuo, 2000, Leukemia Research 24: 681-703). Estas líneas celulares tumorales pueden establecerse en huéspedes de roedores inmunodeficientes como tumores sólidos mediante inyecciones subcutáneas o como tumores diseminados mediante inyecciones intravenosas. Una vez establecidos dentro de un huésped, estos modelos de tumores pueden aplicarse para evaluar las eficacias terapéuticas del anticuerpo anti-CD70 o derivados como se describen en la presente memoria sobre la modulación del crecimiento tumoral *in vivo*

25 **Trastornos Asociados por CD 70**

25 **[0491]** Los anticuerpos anti-CD70 y ADC descritos en el presente documento son útiles para tratar o prevenir un cáncer que expresa CD70 o un trastorno inmunológico caracterizado por la expresión de CD70 por activación inapropiada de células inmunes (por ejemplo, linfocitos o células dendríticas). Dicha expresión de CD70 puede deberse, por ejemplo, a niveles aumentados de proteína CD70 en la superficie de las células y/o alteración de la antigenicidad de la CD70 expresada. El tratamiento o la prevención del trastorno inmunológico, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, se logra administrando a un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención una cantidad eficaz del anticuerpo o derivado anti-CD70, por lo que el anticuerpo o derivado (i) se une a las células inmunitarias activadas que expresan CD70 y que están asociadas con el estado de la enfermedad y (ii) ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre las células inmunitarias activadas. En algunas realizaciones, el citotóxico, citostático o inmunomodulador se ejerce sin conjugación con un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador. En algunas realizaciones, el citotóxico, citostático o inmunomodulador se ejerce por conjugación con un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador.

40 **[0492]** Las enfermedades inmunológicas que se caracterizan por una activación inadecuada de las células inmunitarias y que pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos descritos en el presente documento pueden clasificarse, por ejemplo, por el tipo de reacción de hipersensibilidad que subyacen al trastorno. Estas reacciones se clasifican típicamente en cuatro tipos: reacciones anafilácticas, reacciones citotóxicas (citolíticas), reacciones de complejos inmunes o reacciones de inmunidad mediada por células (CMI) (también denominadas reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)). (Ver, por ejemplo, Fundamental Immunology (William E. Paul Ed., Raven Press, NY, 3ª ed. 1993).)

50 **[0493]** Entre los ejemplos específicos de dichas enfermedades inmunológicas se incluyen los siguientes: artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades desmielinizantes autoinmunes (p. ej., esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), oftalmopatía endocrina, uveoretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, trastorno hepatológico, enfermedad inflamatoria del intestino (p. ej., enfermedad de Crohn), anafilaxia, reacción alérgica, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmune, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmune, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis lupoidea, hepatitis lupoidea, aterosclerosis, lupus subcutáneo, lupus eritematoso, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, desnatitis herpetiforme, alopecia areata, penfigoide, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilo), y telangiectasia), infertilidad autoinmune macho y hembra, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad mixta del tejido conectivo, poliarteritis nodosa, vasculitis necrotizante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolípido, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmune, pulmón avicultor, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosa, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, pioderma gangrenoso, reacción de transfusión, arteria de Takayasu, polimialgia reumática, estraquiaria, un parche arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eccema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki,

dengue, encefalomiелitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdico, endoftalmiелitis, eritema elevatum et diutinum, psoriasis, eritroblastosis fetalis, faciliелitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía por IgA, púrpura de Henoch-Schönlein, enfermedad injerto contra huésped, rechazo al trasplante, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recurrente, crioglobulinemia, macróloboboblastia de Waldenstrom, síndrome de Even y fallo gonadal autoinmune.

[0494] Por consiguiente, los métodos descritos aquí abarcan el tratamiento de trastornos de los linfocitos B (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide y diabetes tipo I), linfocitos Th₁ (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis), el síndrome de Sjorgren, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Grave, la cirrosis biliar primaria, la granulomatosis de Wegener, la tuberculosis o la enfermedad de injerto contra huésped (por ejemplo, la dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópico, rinoconjunctivitis, rinitis alérgico, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, o enfermedad de huésped frente a injerto crónico). En general, los trastornos que afectan a las células dendríticas implican trastornos de los linfocitos Th₁ o linfocitos Th₂.

[0495] En algunas realizaciones, el trastorno inmunológico es un trastorno inmunológico mediado por células T, tal como un trastorno de células T en el que las células T activadas asociadas con el trastorno expresan CD70. Pueden administrarse agentes de unión anti-CD70 (por ejemplo, anticuerpos o derivados) para agotar tales células T activadas que expresan CD70. En una realización específica, la administración de anticuerpos anti-CD70 o derivados puede agotar las células T activadas que expresan CD70, mientras que las células T en reposo no se agotan sustancialmente por el anti-CD70 o derivado. En este contexto, "no sustancialmente agotado" significa que menos de aproximadamente el 60%, o menos de aproximadamente el 70% o menos de aproximadamente el 80% de las células T en reposo no se agotan,

[0496] Los anticuerpos anti-CD70 y los ADC descritos en el presente documento también son útiles para tratar o prevenir un cáncer que expresa CD70. El tratamiento o la prevención de un cáncer que expresa CD70, de acuerdo con los métodos descritos en este documento, se logra administrando a un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención una cantidad eficaz del anticuerpo o derivado anti-CD70, por lo que el anticuerpo o derivado (i) se une a las células cancerosas que expresan CD70 y (ii) ejerce un efecto citotóxico o citostático para agotar o inhibir la proliferación de las células cancerosas que expresan CD70. En algunas realizaciones, el citotóxico, citostático o inmunomodulador se ejerce sin conjugación con un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador. En algunas realizaciones, el citotóxico, citostático o inmunomodulador se ejerce por conjugación con un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador.

[0497] Los cánceres que expresan CD70 que pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, diferentes subtipos de linfoma no Hodgkin (LNH indolentes, LNH foliculares, linfomas linfocíticos pequeños, LNH linfoplasmocíticos o LNH de la zona marginal); enfermedad de Hodgkin (p. ej., células de Reed-Sternberg); cánceres del linaje de células B, incluidos, por ejemplo, linfomas difusos de células B grandes, linfomas foliculares, linfoma de Burkitt, linfomas de células del manto, leucemias linfocíticas de células B (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica); linfomas de células B positivos al virus de Epstein Barr; carcinomas de células renales (p. ej., células claras y papilares); carcinomas nasofaríngeos; carcinomas tímicos; gliomas; glioblastomas; neuroblastomas; astrocitomas; meningiomas; macroglobulinemia de Waldenstrom; mielomas múltiples; y carcinomas de colon, estómago y recto. El cáncer puede ser, por ejemplo, recién diagnosticado, pretratado o refractario o recidivante. En algunas realizaciones, un cáncer que expresa CD70 tiene al menos aproximadamente 15.000, al menos aproximadamente 10.000 o al menos aproximadamente 5.000 moléculas de CD70/célula.

[0498] Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinatoria de anticuerpos anti-CD70 conjugados o no conjugados de la presente invención, en una realización específica, se administra un agente de unión anti-CD70 simultáneamente con un agente terapéutico. En otra realización específica, el anticuerpo anti-CD70 se conjuga con un agente terapéutico. En algunas realizaciones, el sujeto se monitoriza después de la administración del agente de unión anti-CD70, y opcionalmente el agente terapéutico.

[0499] El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, cualquier agente que ejerza un efecto terapéutico sobre células cancerosas o células inmunes activadas. Típicamente, el agente terapéutico es un agente citotóxico o inmunomodulador. Dicha administración combinatoria puede tener un efecto aditivo o sinérgico en los parámetros de la enfermedad (p. ej., la gravedad de un síntoma, el número de síntomas o la frecuencia de recaída).

[0500] Clases útiles de agentes citotóxicos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, ligantes de surco de ADN, inhibidores de la replicación de ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos tri-nucleares de platino y carboplatino), antraciclina, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosasinas, platinoles, preformados de compuestos, purinas de productos y servicios, sensibilizadores de la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca y similares.

[0501] Los agentes citotóxicos o inmunomoduladores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramycin

(AMC), aspinasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, sulfoximina de butionina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU) CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citoflasina B, dacarbazina, dactinomicina (actinomicina), daunorubicina, decarazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluorodeoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbina, rapamicina (Sirolimus), estreptoizocitina, tenopósido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecano, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

[0502] En algunas realizaciones típicas, el agente terapéutico es un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), aglutinantes de surcos de ADN (por ejemplo, editinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de vincina, CC-1065, SN-38, topotecano, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cernadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina, y mitoxantrona.

[0503] En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un quimioterapéutico convencional tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalán, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede ser una terapia combinada, como CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, prednisolona y vincristina), CHOP-R (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona y rituximab) o ABVD (doxorubicina, bleomicina vinblastina y dacarbazina). Agentes como los análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina se pueden unir a los anticuerpos anti-CD70 o derivados de los mismos.

[0504] En realizaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina 10) o un derivado de la misma. Típicamente, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre la auristatina E y un ácido cetó. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con ácido benzoico de paraacetilo o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de la auristatina incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados se describen en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N^{os} 20030083263 y 20050009751), Solicitud de Patente Internacional N^o PCT/US03/24209, Solicitud de Patente Internacional N^o PCT/US02/13435, y Patente de EE.UU. N^o 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414,

[0505] En realizaciones específicas, el agente citotóxico es un agente de unión al surco menor del ADN. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N^o 6.130.237). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente de unión al surco menor es un compuesto de CBI. En otras realizaciones, el agente de unión al surco menor es un enedino (por ejemplo, caliqueamicina). Los ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, pero no se limitan a, taxanos (por ejemplo, Taxo1.RTM. (Paclitaxel), Taxótero.RTM. (Docetaxel)), T67 (Tularik), alquiloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina). y vinorelbina) y dolastatina (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de baccatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimid, estramustina, criptofisinas, cernadotina, maitansinoides, combretastatina, discodermolida y eleuterobina.

[0506] En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes anti-tubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari et al., 1992, Cancer Res. 52: 127-131). En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es un radioisótopo. En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es ricina o saporina. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un agente anti-VEGF, tal como AVASTIN (bevacizumab) o NEXAVAR (Sorafenib); un bloqueador de PDGF, como SUTENT (malato de sunitinib); o un inhibidor de la quinasa, como NEXAVAR (sorafenib tosylate), en algunas realizaciones, el agente citotóxico o inmunomodulador es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de la purina (p. ej., azatioprina o mofetilo de micofenolato), un inhibidor de dihidrofolato de reductasa (p. ej., metotrexato), aciclovir, gangciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, dideoxiuridina, yododeoxiuridina, poscarnet, o trifluridina.

[0507] En otras formas de realización, el agente citotóxico es aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, Darbepoetina alfa, Denileucina difitox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, epoyetina alfa, estramustina, exemestano, filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserelina, idarubicina, ifosfamida, imatinib mesilato, Interferon alfa-2a, irinotecano, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza de nitrógeno, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, fenpropionato de nandrolona, oprelvecina, oxaliplatino, pamidronato, pegadamas, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatin, pipobromano, plicamicina, sodio de porfímero, procarbina, quinacrina, rasburicasa, sargamostim, estreptoizocitina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina o zoledronato.

[0508] En realizaciones adicionales, el agente terapéutico es un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal antiHER2 humanizado, RITUXAN (rituximab; Genentech; un anticuerpo monoclonal quimérico anti CD20); OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; un anticuerpo IgG2a murino); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; un anticuerpo quimérico anti-EGFR IgG); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD; Campath I/H (Leukosite, MA; un anticuerpo IgG1 humanizado); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado); LymphoCide (Inmunómica, Inc., NJ; un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado); Oncolym (Techniclone, Inc., CA; un anticuerpo murino radiomarcado anti-HLA-DRI); Allomune (BioTrans-plant, CA; un mAb anti-CD2 humanizado); Avastin (Genentech, Inc., CA; un anticuerpo humanizado anti-VEGF); Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA; un anticuerpo anti-CD22); CEAcide (Immunomedics, NJ; un anticuerpo anti-CEA humanizado); o un anticuerpo anti-CD40 (por ejemplo, como se describe en la Patente de EE.UU. N° 6.838.261).

[0509] Otros anticuerpos adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis .lamda. fetoproteína alfa, CA 242, fosfatasa alcalina placentaria, antígeno de membrana específico de la próstata, fosfatasa ácida prostática, factor de crecimiento epidérmico, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, receptor anti-transferrina, p97. MUC1-KLH, CEA, gp100, MARTI, antígeno prostático específico, receptor IL-2, CD20, CD52, CD30, CD33, CD22, gonadotropina coriónica humana, CD38, CD40, mucina, P₂₁, MPG y producto de Oncogene Neu.

[0510] En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente inmunomodulador. El agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, REVLIMID (lenalidomida), ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato, y, alternativamente, el agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoide (por ejemplo, prednisona o dexametasona).

[0511] En algunas realizaciones típicas, el agente inmunomodulador es un agente antiinflamatorio, tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contienen pirazol, derivados de oxicam y derivados de ácido nicotínico. Las clases de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, los inhibidores de la ciclooxigenasa, los inhibidores de la 5-lipoxigenasa y los antagonistas de los receptores de leucotrienos. En algunas realizaciones, el agente inmodulador es una citoquina, tal como G-CSF, GM-CSF o IL-2. Los inhibidores de la ciclooxigenasa adecuados incluyen ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenaco, diflunisal, fenbufeno, fenofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, nabumetona, naproxeno, sulindac, tenoxicam, tolmetina y ácido acetilsalicílico.

[0512] Los inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores de la redox (por ejemplo, derivados de catecol butano, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopalen, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina) y inhibidores no-redox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y derivados de los mismos, metoxitetrahidropirano, ácidos boswellicos y derivados acetilados de ácidos boswellicos, y ácidos quinolinemetoxifenilacéticos sustituidos con radicales cicloalquilo y precursores de inhibidores redox).

[0513] Otros inhibidores adecuados de la lipoxigenasa incluyen antioxidantes (por ejemplo, fenoles, galato de propilo, flavonoides y/o sustratos naturales que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de las flavonas, flavanol, dihidroquercetina, luteolina, galangin, orobol, derivados de calcona, 4,2',4'-trihidroxicalcona, orto-aminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranoles, ebselena y especies que aumentan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (por ejemplo, ácidos hidroxámicos y derivados de los mismos, N-hidroxiureas, 2-bencilo-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zyleutón, ácido 5-hidroxianranfílico y compuestos de 4-(omega-arilalquilo)fenilalcanoicos, compuestos que contienen ácido imidazol (por ejemplo, cetoconazol y itraconazol), fenotiazinas y derivados del benzopirano).

[0514] Otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, ácidos octadecatetraenoico, eicosatetraenoico, docosapentaenoico, eicosahexaenoico y docosahexaenoico y ésteres de los mismos, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácidos 15-monohidroxi-eicosatetraenoico, 15-monohidroxi-eicosatrienoico y 15-monohidroxi-eicosapentaenoico, y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos que interfieren con los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamilo, fuscósido, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14 eicosatetrayenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, ionapaleno, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromilo, tioéteres, sulfuro de dialilo y sulfuro de di-(1-propenilo).

[0515] Los antagonistas de los receptores de leucotrienos incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselena, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057. Terke TMK-688, Boehringer Ingleheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457. Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer R_P 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Bee-cham SB-209247. Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products Way 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987. Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck y Co. MK-591, Merck y Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc

Rorer RP 69698, Shionoogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK y F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanana T-757 y Teijin Tei-1338.

5 **[0516]** Las líneas celulares descritas en los ejemplos se mantuvieron en cultivo de acuerdo con las condiciones especificadas por la American Type Culture Collection (ATCC) o Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania (DMSZ), o como se sepa. Los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen Corp., Carlsbad, Calif.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

10 **[0517]**

15 <110> Ambrx, Inc. Barnett, Richard S. Knudsen, Nick Sun, Ying Biroc, Sandra Buss, Timothy Javahishvili, Tsothe Bresson, Damien Srinagesh, Shailaja Hewet, Amha Pinkstaff, Jason

<120> Conjugados de fármaco de anticuerpo anti-CD70

<130> AMBX-0203.00PCT

20 <150> 61/661.782

<151> 2012-06-19

<160> 18

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (119)..(119)

35 <223> X es aminoácido no natural

<400> 1

40

45

50

55

60

65

ES 2 712 648 T3

5 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

 Tyr Met Asn Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

 Gly Ile Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Thr Ser Gly Tyr Asp Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

 Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
 115

40
 45
 50
 55
 60
 65

<210> 2
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

ES 2 712 648 T3

5 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

10 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30

15 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

20 Tyr Ser Ala Phe Asn Arg Tyr Asn Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

25 Ser Gly Pro Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

30 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

35 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

35 <210> 3
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (329)..(329)
 <223> X es aminoácido no natural

45 <400> 3

50 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 1 5 10 15

55 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 20 25 30

60

65

ES 2 712 648 T3

5 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 35 40 45
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 50 55 60
 10 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 65 70 75 80
 15 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95
 20 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110
 25 Ala Pro Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125
 30 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140
 35 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160
 40 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175
 45 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 180 185 190
 50 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220
 55 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 225 230 235 240
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255
 60 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270
 65 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285

ES 2 712 648 T3

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300
 5
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320
 10
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
 325
 <210> 4
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 20
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 1 5 10 15
 25
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 20 25 30
 30
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 35 40 45
 35
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 50 55 60
 40
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 65 70 75 80
 45
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95
 50
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110
 55
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125
 60
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140
 65
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175
 65

ES 2 712 648 T3

5 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

10 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

15 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

20 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

25 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

30 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

35 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

40 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
290 295 300

45 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

50 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

55 <210> 5
<211> 66
<212> PRT
<213> Homo sapiens

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (66)..(66)
<223> X es aminoácido no natural

65 <400> 5

70 Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
1 5 10 15

75 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
20 25 30

80 Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr

ES 2 712 648 T3

	35	40	45	
5	His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu			
	50	55	60	
10	Cys Xaa			
	65			
	<210> 6			
	<211> 354			
15	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 6			
20	gagggtgcagc tggttcagtc tggggccgag gtgaaaaagc ctggggccac cgtgaaaatt			60
	tcttgtaaag tttctggata taccttcacc gattactata tgaactgggt tcagcaagcc			120
25	cctggaagg gactggagtg gatggggata attaaccat ataacggcgg caccactat			180
	aaccaaaagt tcaaaggag ggttaccatc actgcagaca ccagcaccga caccgcttat			240
	atggagctga gtagcctgag gtccaggat actgcagttt actattgtgc gacttccggc			300
30	tacgatctgt actttgacta ctggggccag ggaaccctcg ttaccgtctc ctca			354
	<210> 7			
	<211> 321			
35	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 7			
40	gaaattgtga tgacacagtc tccggccacc ctgtctgttt ctccggggga aagagctacc			60
	ctgagttgca aagccagtca gaacgttggg accgccgttg cctggtacca acagaaacct			120
45	ggccaggccc cccgtctcct catctattcc gcattcaaca ggtataacgg catcccagca			180
	aggttctcog gcagtgggcc agggacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagagc			240
	gaggacttog cagtttatta ttgtcagcag tacagtacct accctctcac tttcggagga			300
50	ggcactaaag ttgagatcaa a			321
	<210> 8			
	<211> 651			
55	<212> ADN			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 8			
60				
65				

ES 2 712 648 T3

5 gcacctcccg tgcgccgggg accgtcagtc ttctctttcc ccccaaaacc caaggacacc 60
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac 120
 cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 180
 ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 240
 10 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc 300
 cccacgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 360
 ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggta gcttgacctg cctggtaaaa 420
 15 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 480
 tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctota cagcaagctc 540
 20 accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 600
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggttg a 651

25 <210> 9
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 9
 cgtaagggtg ctgcaccatc tgtcttcac ttcocggccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 35 tggaaaggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag 300
 40 agcttcaaca ggggagagtg ttga 324

45 <210> 10
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (122)..(122)
 <223> X es aminoácido no natural

<400> 10

55

60

65

ES 2 712 648 T3

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

10 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

15 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

20 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

25 Lys Ala Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

30 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35 Ala Arg Ser Leu Phe Pro Ala Asn Tyr Ala Gly Phe Val Tyr Trp Gly
 100 105 110

40 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
 115 120

<210> 11
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

45
 50
 55
 60
 65

ES 2 712 648 T3

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 5
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 10
 10 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 15
 15 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 20
 20 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 25
 25 Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
 30
 30 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (108)..(108)

40 <223> X es aminoácido no natural

<400> 12

45

50

55

60

65

ES 2 712 648 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 5
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 10
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 15
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 20
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 25
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 30
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa
 100 105

<210> 13
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 13

cagggtgcagc tgggttcagtc tggggccgag gtgaaaaagc ctgggtcttc tgtgaaagtt 60
 40
 tcttgtaaag caagtggata ttctttcagt gattactata tgaactgggt taggcaggcc 120
 cctggccaag gactcgagtg gatgggggag attaacccaa ccaccggcgg ggcaacctat 180
 45
 aaccaaaagt tcaaagcaag ggttaccatc actgctgacg agagcacttc aactgcttat 240
 atggagctga gcagcctgag gtccgaggat accgcagttt actattgtgc gagatccctc 300
 ttccctgcaa actacgcagg cttcgtttac tggggacagg gaaccctggg caccgtctcc 360
 50
 tca 363

<210> 14
 <211> 341
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 14

60

65

ES 2 712 648 T3

gatattcaga tgacacagtc tccgtcttct ctgtctgccg gtggtgggga tagagttacc 60
 5 attacctgca gtgccagttc tagtgtttcc tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 120
 aaggccccca aactcctcat ctatgacacc tccaaactcg caagtggcgt tccatccagg 180
 ttctccggca gtgggagtgg gacagactat actttcacca tcagcagcct ccagcctgag 240
 10 gacatcgcaa cctattattg tcagcagtgg agtagctacc cttggacttt cggacagggg 300
 acgaaagtgg agatcaaacg tacgggtggc gcaccatctg t 341

15
 <210> 15
 <211> 990
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 15

25 tagagcaoca agggcccata ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 120
 30 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctctct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
 35 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgccagc cacctcccgt cgcgggggga 360
 ccgtcagttt tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccctt 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 40 tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcggggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctcacc aggactggct gaatggcaag 600
 45 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 50 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 55 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggttga 990

60 <210> 16
 <211> 301
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 65

ES 2 712 648 T3

```

cttcaccttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct      60
5  gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca      120
   atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct      180
   cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga      240
10 agtcacccat cagggcctga gctcgcccggt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgttg      300
   a                                                                              301
15
<210> 17
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20
<400> 17
25   Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
   1          5          10          15
30   Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
   20          25          30
35   Ile Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
   35          40          45
40   Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
   50          55          60
45   Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys Asn Thr Leu Tyr
   65          70          75          80
50   Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
   85          90
55   Ala Arg Asp Thr Asp Gly Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
   100         105         110
60   Leu Val Thr Val Ser Ser
   115
60 <210> 18
   <211> 107
   <212> PRT
   <213> Homo sapiens
65 <400> 18

```

ES 2 712 648 T3

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

10 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

15 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

20 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

25 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

30 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Leu
 85 90 95

35 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

40

45

50

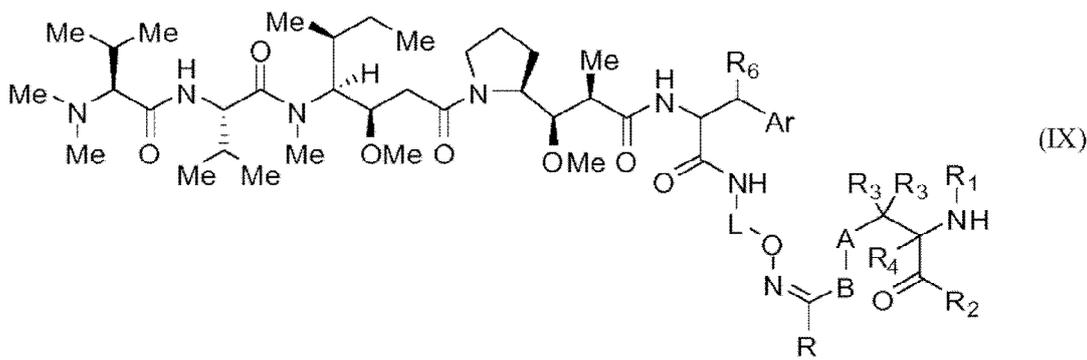
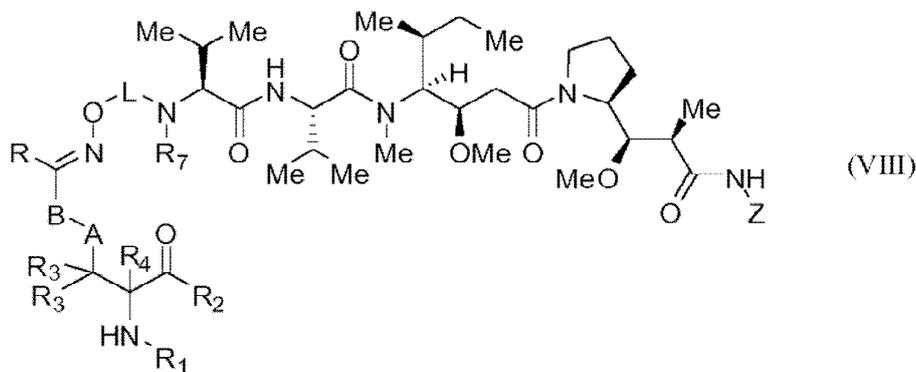
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende la Fórmula (VIII) o (IX), en donde el compuesto es un anticuerpo α CD70 conjugado con una dolastatina, en donde la conjugación ocurre a través de un aminoácido no codificado naturalmente en el anticuerpo, en donde la Fórmula (VIII) y (IX) corresponden a:



en donde:

40 A es opcional, y cuando está presente es alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, cicloalquileno inferior, cicloalquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, alquinileno, heteroalquileno inferior, heteroalquileno sustituido, heteroalquileno, heterocicloalquileno inferior, heterocicloalquileno inferior sustituido, arileno, arileno sustituido, heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileno o aralquileno sustituido;

45 B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileno inferior, alquileno inferior sustituido, alquenileno inferior, alquenileno inferior sustituido, heteroalquileno inferior, heteroalquileno inferior sustituido, -O-, -O-(alquileno o sustituidos)alquileno-, -S-, -S-(alquileno o alquileno sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k (alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileno o alquileno sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')CO-(alquileno o alquileno sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

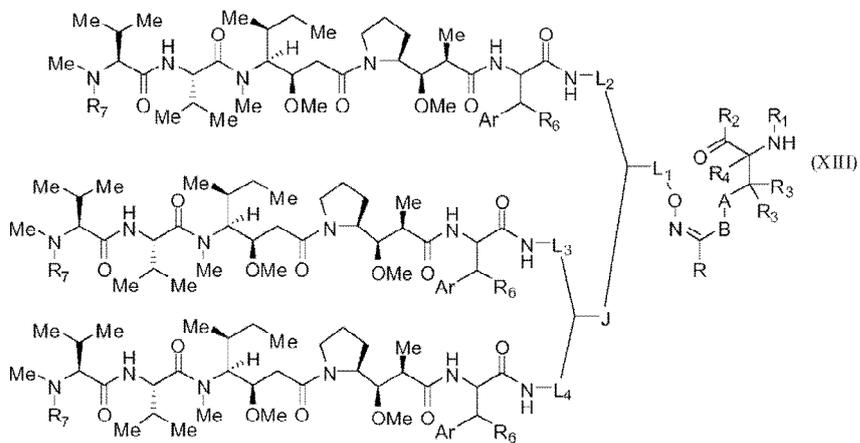
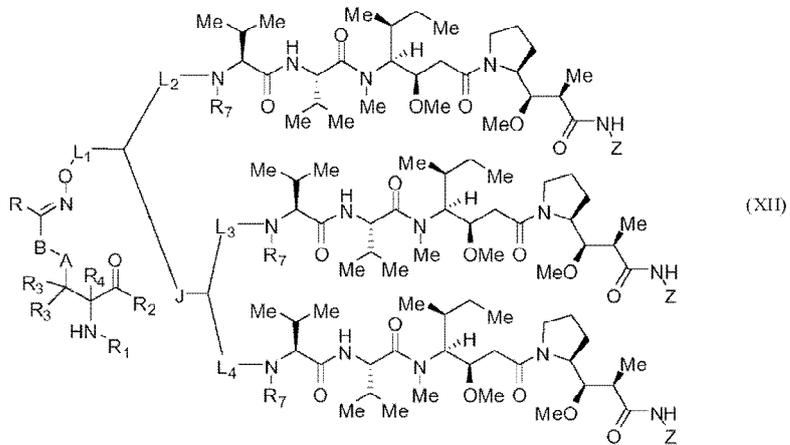
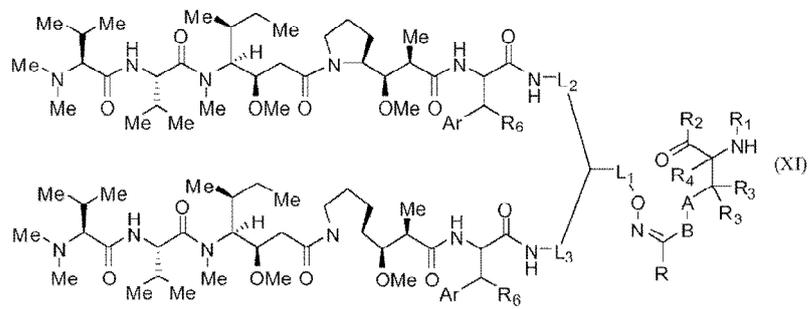
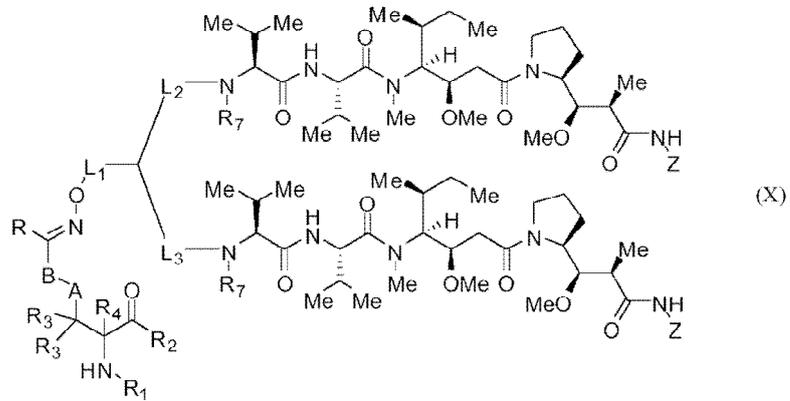
R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

55 R₁ y/o R₂ es un anticuerpo anti-CD70 (α CD70),

en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o en donde el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

65 R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

Z tiene la estructura de:



en donde:

A es opcional, y cuando está presente es alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, cicloalquileo inferior, cicloalquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, alquilenilo inferior, heteroalquileo inferior, heteroalquileo sustituido, heterocicloalquileo inferior, heterocicloalquileo sustituido, arileno, arileno sustituido, arileno heteroarileno, heteroarileno sustituido, alcarileno, alcarileno sustituido, aralquileo o aralquileo sustituido;

B es opcional, y cuando está presente es un enlazador seleccionado del grupo que consiste en alquileo inferior, alquileo inferior sustituido, alquilenilo inferior, alquilenilo inferior sustituido, heteroalquileo inferior, heteroalquileo inferior sustituido, -O-, -O-(alquileo o sustituidos)alquileo-, -S-, -S-(alquileo o alquileo sustituido)-, -S(O)_k- donde k es 1, 2 o 3, -S(O)_k(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)-, -C(O)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(S)-, -C(S)-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')-, -NR'-(alquileo o alquileo sustituido)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')CO-(alquileo o alquileo sustituido)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N-, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N-, y -C(R')₂-N(R')-N(R')-, donde cada R' es independientemente H, alquilo o alquilo sustituido;

R es H, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo o cicloalquilo sustituido;

R₁ y/o R₂ es un anticuerpo αCD70,

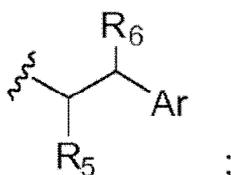
en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 1 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural, o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 10, en donde el aminoácido 122 de la SEQ ID NO. 10 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural; o

en donde el anticuerpo αCD70 comprende una cadena pesada variable de SEQ ID NO. 17, en donde el aminoácido 119 de la SEQ ID NO. 17 está sustituido con el aminoácido no codificado de forma natural;

R₃ y R₄ son cada uno independientemente H, halógeno, alquilo inferior o alquilo inferior sustituido, o R₃ y R₄ o dos grupos R₃ forman opcionalmente un cicloalquilo o un heterocicloalquilo;

Z tiene la estructura de:



R₅ es H, CO₂H, alquilo C₁-C₆ o tiazol;

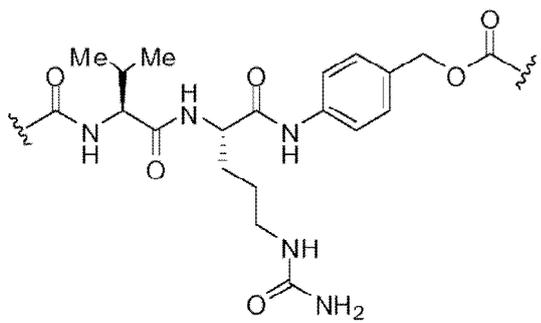
R₆ es OH o H;

Ar es fenilo o piridina;

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;

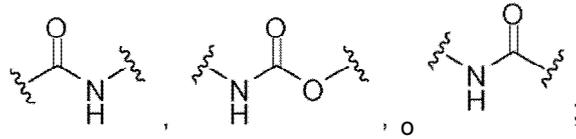
L₁, L₂, L₃ y L₄ son, cada uno, enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en un enlace, alquileo, -alquileo-O)-alquileo-J-, alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n-alquileo-J'-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo'-, -W-, -alquileo-W-, alquileo'- J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -J-alquileo-NMe-alquileo'--NMe-alquileo'-W-, y -alquileo-J-alquileo'--NMe-alquileo'--NMe-alquileo'-W-;

W tiene la estructura de:



cada J y J' tienen independientemente la estructura de:

5



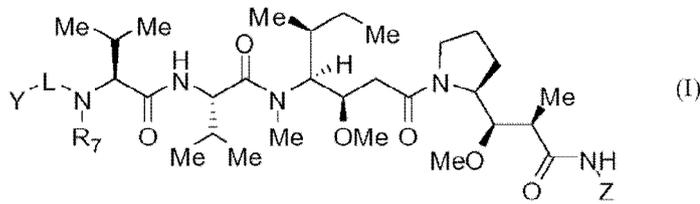
10

y
 cada n y n' son independientemente enteros mayores o iguales a uno;
 en donde alquilo inferior significa un grupo alquilo con ocho o menos átomos de carbono;
 en donde alqueno inferior significa un grupo alqueno que tiene ocho o menos átomos de carbono.

15

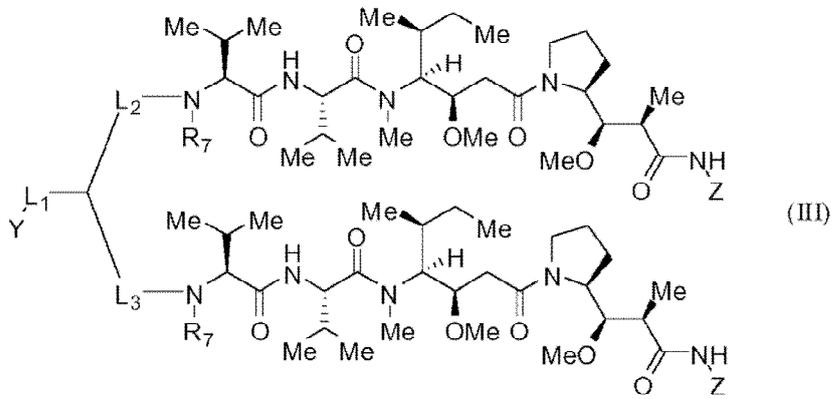
5. Un método para derivatizar un análogo de dolastatina que comprende la Fórmula (I), (III), (IV), (V) o (VI), en donde el análogo de dolastatina derivatizado es un anticuerpo α CD70 conjugado con una dolastatina, en donde ocurre la conjugación a través de un aminoácido no codificado de forma natural en el anticuerpo, en donde el método comprende poner en contacto el análogo de dolastatina con un reactivo de Fórmula (XXXVII), en donde las fórmulas (I), (III), (IV), (V) o (VI) corresponden a:

20



25

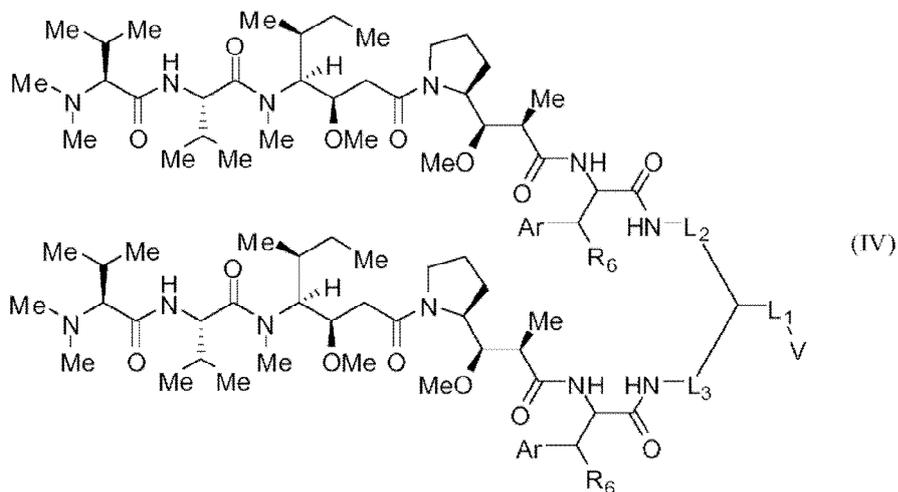
30



35

40

45

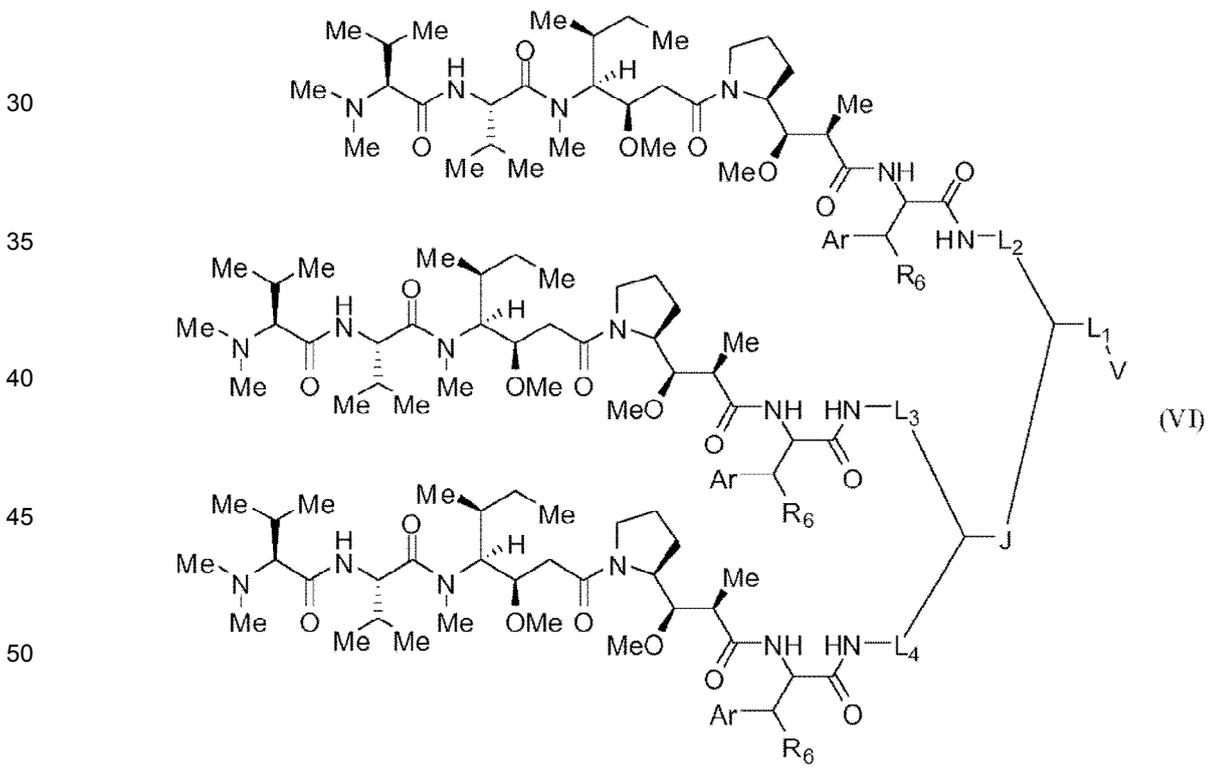
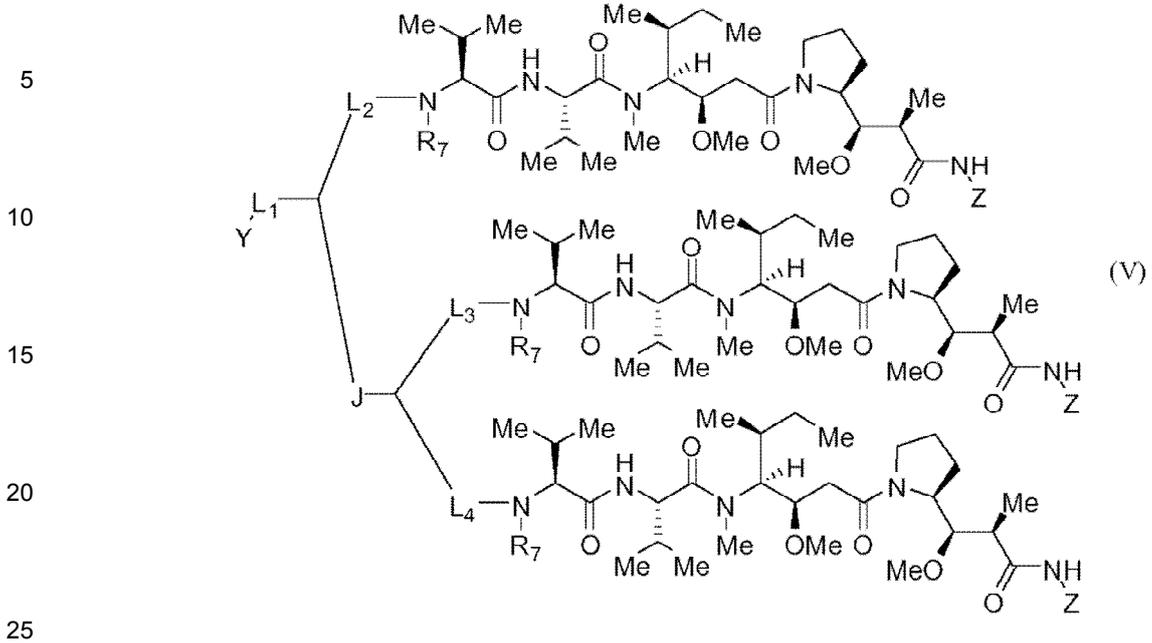


50

55

60

65



en donde:

Z tiene la estructura de:



R₅ es H, COR₈, alquilo C₁-C₆ o tiazol;
 R₈ es OH o -NH-(alquileo-O)_n-NH₂;
 R₆ es OH o H;
 Ar es fenilo o piridina;

5

R₇ es alquilo C₁-C₆ o hidrógeno;
 Y es NH₂-O- y V es NH₂-O-;

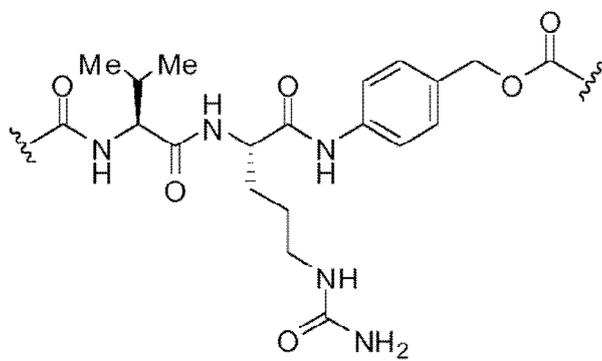
10

L, L₁, L₂, L₃ y L₄ son cada uno de los enlazadores seleccionados del grupo que consiste en un enlace, -alquileo-, -alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-(CH₂)_n-NHC(O)-(CH₂)_n-C(Me)₂-S-S-(CH₂)_{n'''}-NHC(O)-(alquileo-O)_{n''}-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-W-, alquileo-C(O)-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-, alquileo'-J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-alquileo', -J-(alquileo-O)_n-alquileo-, -(alquileo-O)_n-alquileo-J-(alquileo-O)_n-alquileo-J'-, -W-, alquileo-W-, alquileo'-J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, y J-(alquileo-NMe)_n-alquileo-W-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-C(O)-, -(alquileo-O)_n-alquileo-U-alquileo-, -J-alquileo-NMe-alquileo'-NMe-alquileo'-W-, y -alquileo-J-alquileo'-NMe-alquileo'-NMe-alquileo''-W-;

15

W tiene la estructura de:

20

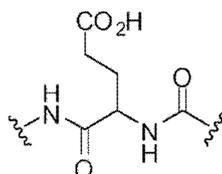


25

30

U tiene la estructura de:

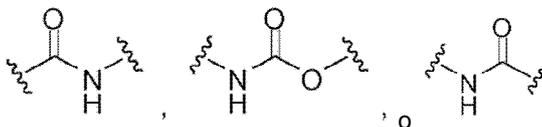
35



40

cada J y J' independientemente tienen la estructura de:

45



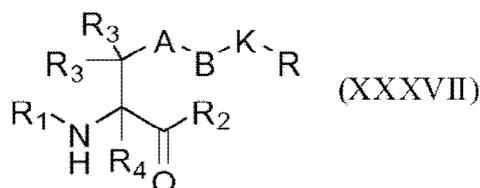
50

o L está ausente, Y es metilo, R₅ es COR₈ y R₈ es -NH-(alquileo-O)_n-NH₂; y cada n, n', n'', n''' y n'''' son independientemente enteros mayores o iguales a uno;

55

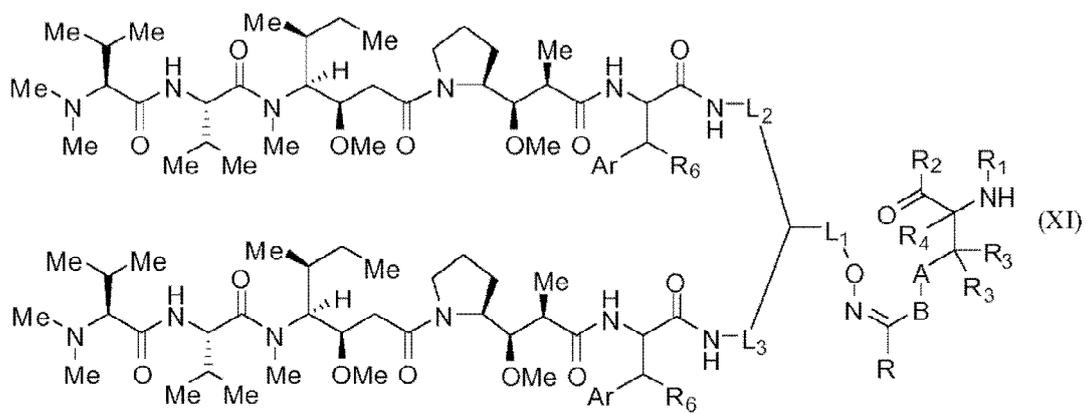
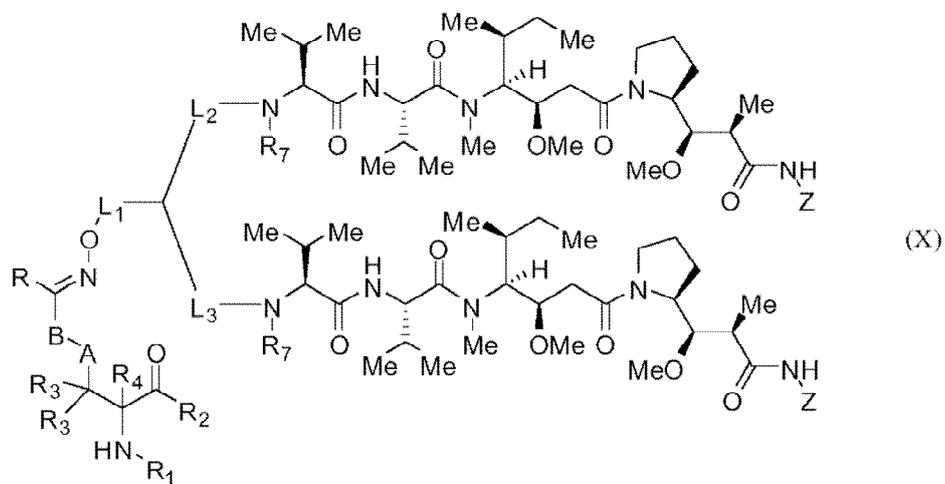
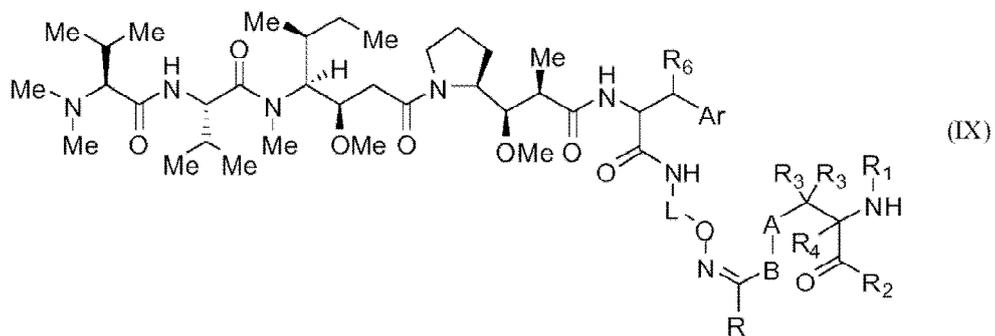
en donde Formula (XXXVII) corresponde a:

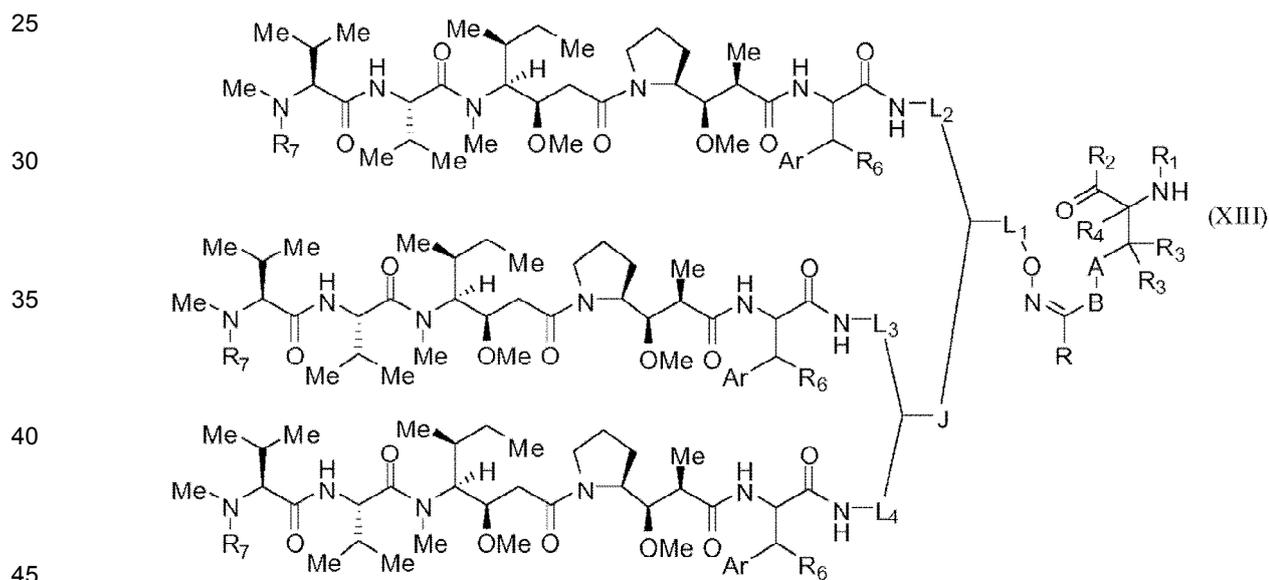
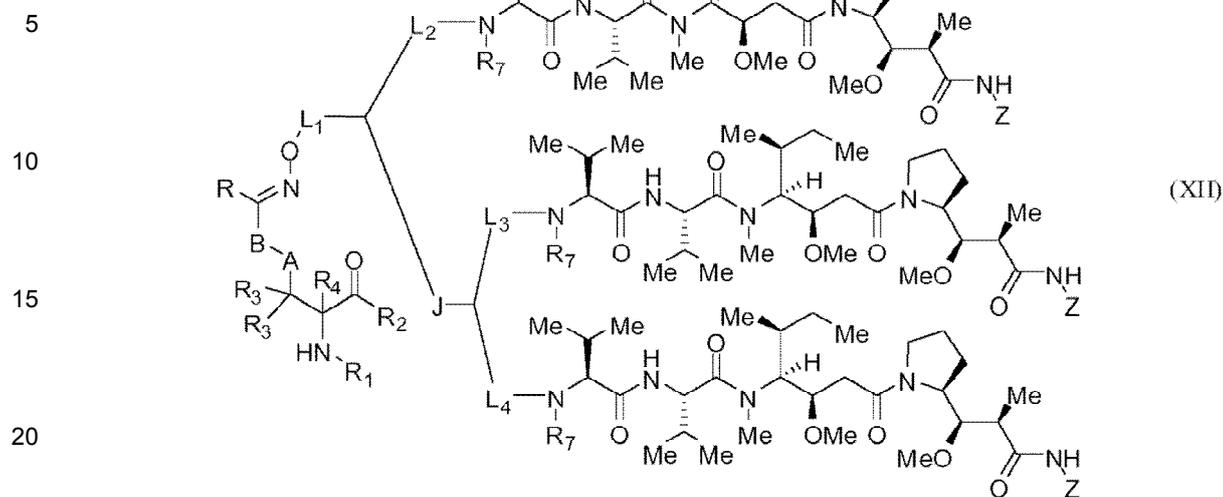
60



65

en donde:





7. Método según la reivindicación 5, en el que el análogo de dolastatina se pone en contacto con el reactivo de fórmula (XXXVII) en solución acuosa en condiciones ligeramente ácidas.

50 8. Un compuesto de la reivindicación 1 o 4, en el que el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada de SEQ ID. NO: 1 y una cadena ligera de SEQ ID. NO: 2,

55 9. Un compuesto de la reivindicación 1, 4 u 8, en el que el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada de SEQ ID. NO: 1, una cadena ligera de SEQ ID. NO: 2 y una región constante que comprende SEQ ID. NO. 3,

10. Un compuesto de la reivindicación 1 o 4 en el que el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada de SEQ ID. NO: 10 y una cadena ligera de SEQ ID. NO: 11,

60 11. Un compuesto de la reivindicación 1, 4 o 10, en el que el anticuerpo α CD70 comprende una cadena pesada de SEQ ID. NO: 10, una cadena ligera de SEQ ID. NO: 11 y una región constante que comprende SEQ ID. NO. 3,

12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 4 y un portador, excipiente o aglutinante farmacéuticamente aceptables.

65

FIGURA 1:

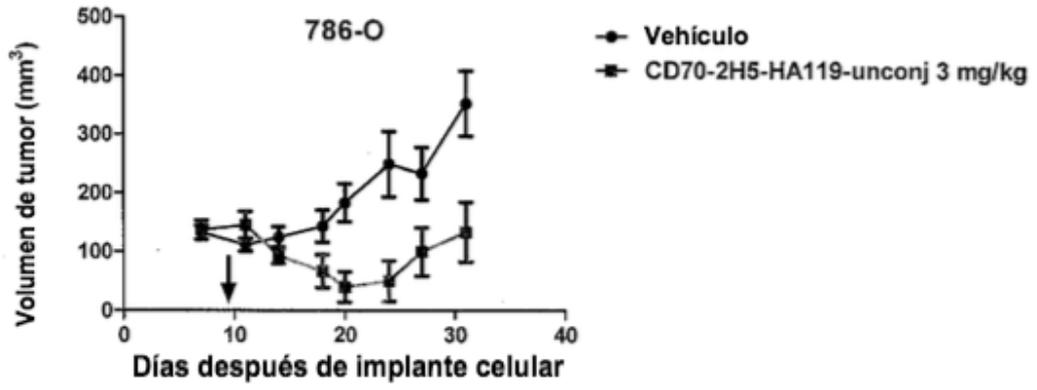


FIGURA 2:

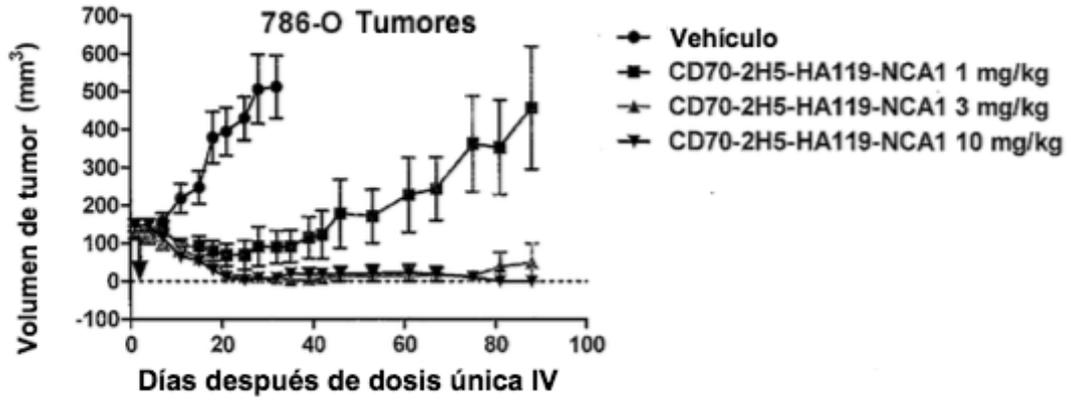
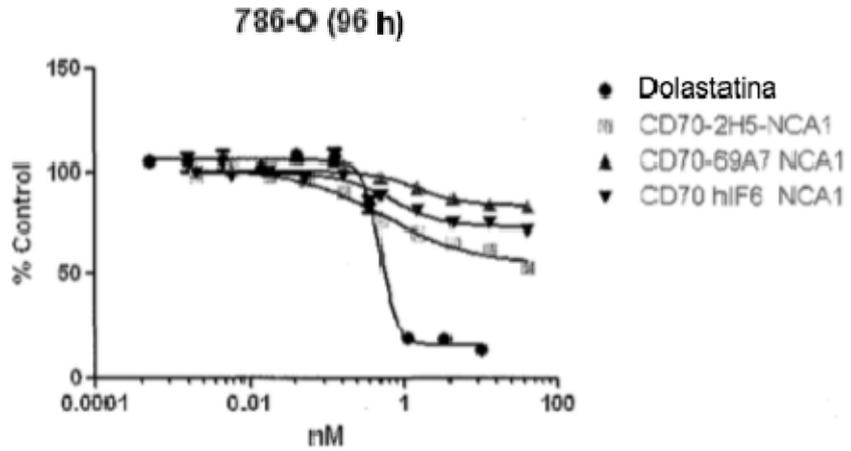
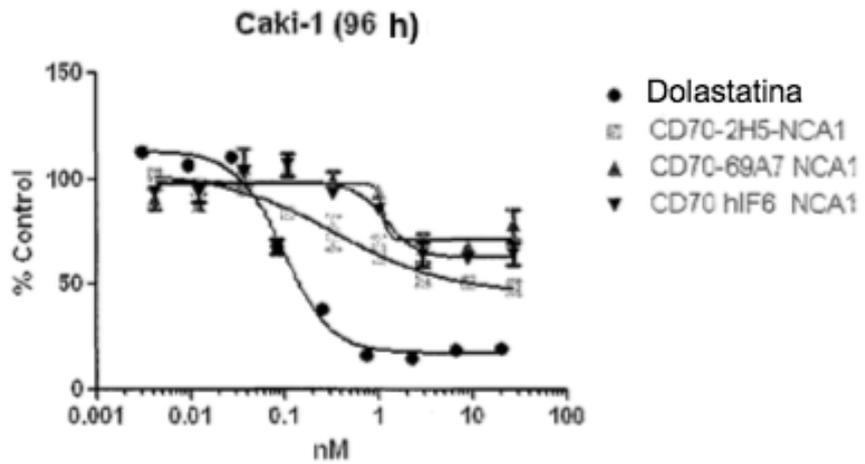


FIGURA 3A:



	Dolastatina	CD70-2H5-NCA1	CD70-69A7 NCA1	CD70 hIF6 NCA1
CI50	0.4967	0.5811	1.614	0.7212

FIGURA 3B:



	Dolastatina	CD70-2H5-NCA1	CD70-69A7 NCA1	CD70 hIF6 NCA1
CI50	0.09906	0.3550	~ 1.115	1.181

FIGURA 4A:

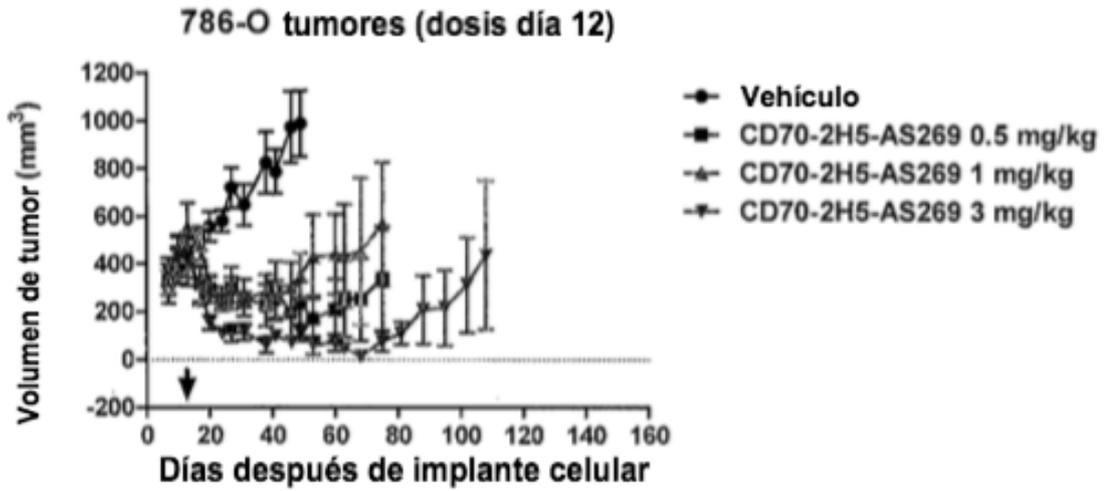


FIGURA 4B:

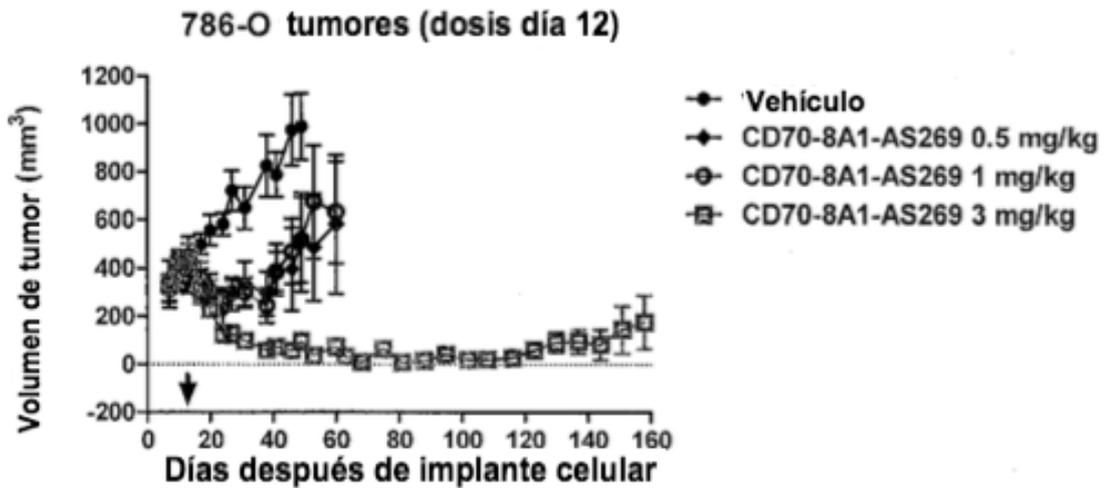


FIGURA 4C:

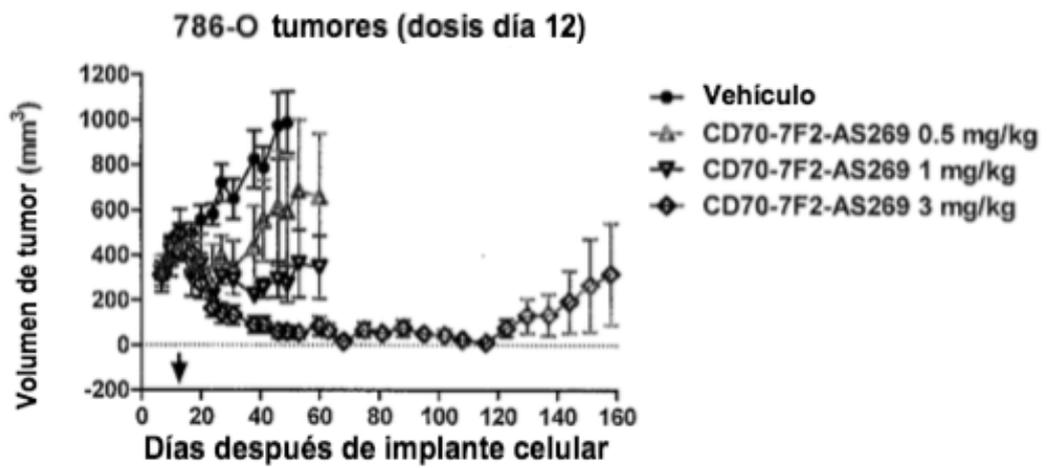


FIGURA 5:

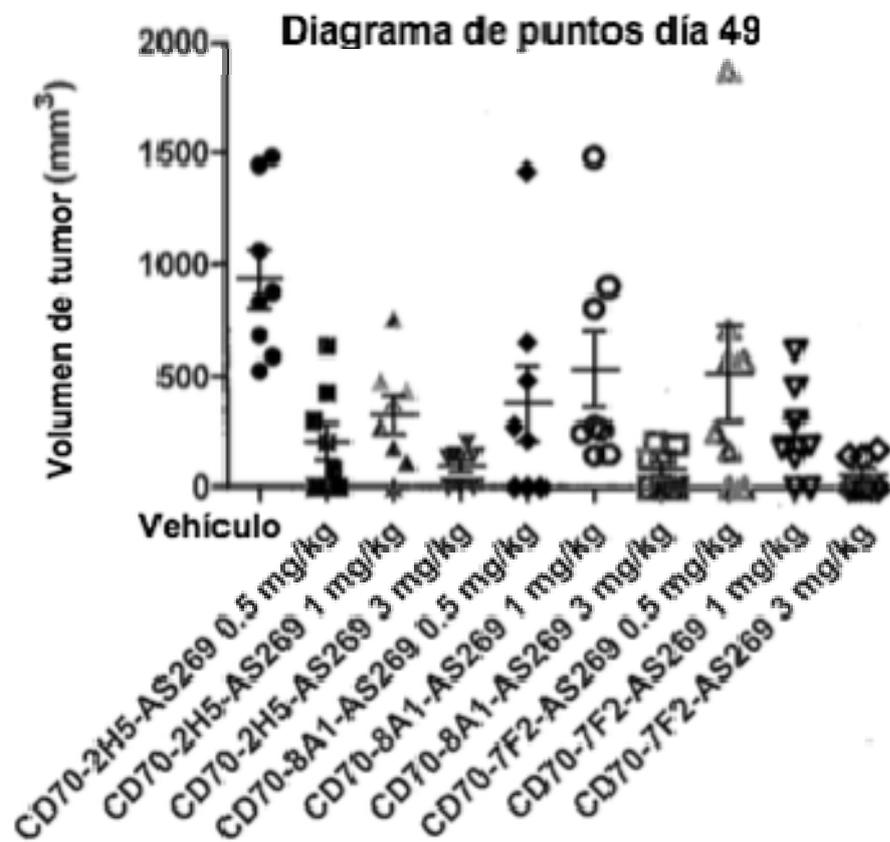


FIGURA 6A:

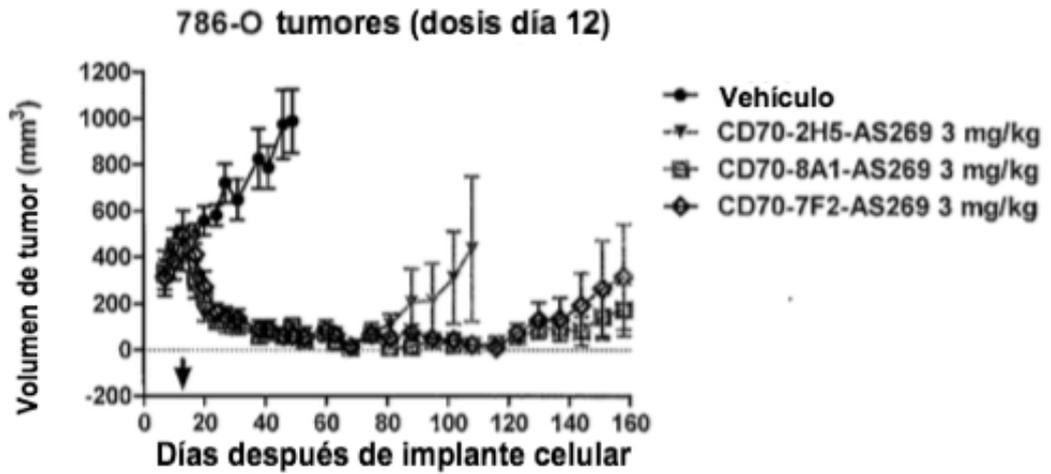


FIGURA 6B:

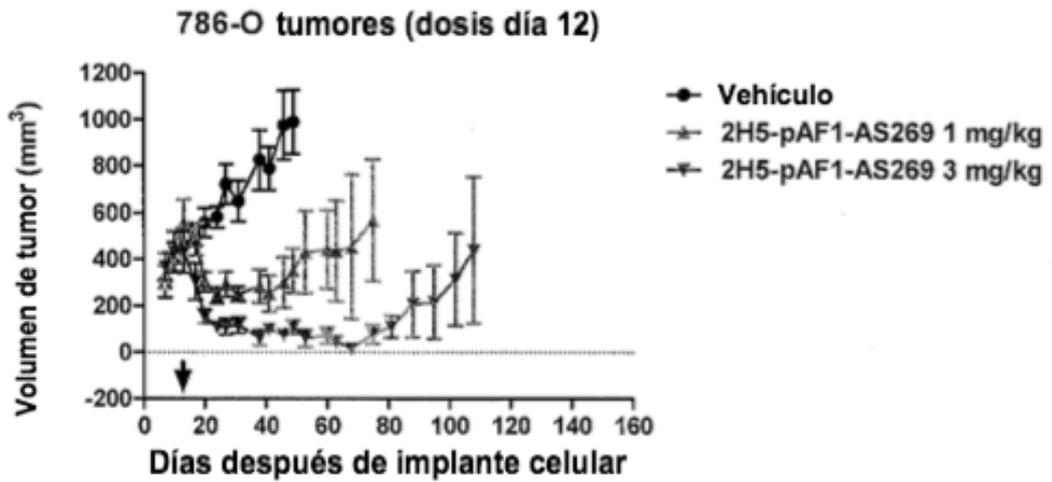


FIGURA 6C:

