

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 951**

51 Int. Cl.:

A61K 47/65 (2007.01) **A61K 47/60** (2007.01)

A61K 47/68 (2007.01)

C07D 417/14 (2006.01)

C07D 295/192 (2006.01)

C07K 17/06 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/407 (2006.01)

C07D 241/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/US2013/077306**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14100762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13865282 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2935259**

54 Título: **Enlazadores autoinmoladores hidrófilos y conjugados de los mismos**

30 Prioridad:

21.12.2012 US 201261745448 P

14.03.2013 US 201361785027 P

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

30.05.2019

73 Titular/es:

BIOALLIANCE C.V. (50.0%)

Kingsfordweg 103

1043 GP Amsterdam, NL y

ABGENOMICS INTERNATIONAL INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

LIN, RONG-HWA;

LIN, SHIH-YAO;

HSIEH, YU-CHI y

HUANG, CHIU-CHEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 714 951 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

Enlazadores autoinmoladores hidrófilos y conjugados de los mismos

5 **Campo de la invención**

La invención se encuentra en el campo de los productos farmacéuticos y proporciona conjugados de fármacos para el suministro de fármacos a poblaciones celulares, en los que los profármacos son metabolizados y activados por enzimas endógenas para proporcionar fármacos activos.

10

Antecedentes

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) son una clase de productos terapéuticos que combinan la especificidad de los anticuerpos monoclonales (mAb) con la potencia de las moléculas citotóxicas. Los ADC aprovechan las características de ambos componentes y expanden significativamente el índice terapéutico de las moléculas citotóxicas al minimizar la exposición sistémica y la toxicidad asociada, al mismo tiempo que maximizan la administración de los agentes citotóxicos a la lesión objetivo, aumentando así la eficacia del tratamiento. Brentuximab Vedotin (SGN-35), un anticuerpo anti-CD30 conjugado con el agente citotóxico MMAE, ya está aprobado para tratar el linfoma recidivante positivo para CD30.

20

Target antigen selection, internalization of ADCs by tumor cells, and potency of cytotoxic drugs are parameters for ADC development (Carter 2008, Teicher 2009). Adicionalmente, el diseño de enlazadores químicos para unir covalentemente estos bloques componentes para formar un ADC también desempeña un papel en el desarrollo de los ADC (Ducry 2010). Por ejemplo, el enlazador debe ser estable en el torrente sanguíneo para limitar el daño al tejido sano. La descomposición o degradación de los ADC puede liberar el fármaco citotóxico antes de su administración en los sitios objetivo. Sin embargo, una vez que los ADC alcanzan los sitios objetivo, deben liberar el fármaco citotóxico de manera eficiente en su forma activa. El equilibrio entre la estabilidad del plasma y la liberación eficiente del fármaco en la célula objetivo aún no se ha encontrado, lo cual puede depender del diseño del enlazador.

25

Al menos tres tipos de enlazadores se aplican en el diseño de ADC, concretamente, enlazadores químicamente lábiles, enlazadores enzimático-lábiles y enlazadores no escindibles (Ducry 2010). Para los enlazadores químicamente lábiles, tal como el enlazador de hidrazona para Mylotarg y el enlazador de 4-mercaptopentanoato que contiene disulfuro para DM1/DM4, la escisión selectiva del enlazador y la liberación de la carga útil para el ADC se basa en las propiedades diferenciales del enlazador entre el plasma y algún compartimento citoplásmico. Los enlazadores son relativamente estables en el entorno de pH neutro de la sangre, pero pueden romperse una vez que el ADC entra en el entorno de pH más bajo dentro de la célula. Un ensayo *in vivo* demostró que los enlazadores químicamente lábiles a menudo sufren de una estabilidad plasmática limitada.

35

Los enlazadores enzimáticos-lábiles adoptan un enfoque alternativo, las actividades diferenciales de las proteasas dentro y fuera de las células, para lograr el control de la liberación del fármaco. Las proteasas normalmente no son activas fuera de las células debido a las condiciones desfavorables del pH y la presencia de inhibidores de la proteasa sérica. Un fármaco puede conjugarse con un anticuerpo a través de un enlace peptídico. El fármaco se puede escindir específicamente del anticuerpo por la acción de las proteasas lisosomales presentes en el interior de las células y en niveles elevados en ciertos tipos de tumores (Koblinsk et al). En comparación con los ADC con enlazador químicamente lábil, Los enlazadores enzimático-lábiles pueden lograr un mejor control de la liberación del fármaco. Sin embargo, el aumento de la hidrofobicidad asociada de algunos enlazadores enzimáticos lábiles puede conducir a la agregación de ADC, particularmente con fármacos fuertemente hidrófobos.

40

45

Una tercera clase de enlazadores es la de los enlazadores no escindibles. Se cree que la liberación del fármaco se produce a través de la internalización del ADC seguida de la degradación del componente del anticuerpo en el lisosoma, dando como resultado la liberación del fármaco que todavía está unido al enlazador. Estos enlazadores no escindibles son estables en suero, pero, en comparación con los enlazadores enzimáticos-lábiles, no puede producirse ningún efecto inespecífico debido al hecho de que los medicamentos liberados están cargados y no pueden difundirse en las células vecinas. Asimismo, ya que la internalización del ADC es un factor para la liberación del fármaco, la eficacia depende del antígeno (y, por tanto, del anticuerpo).

50

55

La tecnología del enlazador afecta a la potencia del ADC, la especificidad y la seguridad. Existe la necesidad de enlazadores para ADC que puedan proporcionar estabilidad en suero, así como un aumento de la solubilidad, lo que permite una conjugación eficiente y liberación intracelular de los fármacos hidrófobos.

60

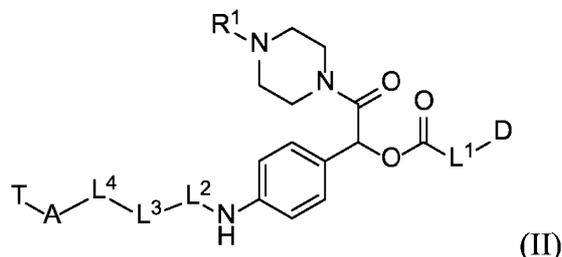
Sumario

Los compuestos de la presente divulgación comprenden un resto de fármaco, un resto objetivo capaz de apuntar a una población celular seleccionada y un enlazador que contiene una unidad acilo, una unidad espaciadora opcional para proporcionar distancia entre el resto de fármaco y el resto dirigido, un enlazador peptídico que se puede escindir en condiciones apropiadas, un enlazador autoinmolador hidrófilo y un segundo espaciador autoinmolador opcional o

65

enlazador de auto-eliminación de ciclación.

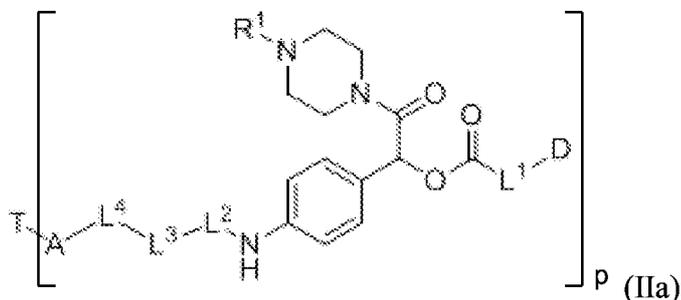
La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (II):



5 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
en donde:

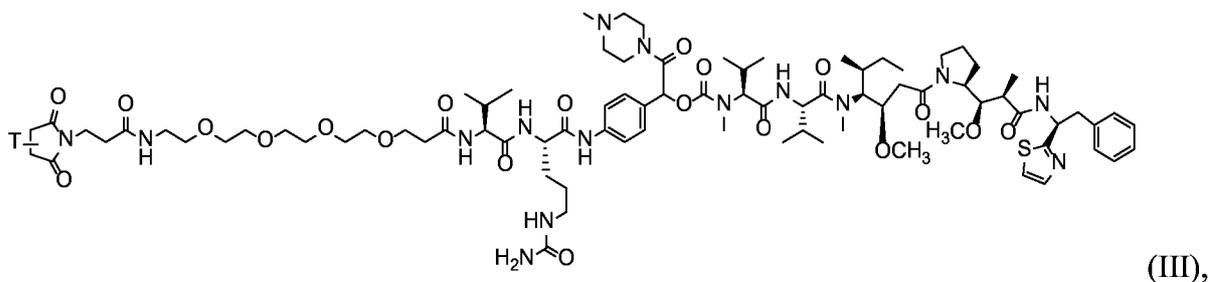
- 10 D es un resto de profármaco;
T es un resto de direccionamiento;
R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;
L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
L² es un enlace, un segundo enlazador auto inmolativo;
15 en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
en el que si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
L³ es un enlazador de péptidos;
L⁴ es un enlace o un espaciador; y
A es una unidad de acilo.

20 En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto de Fórmula (IIa):



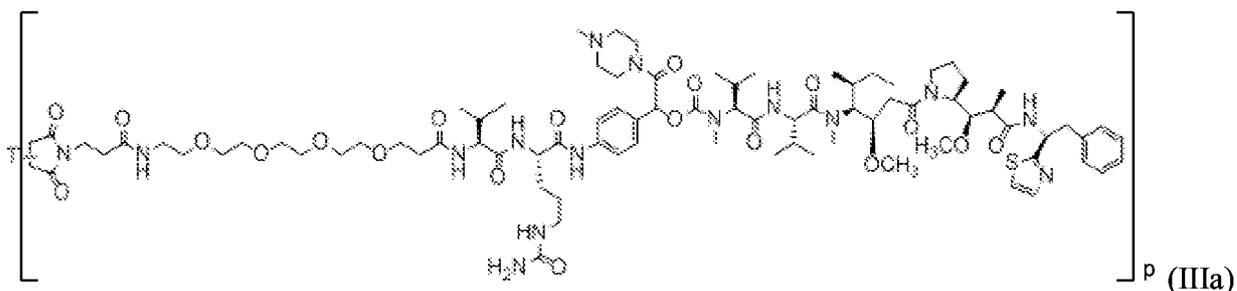
25 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que D, T, L¹, L², L³, L⁴ y A son como se definen para la Fórmula (II), y p es de 1 a 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 8. En algunas realizaciones, p es de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es de 1 a 4. En algunas realizaciones, p es de 2 a 4. En algunas realizaciones, p es 1, 2, 3 o 4.

30 La presente divulgación también proporciona un compuesto de Fórmula (III):



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento.

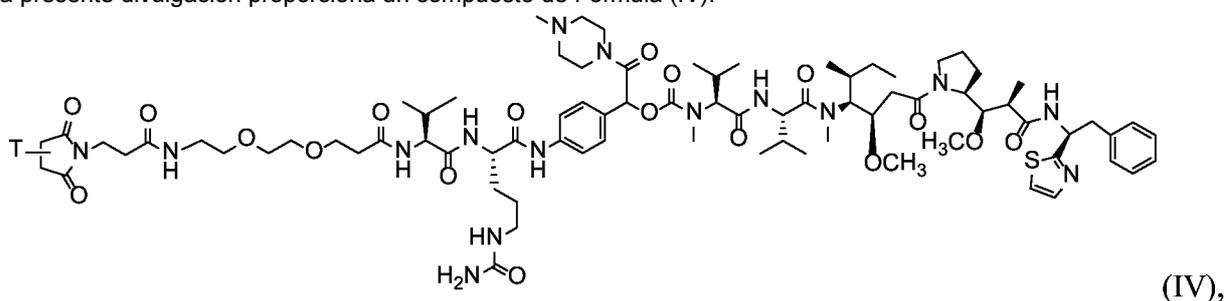
35 En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto de Fórmula (IIIa):



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento y p es de 1 a 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 8. En algunas realizaciones, p es de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es de 1 a 4. En algunas realizaciones, p es de 2 a 4. En algunas realizaciones, p es 1, 2, 3 o 4.

5

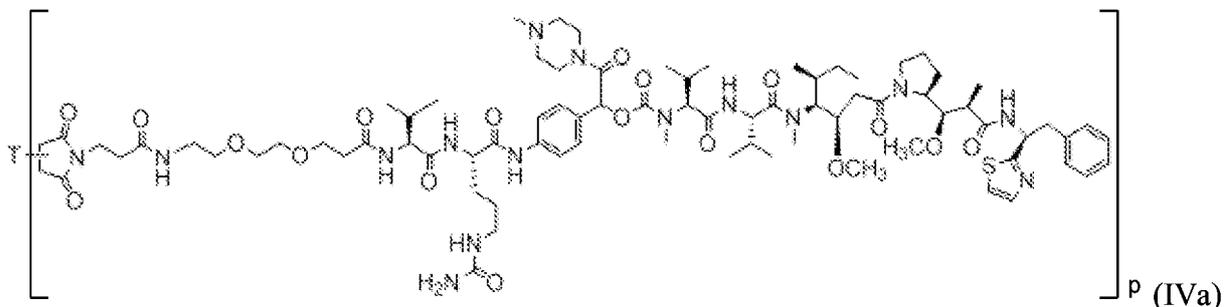
La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (IV):



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento.

10

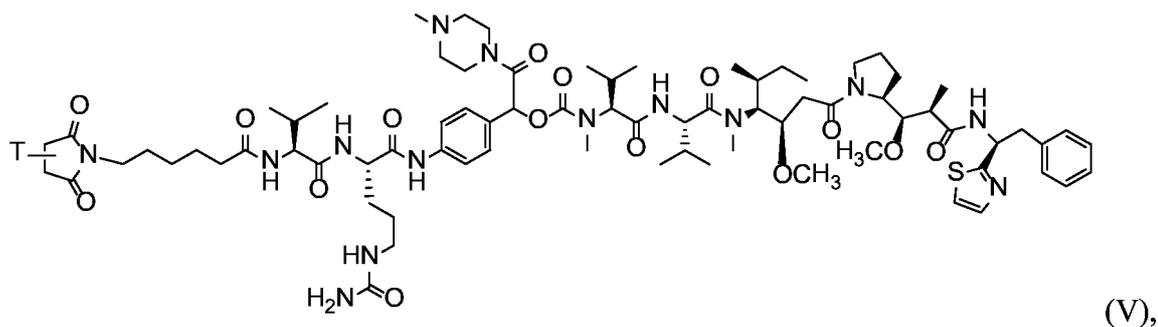
En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto de Fórmula (IVa):



15 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento y p es de 1 a 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 8. En algunas realizaciones, p es de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es de 1 a 4. En algunas realizaciones, p es de 2 a 4. En algunas realizaciones, p es 1, 2, 3 o 4.

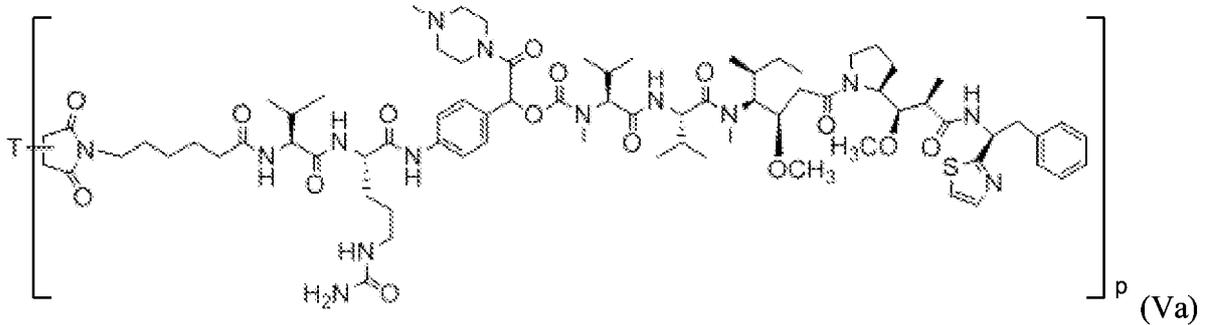
20

La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (V):



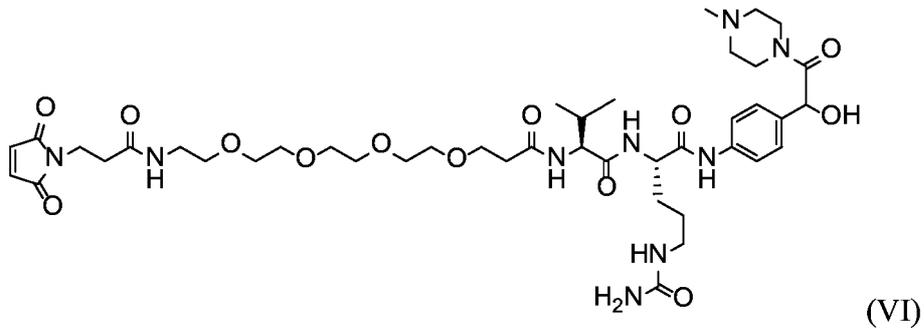
o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento.

En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto de Fórmula (Va):



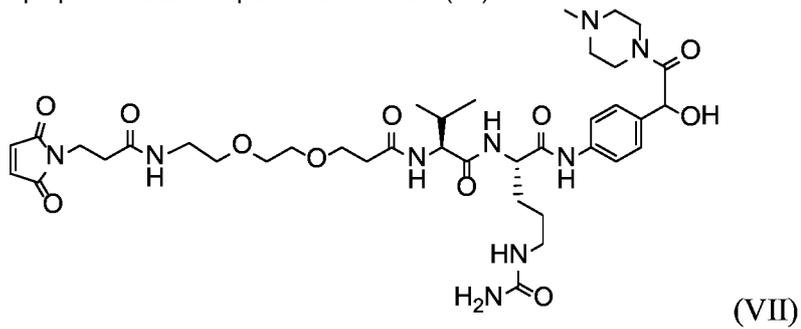
5 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento y p es de 1 a 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 8. En algunas realizaciones, p es de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es de 1 a 4. En algunas realizaciones, p es de 2 a 4. En algunas realizaciones, p es 1, 2, 3 o 4.

10 La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (VI):



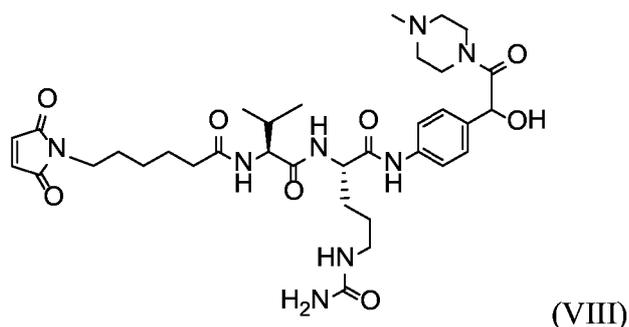
o una sal o solvato del mismo.

15 La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (VII):

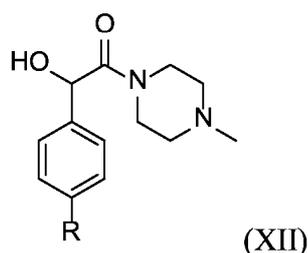


o una sal o solvato del mismo.

20 La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (VIII):



La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (XII):



5

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que R es NO₂ o NH₂.

10 En determinadas realizaciones, el compuesto de las Fórmulas (I)-(XII) es un compuesto seleccionado entre aquellas especies descritas o ilustradas en la descripción detallada en el presente documento.

15 En ciertas realizaciones del compuesto de Fórmulas (I) - (V) o (Ia) - (Va), T es una molécula dirigida a anticuerpos. En algunas realizaciones, T es el anticuerpo h5F1Ca.1 o c5D7. En realizaciones adicionales, uno o más restos de aminoácidos de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo se reemplazan con residuos de cisteína (por ejemplo, diseñados para comprender un residuo de cisteína en una posición que no está presente en el anticuerpo original). En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos de la región Fc del anticuerpo se reemplazan con un residuo de cisteína. En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos de la región Fc del anticuerpo están en las posiciones 157, 169 y/o 442 utilizando la numeración de la UE. En algunas realizaciones del compuesto de Fórmulas (I) - (V) o (Ia) - (Va), D está unido a T por medio del residuo de cisteína agregado (por ejemplo, diseñado).

20

25 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de las Fórmulas (I)-(V) o (Ia)-(Va) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con las realizaciones pueden comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación también proporciona un compuesto de las Fórmulas (I)-(V) o (Ia)-(Va) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como un medicamento.

30 En otro aspecto, la presente divulgación de destrucción de una célula, que comprende el compuesto de las fórmulas (II)-(V) o (Ia)-(Va) para su uso en la administración a la célula de una cantidad del compuesto suficiente para destruir la célula.

30

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el compuesto de las fórmulas (II)-(V) o (IIa)-(Va) para su uso en un método para tratar el cáncer en individuos que lo necesitan, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de a-the

Realizaciones adicionales, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a través de la práctica de la invención.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 muestra la caracterización de HPLC de fase inversa de determinados ADC de las presentes realizaciones. La Figura 1(A) muestra el cromatograma para h5F1Ca.1/Tap-18H. La Figura 1(B) muestra el cromatograma para h5F1Ca.1/MMAE.

La Figura 2 muestra la actividad antitumoral *in vivo* por h5F1Ca.1/Tap18H frente a SNU-16 de cáncer gástrico.

45 La Figura 3 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de ADC conjugado a h5F1Ca.1 frente a SNU-16 de cáncer gástrico.

La Figura 4 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de ADC conjugado a c5D7 frente a DLD-1 de cáncer colorrectal.

La Figura 5 muestra un espectro de RMN de Tap-18H.

La Figura 6 muestra un espectro de RMN de Tap-18Hr1.

La Figura 7 muestra un espectro de RMN de Tap-18Hr2.

5 Definiciones

Los siguientes términos tienen los siguientes significados a menos que se indique otra cosa. Cualquier término sin definir tiene su significado reconocido en la técnica.

10 "Alquilo" se refiere a grupos hidrocarbilo alifático saturado monovalente que tienen de 1 a 10 átomos de carbono y preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono. Este término incluye, a modo de ejemplo, grupos hidrocarbilo lineales y ramificados, tales como metilo (CH_3-), etilo (CH_3CH_2-), n-propilo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$), isopropilo ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$), n-butilo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), isobutilo ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$), sec-butilo ($(\text{CH}_3)(\text{CH}_3\text{CH}_2)\text{CH}-$), t-butilo ($(\text{CH}_3)_3\text{C}-$), n-pentilo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), neopentilo ($(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2-$) y n-hexilo ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5-$).

15 "Alquilenilo" se refiere a grupos hidrocarbilenilo alifático divalente que tienen preferiblemente de 1 a 10 y más preferiblemente 1 a 3 átomos de carbono que son tanto de cadena lineal como ramificados. Este término incluye, a modo de ejemplo, metileno ($-\text{CH}_2-$), etileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), n-propileno ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), iso-propileno ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$), ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$), ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}-$), ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), y similares.

20 "Alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificados que tienen de 2 a 10 átomos de carbono y preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono y que tiene al menos 1 y preferiblemente de 1 a 2 sitios de insaturación de doble enlace. Este término incluye, a modo de ejemplo, bi-vinilo, alilo y but-3-en-1-ilo. Se incluyen dentro de este término los isómeros cis y trans o mezclas de estos isómeros.

25 "Alquenileno" se refiere a grupos hidrocarbilenilo de cadena lineal o ramificados que tienen de 2 a 10 átomos de carbono y preferiblemente de 2 a 4 átomos de carbono y que tienen al menos 1 y preferiblemente de 1 a 2 sitios de insaturación de doble enlace. Este término incluye, a modo de ejemplo, bi-vinilo, alilo y but-3-en-1-ilo. Se incluyen dentro de este término los isómeros cis y trans o mezclas de estos isómeros.

30 "Alquinilo" se refiere a grupos hidrocarbilo lineales o ramificados que tienen de 2 a 6 átomos de carbono y preferiblemente de 2 a 3 átomos de carbono y que tienen al menos 1 y preferiblemente de 1 a 2 sitios de insaturación de triple enlace. Los ejemplos de tales grupos alquinilo incluyen acetilenilo ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) y propargilo ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$).

35 "Alquinileno" se refiere a grupos hidrocarbilenilo lineales o ramificados que tienen de 2 a 6 átomos de carbono y preferiblemente de 2 a 3 átomos de carbono y que tienen al menos 1 y preferiblemente de 1 a 2 sitios de insaturación de triple enlace. Los ejemplos de tales grupos alquinilo incluyen acetilenilo ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) y propargilo ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$).

40 "Amino" se refiere al grupo $-\text{NH}_2$.

45 "Amino sustituido" se refiere al grupo $-\text{NRR}$ donde cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, cicloalquenilo, cicloalquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, heteroarilo y heterociclilo con la condición de que al menos un R no sea hidrógeno.

50 "Arilo" se refiere a un grupo carbocíclico aromático monovalente de 6 a 18 átomos de carbono que tiene un solo anillo (tal como se presenta en un grupo fenilo) o un sistema de anillos que tiene múltiples anillos condensados (los ejemplos de tales sistemas de anillo aromático incluyen naftilo, antrilo e indanilo) cuyos anillos condensados pueden ser o no aromáticos, con la condición de que el punto de unión sea a través de un átomo de un anillo aromático. Este término incluye, a modo de ejemplo, fenilo y naftilo. A menos que se limite otra cosa por la definición, para el sustituyente arilo, tales grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos con de 1 a 5 sustituyentes, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados entre aciloxi, hidroxilo, tiol, acilo, alquilo, alcoxi, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilo sustituido, alcoxi sustituido, alquenilo sustituido, alquinilo sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalquenilo sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, acilamino, alcarilo, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, éster de carboxilo, ciano, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilamino, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioheteroariloxi, sulfonilamino, $-\text{SO}-$ alquilo, $-\text{SO}-$ alquilo sustituido, $-\text{SO}-$ arilo, $-\text{SO}-$ heteroarilo, $-\text{SO}_2-$ alquilo, $-\text{SO}_2-$ alquilo sustituido, $-\text{SO}_2-$ arilo, $-\text{SO}_2-$ heteroarilo y trihalometilo.

60 "Cicloalquilo" se refiere a grupos alquilo cíclicos de 3 a 10 átomos de carbono que tienen anillos cíclicos individuales o múltiples incluyendo sistemas de anillo condensados, puenteados y espiro. Los ejemplos de cicloalquilo adecuados incluyen, por ejemplo, adamantilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo y similares. Dichos grupos cicloalquilo incluyen, a modo de ejemplo, estructuras de anillo individual, tales como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclooctilo, y similares, o múltiples estructuras de anillo, tales como adamantanilo, y similares.

65 "Heteroarilo" se refiere a un grupo aromático de 1 a 15 átomos de carbono, tal como de 1 a 10 átomos de carbono y de 1 a 10 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre dentro del anillo. Tales

grupos heteroarilo pueden tener un solo anillo (tal como, piridinilo, imidazolilo o furilo) o múltiples anillos condensados en un sistema de anillo (por ejemplo como en grupos, tales como, indolizino, quinolinilo, benzofurano, benzoimidazolilo o benzotienilo), en el que al menos un anillo dentro del sistema de anillos es aromático y al menos un anillo dentro del sistema de anillos es aromático, con la condición de que el punto de unión sea a través de un átomo de un anillo aromático. En determinadas realizaciones, el átomo o átomos de nitrógeno y/o azufre del grupo heteroarilo se oxidan opcionalmente para proporcionar los restos N-óxido (N→O), sulfínico o sulfónico. Este término incluye, a modo de ejemplo, piridinilo, pirrolilo, indolilo, tiofenilo y furanilo. A menos que se limite otra cosa por la definición, para el sustituyente heteroarilo, tales grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos con 1 a 5 sustituyentes o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados entre aciloxi, hidroxilo, tiol, acilo, alquilo, alcoxi, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilo sustituido, alcoxi sustituido, alqueno sustituido, alquino sustituido, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno sustituido, amino, amino sustituido, aminoacilo, acilamino, alcarilo, arilo, ariloxi, azido, carboxilo, éster de carboxilo, ciano, halógeno, nitro, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, aminoaciloxi, oxiacilamino, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, tioariloxi, tioheteroariloxi, sulfonilamino, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo y -SO₂-heteroarilo, y trihalometilo.

Los ejemplos de heteroarilos incluyen, pero sin limitación, pirrol, imidazol, pirazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, purina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftilpiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, fenantrolina, isotiazol, fenazina, isoxazol, fenoxazina, fenotiazina, piperidina, piperazina, ftalimida, 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno, tiazol, tiofeno, benzo[b]tiofeno, y similares.

"Heterociclo", "heterocíclico", "heterocicloalquilo" o "heterociclilo" se refiere a un grupo saturado o parcialmente insaturado que tiene un solo anillo o múltiples anillos condensados, incluyendo sistemas condensados, puenteados o espiro, y que tiene de 3 a 20 átomos en el anillo, incluyendo de 1 a 10 heteroátomos. Estos átomos en el anillo se seleccionan entre el grupo que consiste en carbono, nitrógeno, azufre u oxígeno, en donde, en sistemas de anillo condensados, uno o más de los anillos pueden ser cicloalquilo, arilo o heteroarilo, con la condición de que el punto de unión sea a través del anillo no aromático. En determinadas realizaciones, el átomo o átomos de nitrógeno y/o azufre del grupo heterocíclico se oxidan opcionalmente para proporcionar restos N-óxido, -S(O)- o -SO₂-.

Los ejemplos de heterociclos incluyen, pero sin limitación, azetidina, dihidroindol, indazol, quinolizina, imidazolidina, imidazolina, piperidina, piperazina, indolina, 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, tiazolidina, morfolinilo, tiomorfolinilo (también denominado tiamorfolinilo), 1,1-dioxotiomorfolinilo, piperidinilo, pirrolidina, tetrahidrofuranoilo, y similares.

Cuando un grupo heteroarilo o heterociclilo está "sustituido", a menos que se limite otra cosa por la definición por el heteroarilo o sustituyente heterocíclico, tales grupos heteroarilo o heterociclicos pueden estar sustituidos con de 1 a 5, o de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados entre alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, cicloalqueno, cicloalqueno sustituido, acilo, acilamino, aciloxi, amino, amino sustituido, aminoacilo, aminoaciloxi, azido, ciano, halógeno, hidroxilo, oxo, tioceto, carboxilo, éster de carboxilo, tioariloxi, tioheteroariloxi, tioheterociclooxi, tiol, tioalcoxi, tioalcoxi sustituido, arilo, ariloxi, heteroarilo, heteroariloxi, heterociclilo, heterociclooxi, hidroxiamino, alcoxiamino, nitro, sulfonilamino, -SO-alquilo, -SO-alquilo sustituido, -SO-arilo, -SO-heteroarilo, -SO-heterociclilo, -SO₂-alquilo, -SO₂-alquilo sustituido, -SO₂-arilo, -SO₂-heteroarilo y -SO₂-heterociclilo.

"Polialquilenglicol" se refiere a polímeros de polialquilenglicol lineales o ramificados, tales como polietilenglicol, polipropilenglicol y polibutilenglicol. Una subunidad de polialquilenglicol es una sola unidad de polialquilenglicol. Por ejemplo, un ejemplo de una subunidad de polietilenglicol sería un etilenglicol, -O-CH₂-CH₂-O- o propilenglicol, -O-CH₂-CH₂-CH₂-O-, protegido con un hidrógeno en el punto de finalización de la cadena. Otros ejemplos de poli(alquilenglicol) incluyen, pero sin limitación, PEG, derivados de PEG, tales como metoxipoli(etilenglicol) (mPEG), poli(óxido de etileno), PPG, poli(tetrametilenglicol), poli(óxido de etileno - co-óxido de propileno), o copolímeros y combinaciones de los mismos.

"Poliamina" se refiere a polímeros que tienen una funcionalidad de amina en la unidad de monómero, incorporada en la estructura principal, como en polialquilenoinimas, o en un grupo pendiente como en polivinil aminas.

Además de lo desvelado en el presente documento, el término "sustituido", cuando se utiliza para modificar un radical o grupo especificado, también puede significar que uno o más átomos de hidrógeno del radical o grupo especificado están cada uno, independientemente entre sí, reemplazado con el mismo grupo o grupos sustituyentes diferentes como se define más adelante.

Además de los grupos desvelados con respecto a los términos individuales en el presente documento, los grupos de sustituyentes para sustituir a uno o más hidrógenos (dos hidrógenos cualesquiera en un solo carbono pueden reemplazarse con =O, =NR⁷⁰, =N-OR⁷⁰, =N₂ o =S) en átomos de carbono saturados en el radical o grupo especificado son, a menos que se especifique otra cosa, -R⁸⁰, halo, =O, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰, -NR⁸⁰R⁸⁰, trihalometilo, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -S(O)R⁷⁰, -SO₂R⁷⁰, -SO₂O⁻M⁺, -SO₂OR⁷⁰, -OSO₂R⁷⁰, -OSO₂O⁻M⁺, -OSO₂OR⁷⁰, -P(O)(O)₂(M⁺)₂, -P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺, -P(O)(OR⁷⁰)₂, -C(O)R⁷⁰, -C(S)R⁷⁰, -C(NR⁷⁰)R⁷⁰, -C(O)O⁻M⁺, -C(O)OR⁷⁰, -C(S)OR⁷⁰, -C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, -OC(O)R⁷⁰, -OC(S)R⁷⁰, -OC(O)O⁻M⁺, -OC(O)OR⁷⁰, -OC(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)R⁷⁰, -NR⁷⁰CO₂M⁺, -NR⁷⁰CO₂R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ y -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, donde

R⁶⁰ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo, heterocicloalquilo, heterocicloalquilalquilo, cicloalquilalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo y heteroarilalquilo, cada R⁷⁰ es independientemente hidrógeno o R⁶⁰; cada R⁸⁰ es independientemente R⁷⁰ o, como alternativa, dos R⁸⁰, tomados junto con el átomo de nitrógeno al que están enlazados, forman un heterocicloalquilo de a 3, 4, 5, 6 o 7 miembros que puede incluir opcionalmente de 1 a 4 heteroátomos adicionales iguales o diferentes seleccionados entre el grupo que consiste en O, N y S, de los cuales N puede tener sustitución con -H, alquilo C₁₋₄, -C(O)alquilo C₁₋₄, -CO₂alquilo C₁₋₄ o -SO₂alquilo C₁₋₄; y cada M⁺ es un contraión con una sola carga positiva neta. Cada M⁺ puede ser independientemente, por ejemplo, un ion alcalino, tal como K⁺, Na⁺, Li⁺; un ion de amonio, tal como ⁺N(R⁶⁰)₄; o un ion de metal alcalinotérreo, tal como [Ca²⁺]_{0,5}, [Mg²⁺]_{0,5}, o [Ba²⁺]_{0,5} ("el subíndice 0,5 significa que uno de los contraiones para tales iones de metal alcalinotérreo divalentes pueden estar en una forma ionizada de un compuesto de las realizaciones y el otro contraión típico tal como cloruro, o dos compuestos ionizados desvelados en el presente documento pueden servir como contraiones para tales iones alcalinotérreos divalentes, o un compuesto doblemente ionizado de las realizaciones puede servir como el contraión para tales iones de metal alcalinotérreo divalentes).

Además de lo desvelado en el presente documento, los grupos sustituyentes para hidrógenos en átomos de carbono insaturados en grupos alqueno, alquino, arilo y heteroarilo "sustituidos" son, a menos que se especifique otra cosa, -R⁶⁰, halo, -O⁻M⁺, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰, -S⁻M⁺, -NR⁸⁰R⁸⁰, trihalometilo, -CF₃, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, -N₃, -S(O)R⁷⁰, -SO₂R⁷⁰, -SO₃M⁺, -SO₃R⁷⁰, -OSO₂R⁷⁰, -OSO₃M⁺, -OSO₃R⁷⁰, -PO₃⁻²(M⁺)₂, -P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺, -P(O)(OR⁷⁰)₂, -C(O)R⁷⁰, -C(S)R⁷⁰, -C(NR⁷⁰)R⁷⁰, -CO₂M⁺, -CO₂R⁷⁰, -C(S)OR⁷⁰, -C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, -OC(O)R⁷⁰, -OC(S)R⁷⁰, -OCO₂M⁺, -OCO₂R⁷⁰, -OC(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)R⁷⁰, -NR⁷⁰CO₂M⁺, -NR⁷⁰CO₂R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ y -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, donde R⁶⁰, R⁷⁰, R⁸⁰ y M⁺ son como se han definido anteriormente, con la condición de que en caso de alquino o alqueno sustituido, los sustituyentes no sean -O⁻M⁺, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰, o -S⁻M⁺.

Además de los grupos sustituyentes desvelados con respecto a los términos individuales en el presente documento, los grupos sustituyentes para hidrógenos en átomos de nitrógeno en grupos cicloalquilo y heterocicloalquilo "sustituidos" son, a menos que se especifique otra cosa, -R⁶⁰, -O⁻M⁺, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰, -S⁻M⁺, -NR⁸⁰R⁸⁰, trihalometilo, -CF₃, -CN, -NO, -NO₂, -S(O)R⁷⁰, -S(O)₂R⁷⁰, -S(O)₂O⁻M⁺, -S(O)₂OR⁷⁰, -OS(O)₂R⁷⁰, -OS(O)₂O⁻M⁺, -OS(O)₂OR⁷⁰, -P(O)(O⁻)₂(M⁺)₂, -P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺, -P(O)(OR⁷⁰)(OR⁷⁰), -C(O)R⁷⁰, -C(S)R⁷⁰, -C(NR⁷⁰)R⁷⁰, -C(O)OR⁷⁰, -C(S)OR⁷⁰, -C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, -OC(O)R⁷⁰, -OC(S)R⁷⁰, -OC(O)OR⁷⁰, -OC(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ y -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, donde R⁶⁰, R⁷⁰, R⁸⁰ y M⁺ son como se han definido anteriormente.

Además de lo desvelado en el presente documento, en una determinada realización, un grupo que está sustituido tiene 1, 2, 3 o 4 sustituyentes, 1, 2 o 3 sustituyentes, 1 o 2 sustituyentes, o 1 sustituyente.

Se entiende que en todos los grupos sustituidos definidos anteriormente, los polímeros resultado de la definición de sustituyentes con sustituyentes adicionales para los mismos (por ejemplo, arilo sustituido que tiene un grupo arilo sustituido como un sustituyente que se sustituye con un grupo arilo sustituido, que está adicionalmente sustituido con un grupo arilo sustituido, etc.) no están destinados a su inclusión en el presente documento. En tales casos, el número máximo de tales sustituciones es tres. Por ejemplo, las sustituciones en serie de grupos arilo sustituido contempladas específicamente en el presente documento se limitan a arilo sustituido-(arilo sustituido)-arilo sustituido.

A menos que se indique otra cosa, se llega a la nomenclatura de sustituyentes que se definen explícitamente en el presente documento nombrando la porción terminal de la funcionalidad, seguido de la funcionalidad adyacente hacia el punto de unión. Por ejemplo, el sustituyente "arilalquilocarbonilo" se refiere al grupo (aril)-(alquil)-O-C(O)-.

Como para cualquiera de los grupos desvelados en el presente documento que contienen uno o más sustituyentes, se entiende, por supuesto, que tales grupos no contienen ninguna sustitución o patrones de sustitución que sean poco prácticos estéricamente y/o inviables sintéticamente. Además, los compuestos objeto incluyen todos los isómeros estereoquímicos que surgen de la sustitución de estos compuestos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que es aceptable para administración a un paciente, tal como un mamífero (sales con contraiones que tienen una seguridad aceptable en mamíferos para un régimen de dosificación dado). Dichas sales pueden derivarse de bases inorgánicas u orgánicas farmacéuticamente aceptables y de ácidos inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables. "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto, sales que se derivan de diversos contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la materia e incluyen, a modo de ejemplo únicamente, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio, y similares; y cuando la molécula contiene una funcionalidad básica, las sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como clorhidrato, bromhidrato, formiato, tartrato, besilato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares.

La expresión "sal del mismo" significa un compuesto formado cuando un protón de un ácido se reemplaza por un catión, tal como un catión metálico o un catión orgánico y similares. Cuando sea aplicable, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable, aunque esto no es necesario para las sales de compuestos intermedios que no están destinados a la administración a un paciente. A modo de ejemplo, las sales de los presentes compuestos incluyen

aquellas en las que el compuesto está protonado por un ácido inorgánico u orgánico para formar un catión, con la base conjugada del ácido inorgánico u orgánico como el componente aniónico de la sal.

5 "Solvato" se refiere a un complejo formado por la combinación de moléculas de disolvente con moléculas o iones del soluto. El disolvente puede ser un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico o una mezcla de ambos. Algunos ejemplos de disolventes incluyen, pero sin limitación, metanol, *N,N*-dimetilformamida, tetrahidrofurano, dimetilsulfóxido y agua. Cuando el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato.

10 "Estereoisómero" y "estereoisómeros" se refieren a compuestos que tienen la misma conectividad atómica pero diferente disposición atómica en el espacio. Los estereoisómeros incluyen isómeros *cis-trans*, isómeros *E* y *Z*, enantiómeros y diastereómeros.

15 "Tautómero" se refiere a formas alternativas de una molécula que se diferencian únicamente en el enlace electrónico de átomos y/o la posición de un protón, tales como tautómeros enol-ceto e imina-enamina, o las formas tautoméricas de grupos heteroarilo que contienen una disposición de átomo de anillo $-N=C(H)-NH-$, tales como pirazoles, imidazoles, benzoimidazoles, triazoles y tetrazoles. Una persona con una habilidad habitual de la técnica reconocería que son posibles otras disposiciones de átomo de anillo tautoméricas.

20 Se apreciará que la expresión "o una sal o solvato o estereoisómero del mismo" pretende incluir todas las permutaciones de sales, solvatos y estereoisómeros, tales como un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable de un estereoisómero de un compuesto objeto.

25 Como se usa en el presente documento, una "dosis eficaz" o "cantidad eficaz" de medicamento, compuesto, conjugado, conjugado de fármaco, el conjugado de fármaco anticuerpos o la composición farmacéutica es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados tales como la eliminación o la reducción del riesgo, la disminución de la gravedad, o el retraso del inicio de la enfermedad, incluyendo los síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y los fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como la disminución de uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad, reducir la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, potenciar el efecto de otra medicación tal como dirigir, o retrasar la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia. En el caso de cáncer o tumor, una cantidad eficaz del medicamento puede tener el efecto de reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los fines de la presente descripción, una dosificación eficaz de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para llevar a cabo el tratamiento profiláctico o terapéutico tanto directa como indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede conseguirse o no junto con otro fármaco, compuesto, o composición farmacéutica. Por lo tanto, se puede considerar una "dosis eficaz" en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos y se puede considerar que un único agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, puede darse o se consigue un resultado deseable.

45 Como se usa en el presente documento, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de otra modalidad de tratamiento al individuo.

50 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" o "tratar" es una estrategia para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo, preferentemente, resultados clínicos. Para los fines de la presente descripción, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: reducir la proliferación de (o destruir) células cancerosas, disminuir los síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad, reducir la dosis de otras medicaciones necesarias para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

60 Como se usa en el presente documento, "retrasar el desarrollo de una enfermedad" significa diferir, impedir, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer el desarrollo de la enfermedad (como el cáncer). Este retraso puede ser de diferentes períodos de tiempo, dependiendo de los antecedentes de la enfermedad y/o del individuo que se trate. Como es evidente para un experto en la materia, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, incluir la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolla la enfermedad. Por ejemplo, un cáncer en etapa tardía, tal como el desarrollo de metástasis, puede retrasarse.

65 Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero, más preferentemente, un ser humano. Los mamíferos también incluyen, pero sin limitación, animales de granja, animales para el deporte, mascotas (tales como gatos, perros, caballos), primates, ratones y ratas.

Como se usa en el presente documento, el término "reconoce específicamente" o "se une específicamente" se refiere a interacciones medibles y reproducibles, como la atracción o unión entre un objetivo y un anticuerpo (o una molécula o un resto), que es determinante de la presencia del objetivo en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluidas las moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferentemente a un epítipo es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que la que se une a otros epítipos de los epítipos objetivo o no objetivo. También se entiende que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une de manera específica o preferente a un primer objetivo puede o no unirse de manera específica o preferente a un segundo objetivo. Como tal, "unión específica" o "unión preferente" no necesariamente requieren (aunque puede incluir) unión exclusiva. Un anticuerpo que se une específicamente a un objetivo puede tener una constante de asociación de al menos aproximadamente 10^3 M^{-1} o 10^4 M^{-1} a veces aproximadamente 10^5 M^{-1} o 10^6 M^{-1} , en otros casos de aproximadamente 10^6 M^{-1} o 10^7 M^{-1} aproximadamente 10^8 M^{-1} a 10^9 M^{-1} , o aproximadamente 10^{10} M^{-1} a 10^{11} M^{-1} o superior. Se pueden usar diversos formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, para una descripción de los formatos de inmunoensayo y las condiciones que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

Como se usa en el presente documento, los términos "cáncer" "tumor," "canceroso," y "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, carcinoma, incluyendo adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma y sarcoma. Entre los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamocelular de pulmón, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, glioma, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, tal como el carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, mesotelioma, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de testículos, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "uno", y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a un "anticuerpo" es una referencia a de una a muchas realizaciones, tales como cantidades molares, e incluye equivalentes de las mismas conocidas para los expertos en la materia, etc.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro per se. Por ejemplo, una descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Se entiende que aspectos y variaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "que consiste" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y variaciones.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona con una habilidad habitual en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque también pueden usarse en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales preferidos.

Salvo que se indique lo contrario, los métodos y técnicas de las presentes realizaciones se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales ya conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se mencionan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Loudon, *Organic Chemistry*, 4ª edición, Nueva York: Oxford University Press, 2002, pp. 360-361, 1084-1085; Smith y March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5ª edición, Wiley-Interscience, 2001.

La nomenclatura usada en el presente documento para nombrar los compuestos objeto se ilustra en los Ejemplos en el presente documento. Esta nomenclatura se ha obtenido generalmente usando el software AutoNom disponible en el mercado (MDL, San Leandro, Calif.).

Se apreciará que determinadas características de la invención, que son, en aras de la claridad, descritas en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que son, en aras de la brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones que pertenecen a los grupos químicos representados por las variables están abarcadas específicamente por la presente invención y se divulgan en el presente documento como si se hubiesen divulgado de manera individual y explícita todas y cada una de las combinaciones, en la medida en que tales

combinaciones abarcan compuestos que son compuestos estables (es decir, compuestos que pueden aislarse, caracterizarse y ensayarse su actividad biológica). Además, todas las subcombinaciones de los grupos químicos listados en las realizaciones que describen tales variables también están abarcadas específicamente por la presente invención y se desvelan en el presente documento como si se hubiesen divulgado de manera individual y explícita en el presente documento todas y cada una de tales subcombinaciones de grupos químicos.

Descripción detallada

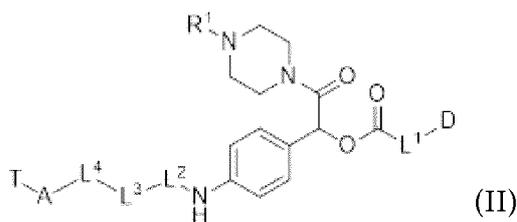
La presente divulgación proporciona compuestos con un enlazador hidrófilo auto inmolativo, que puede ser escindible en condiciones adecuadas e incorpora un grupo hidrófilo para proporcionar mejor solubilidad del compuesto. El enlazador hidrófilo auto inmolativo puede proporcionar una solubilidad aumentada de conjugados de fármaco para fármacos citotóxicos que habitualmente son hidrófobos. Otras ventajas de usar un enlazador auto inmolativo hidrófilo en un conjugado de fármaco incluyen estabilidad aumentada del conjugado de fármaco y agregación disminuida del conjugado de fármaco.

La presente divulgación proporciona que los conjugados de fármacos pueden tener una estabilidad sérica superior. Por ejemplo, a diferencia de los conjugados de fármacos en los que un grupo hidroxilo de un fármaco está unido a un espaciador a través de un enlace carbonato lábil que es susceptible de hidrólisis rápida en un tampón acuoso o suero humano, los conjugados de fármaco de las presentes realizaciones que utilizan un enlace benciloxicarbonilo pueden ser relativamente más estables en las mismas condiciones y pueden sufrir una fragmentación selectiva para liberar el fármaco tras el tratamiento con proteasa, por ejemplo, catepsina B. La estabilidad sérica es una propiedad deseable para los conjugados de fármacos cuando se desea administrar un fármaco inactivo al suero del paciente, tener ese concentrado de fármaco inactivo en un objetivo por medio del ligando y luego convertir ese conjugado de fármaco en una forma activa solo en la vecindad del objetivo.

La presente divulgación proporciona conjugados de fármacos que pueden tener una agregación disminuida. El aumento de la hidrofobicidad asociada de algunos enlazadores enzimáticos lábiles puede conducir a la agregación de conjugados de fármacos, particularmente con fármacos fuertemente hidrófobos. Con la incorporación de un grupo hidrófilo en el enlazador, puede haber disminución de la agregación del conjugado de fármaco.

Los compuestos de la presente divulgación comprenden un resto de fármaco, un resto objetivo capaz de apuntar a una población celular seleccionada y un enlazador que contiene una unidad acilo, una unidad espaciadora opcional para proporcionar distancia entre el resto de fármaco y el resto dirigido, un enlazador peptídico que se puede escindir en condiciones apropiadas, un enlazador autoinmolador hidrófilo y un segundo espaciador autoinmolador opcional o enlazador de auto-eliminación de ciclación. Cada una de las características se trata a continuación.

La presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula (II):



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en donde:

D es un resto de profármaco;

T es un resto de direccionamiento;

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;

L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

en donde si es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;

en el que si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, L¹ entonces es un enlace;

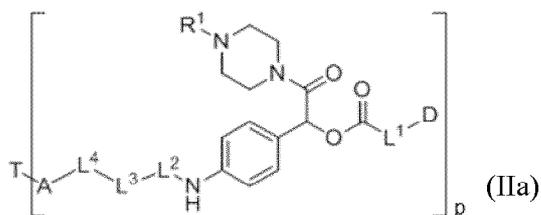
L³ es un enlazador de péptidos;

L⁴ es un enlace o un espaciador; y

A es una unidad de acilo;

o

(ii) fórmula (IIa):



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en donde:

- 5 p es de 1 a 20;
 D es un resto de profármaco;
 T es un resto de direccionamiento;
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;
 10 L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
 L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación,
 entonces L² es un enlace;
 en el que si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
 15 L³ es un enlazador de péptidos;
 L⁴ es un enlace o un espaciador; y
 A es una unidad de acilo.

En algunas realizaciones del compuesto de fórmula (IIa), p es de 1 a 4.

20 Enlazador peptídico

En determinadas realizaciones, L³ es un enlazador peptídico de 1 a 10 restos de aminoácidos. En determinadas realizaciones, L³ es un enlazador peptídico de 2 a 4 restos de aminoácidos. En ciertos casos, L³ es un enlazador dipeptídico.

- 25 Un resto de aminoácido puede ser un resto de aminoácido natural o no natural. Los términos "aminoácido natural" y "aminoácido natural" se refieren a Ala, Asp, Cys, Glu, Phe, Gli, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr. Los "aminoácidos no naturales" (es decir, los aminoácidos no se producen de forma natural) incluyen, a modo de ejemplo no limitante, homoserina, homoarginina, citrulina, fenilglicina, taurina, yodotirosina, seleno-cisteína,
 30 norleucina ("Nle"), norvalina ("Nva"), beta-alanina, L- o D-naftalanina, ornitina ("Orn"), y similares.

Los aminoácidos también incluyen las formas D de aminoácidos naturales y no naturales. "D-" designa un aminoácido que tiene la configuración "D" (dextrorotario), a diferencia de la configuración en los aminoácidos naturales ("L-"). Cuando no se indica una configuración específica, un experto en la técnica entendería que el aminoácido es un L-aminoácido. Los aminoácidos pueden, sin embargo, también estar en mezclas racémicas de la configuración D y L. Los aminoácidos naturales y no naturales se pueden comprar comercialmente (Sigma Chemical Co.; Advanced Chemtech) o sintetizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer sobre la base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre que se mantenga su actividad biológica.

- 40 La secuencia de restos de aminoácidos se puede adaptar específicamente para que se escindan de forma selectiva y enzimática del conjugado de fármaco derivado conjugado resultante por una o más de las proteasas asociadas al tumor.

- 45 En determinadas realizaciones, L³ es un enlazador peptídico que comprende al menos un residuo de lisina o arginina.

En determinadas realizaciones, L³ es un enlazador peptídico que comprende un resto de aminoácido seleccionado de lisina, D-lisina, citrulina, arginina, prolina, histidina, ornitina y glutamina.

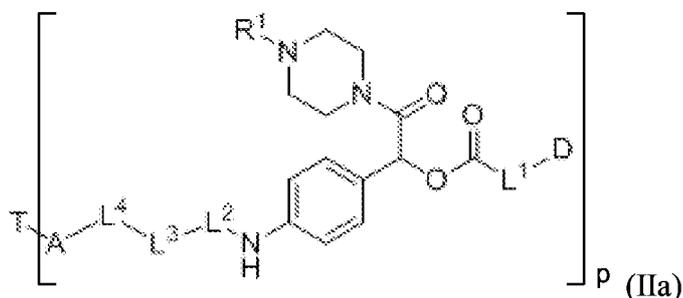
- 50 En determinadas realizaciones, L³ es un enlazador peptídico que comprende un resto de aminoácido seleccionado entre valina, isoleucina, fenilalanina, metionina, asparagina, prolina, alanina, leucina, triptófano y tirosina.

En determinadas realizaciones, L³ es un enlazador dipeptídico seleccionado entre valina-citrulina, prolina-lisina, metionina-D-lisina, asparagina-D-lisina, isoleucina-prolina, fenilalanina-lisina y valina-lisina. En determinadas realizaciones, L³ es valina-citrulina.

- 55 Se pueden diseñar y optimizar numerosas moléculas enlazadores peptídicos específicas adecuadas para su uso en la presente divulgación en su selectividad para la escisión enzimática por una proteasa asociada a tumor particular. Ciertos enlazadores peptídicos para su uso en la presente divulgación son aquellos que están optimizados hacia las

proteasas, catepsina B y D.

En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto de Fórmula (IIa):



5

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que D, T, L¹, L², L³, L⁴ y A son como se definen para la Fórmula (II), y p es de 1 a 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 8. En algunas realizaciones, p es de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es de 1 a 4. En algunas realizaciones, p es de 2 a 4. En algunas realizaciones, p es 1, 2, 3 o 4. En algunas realizaciones, p es 2. En algunas realizaciones, p es 3. En algunas realizaciones, p es 4.

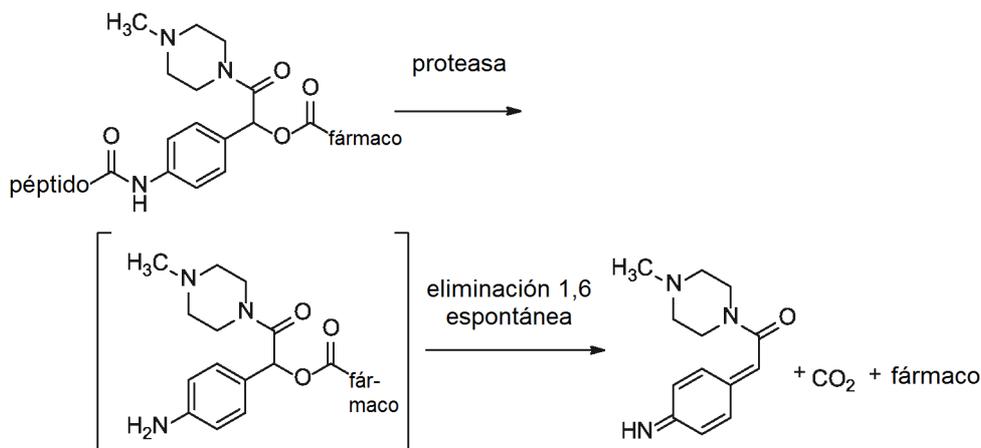
10

En determinadas realizaciones de Fórmula (II) o (IIa), R¹ es hidrógeno. En determinados casos, R¹ es metilo.

La liberación del resto de profármaco está basada en la reacción de auto eliminación de un grupo aminobenciloxycarbonilo. Para propósitos de ilustración, se muestra a continuación un esquema de reacción con un grupo aminobenciloxycarbonilo con un fármaco y un péptido unido.

15

Esquema 1



20

Con respecto al Esquema 1, una vez escindido de un péptido, se forma un aminobenciloxycarbonilo y es capaz de experimentar una eliminación 1,6 espontánea para formar un derivado de ciclohexa-2,5-dienimina y dióxido de carbono y liberar el fármaco.

25 Opcional segundo enlazador autoinmolador o enlazador de auto-eliminación de ciclación

Un segundo enlazador autoinmolador o un enlazador de auto-eliminación de ciclación proporciona un enlazador adicional para permitir el ajuste fino de la escisión del compuesto para liberar el resto de fármaco.

En la Fórmula II o IIIa, L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolador, o un enlazador de auto-eliminación de ciclación; L² es un enlace o un segundo enlazador autoinmolador; en el que si L¹ es un segundo enlazador autoinmolador o un enlazador de auto-eliminación de ciclación, L² es un enlace; y en el que si L² es un segundo enlazador autoinmolador, L¹ es un enlace. Por lo tanto, hay un segundo enlazador autoinmolador opcional o un enlazador de auto-eliminación de ciclación adyacente al enlazador autoinmolador hidrófilo.

35

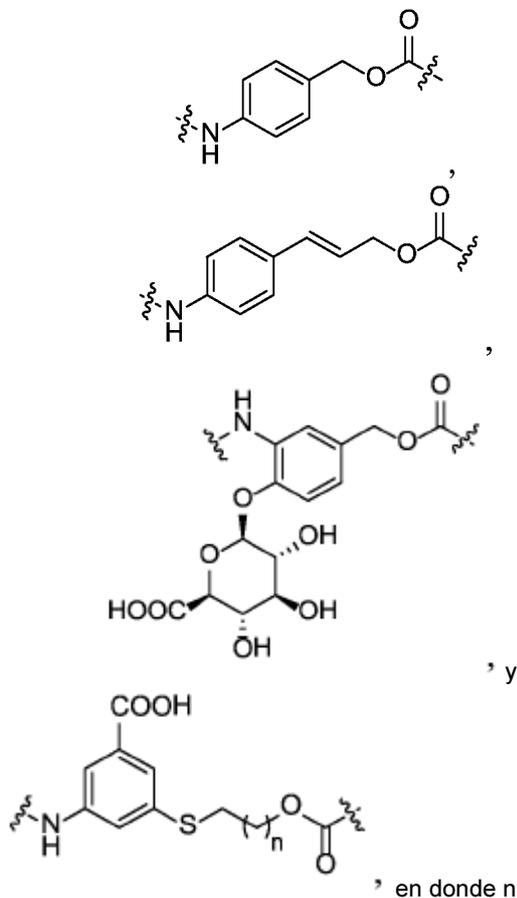
En determinadas realizaciones, L¹ es un enlace y L² es un enlace. En determinadas realizaciones, L¹ es un segundo enlazador autoinmolador o un enlazador de auto-eliminación de ciclación y L² es un enlace. En determinadas realizaciones, L¹ es un enlace y L² un segundo enlazador autoinmolador.

En la Fórmula II o IIIa, en determinadas realizaciones, L¹ es un enlace. En determinadas realizaciones, L¹ es un

40

segundo espaciador autoinmolador, o un enlazador de auto-eliminación de ciclación, que separa el enlazador autoinmolador hidrófilo y el resto de fármaco. En determinadas realizaciones, L¹ es un enlazador de aminobenciloxicarbonilo.

5 En determinadas realizaciones, L¹ se selecciona entre:

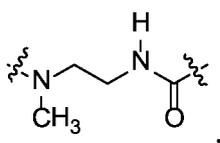


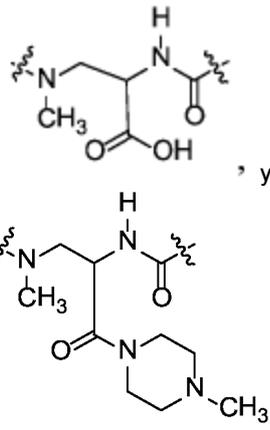
10 En determinados casos, el segundo enlazador auto inmolativo o enlazador de auto eliminación de ciclación proporciona un diseño potencial para una diversidad más amplia de restos que pueden usarse. Por ejemplo, en la Fórmula (II) o (IIa), un enlazador de carbamato, enlazador (-O-C(O)-N(H)-), entre el enlazador auto inmolativo hidrófilo y el resto de fármaco proporcionaría un conjugado de fármaco estable y se escindiría fácilmente para proporcionar un

15 resto de fármaco libre. El enlazador auto inmolativo hidrófilo terminará normalmente con un grupo oxicarbonilo (-O-C(O)-). Si el resto de fármaco tiene un grupo reactivo de amino que puede utilizarse para reaccionar para formar un grupo carbamato, entonces la segunda unidad auto inmolativa o enlazador de auto eliminación de ciclación no es necesaria; aunque todavía puede emplearse. Sin embargo, si el fármaco no contiene un grupo amino, pero en lugar de

20 esto contiene algún otro grupo funcional reactivo, entonces tales fármacos aún pueden incorporarse en un compuesto que contiene aminobenciloxicarbonilo de las presentes realizaciones incluyendo un segundo, espaciador auto inmolativo intermedio o enlazador de auto eliminación de ciclación entre el resto de fármaco y el grupo aminobenciloxicarbonilo.

25 El enlazador de auto eliminación de ciclación de L¹ siguiente proporciona una unión de restos de fármaco que contienen hidroxilo o que contienen tior al grupo aminobenciloxicarbonilo del enlazador auto inmolativo hidrófilo:

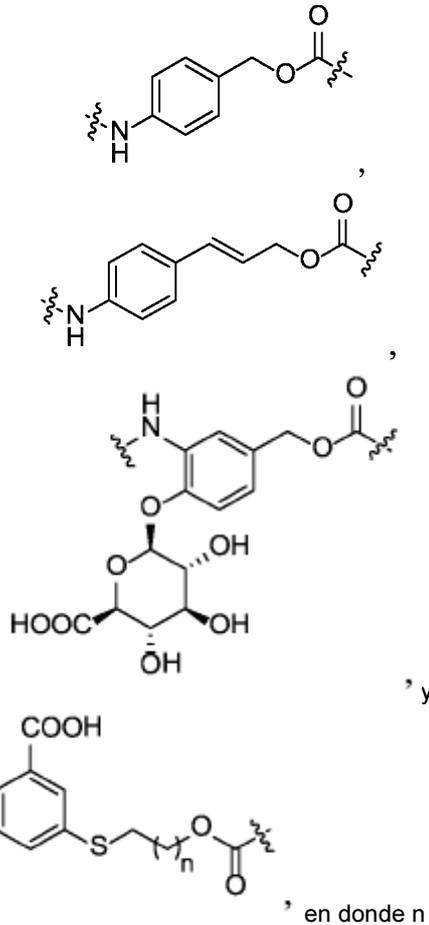




- 5 Los enlazadores de auto eliminación de ciclación en los compuestos de las realizaciones proporcionadas para escisión del compuesto para liberar el resto de fármaco. El mecanismo de eliminación del enlazador auto inmolativo hidrófilo adyacente revelaría un grupo amino de L¹. Después, el grupo amino puede reaccionar con el grupo carbamato o enlazador de tiocarbamato de L¹ y el resto de profármaco en una reacción de ciclación para liberar el resto de profármaco que contiene hidroxilo o que contiene tiol.
- 10 En la Fórmula II o IIa, en determinadas realizaciones, L² es un enlace. En determinadas realizaciones, L² es un segundo espaciador auto inmolativo que separa el enlazador auto inmolativo hidrófilo y el enlazador de péptidos. En determinadas realizaciones, L² es un enlazador de aminobenciloxicarbonilo.

En determinadas realizaciones, L² se selecciona entre

15



20 Espaciador Opcional

En la Fórmula II o IIa, L⁴ es un enlace o un espaciador. En determinadas realizaciones, L⁴ es un enlace. En

determinadas realizaciones, L^4 es un espaciador, que puede proporcionar una distancia entre el resto de fármaco y el resto de direccionamiento.

5 En determinadas realizaciones, un espaciador se selecciona entre alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo, arilo sustituido, cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido y heteroátomos, y combinaciones de los mismos. El espaciador puede ser homogéneo o heterogéneo en su contenido atómico (por ejemplo, espaciadores que contienen únicamente átomos de carbono o espaciadores que contienen átomos de carbono, así como uno o más heteroátomos presentes en el espaciador. Preferentemente, el espaciador contiene de 1 a 50 átomos de carbono y de 0 a 30 heteroátomos seleccionados entre oxígeno, nitrógeno y azufre. El espaciador también puede ser quiral o aquiral, lineal, ramificado o cíclico.

15 En determinadas realizaciones, L^4 es un espaciador seleccionado entre polialquilenglicol, alquileo, alquenileno, alquinileno y poliamina. Los ejemplos de alquenileno incluyen, aunque sin limitación, vinileno (-CH=CH-), alileno (-CH₂C=C-) y but-3-en-1-ileno (-CH₂CH₂C=CH-). Los ejemplos de alquenileno incluyen, aunque sin limitación, acetilnileno (-C≡C-) y propargileno (-CH₂C≡C-).

20 En determinadas realizaciones, L^4 es un espaciador que comprende un grupo funcional que puede proporcionar una unión al extremo terminal del enlazador de péptidos. Grupos funcionales, tales como C(O), C(O)-NH, S(O)₂, y S(O)₂-NH, pueden proporcionar una unión al extremo terminal del enlazador de péptidos. En determinados casos, L^4 es L^{4a} -C(O), L^{4a} -C(O)-NH, L^{4a} -S(O)₂, L^{4a} -S(O)₂-NH, en donde L^{4a} se selecciona entre polialquilenglicol, alquileo, alquenileno, alquinileno y poliamina. En determinados casos, L^4 es L^{4a} -C(O), en donde L^{4a} se selecciona entre polialquilenglicol, alquileo, alquenileno, alquinileno y poliamina.

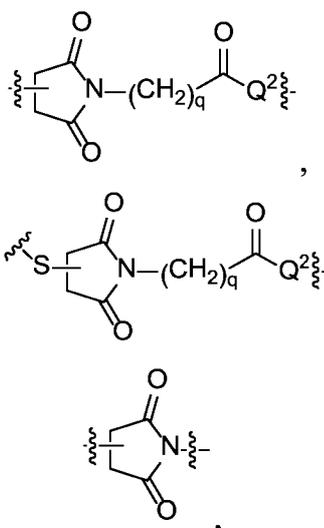
25 En determinadas realizaciones, L^4 es L^{4a} -C(O), en donde L^{4a} es un polialquilenglicol. En determinadas realizaciones, L^4 es L^{4a} -C(O), en donde L^{4a} es un polietilenglicol. En determinadas realizaciones, el espaciador es de la fórmula -CH₂-(CH₂-O-CH₂)_m-CH₂-C(O)-, en la que m es un número entero de 0 a 30.

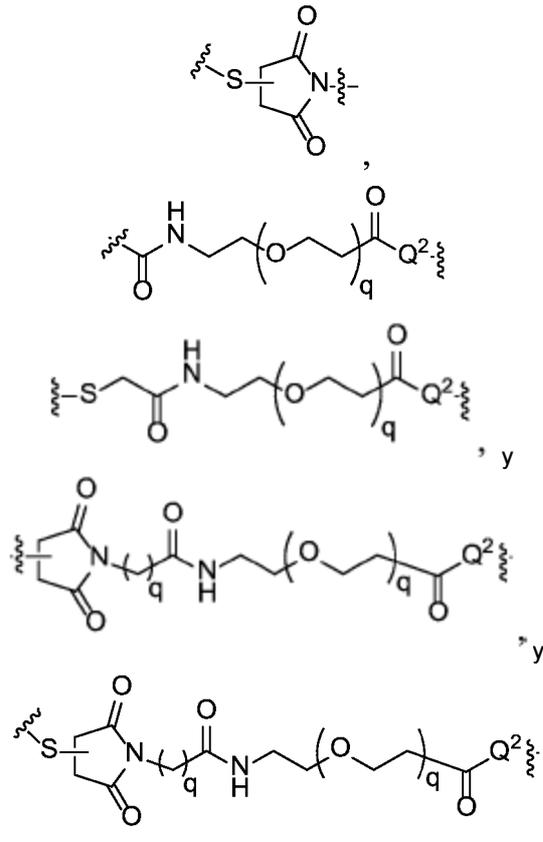
30 En determinadas realizaciones, L^4 es L^{4a} -C(O), en el que L^{4a} es alquileo. En determinadas realizaciones, L^4 es L^{4a} -C(O), en el que L^{4a} es alquileo C₁₋₁₀, alquileo C₁₋₈ o alquileo C₁₋₆. En determinadas realizaciones, L^4 es L^{4a} -C(O), en el que L^{4a} es alquileo C₄, alquileo C₅ o alquileo C₆. En determinadas realizaciones, L^4 es L^{4a} -C(O), en el que L^{4a} es alquileo C₅.

Unidad de Acilo

35 En la Fórmula II o IIa, A es una unidad de acilo. En determinadas realizaciones, la unidad de acilo "A" comprende un átomo de azufre y está unida al resto de direccionamiento mediante un átomo de azufre derivado de un resto de direccionamiento. En tales casos, se forma un enlace ditio entre la unidad de acilo y el resto de direccionamiento.

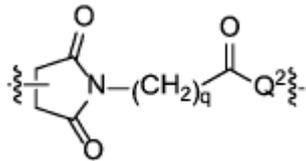
40 En determinadas realizaciones, A se selecciona entre





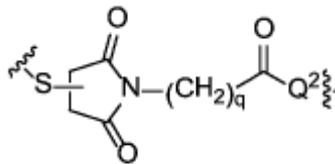
5

en los que Q^2 es NH u O y cada q es independientemente un número entero de 1 a 10.



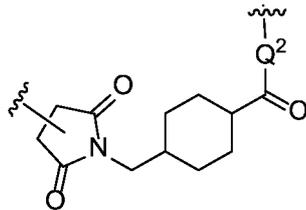
10

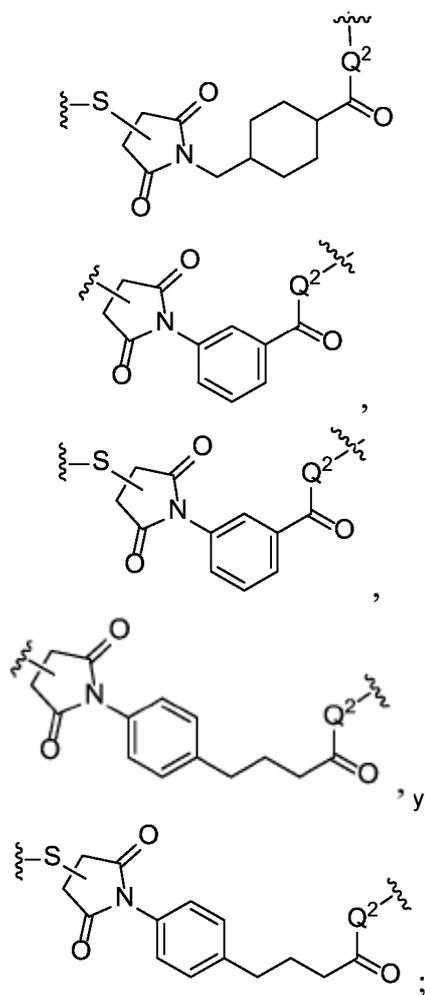
En determinadas realizaciones, A es NH u O y q es un número entero de 1 a 10. En determinados casos, q es un número de 2 a 5, tal como 2, 3, 4 o 5.



En determinadas realizaciones, A es NH u O y q es un número entero de 1 a 10. En determinados casos, q es un número de 2 a 5, tal como 2, 3, 4 o 5.

15 En determinadas realizaciones, A se selecciona entre





5 en el que Q² es NH u O.

Resto de fármaco

10 Los conjugados de fármacos de las presentes realizaciones son eficaces para los propósitos habituales para los cuales los fármacos correspondientes son eficaces, y tienen una eficacia superior debido a su capacidad, inherente en el grupo objetivo, para transportar el fármaco a la célula deseada donde sea de particular beneficio.

15 Los fármacos preferidos para su uso en las presentes realizaciones son fármacos citotóxicos, tales como los que se utilizan para la terapia del cáncer. Tales fármacos incluyen, en general, agentes dañinos para el ADN, antimetabolitos, productos naturales y sus análogos. Ciertas clases de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, los inhibidores de enzimas, tales como los inhibidores de la dihidrofolato reductasa, inhibidores de la timidilato sintasa, intercaladores del ADN, fragmentadores de ADN, inhibidores de topoisomerasas, la familia de fármacos antraciclinas, los fármacos vinca, las mitomicinas, las bleomicinas, los nucleósidos citotóxicos, la familia de fármacos de pteridina, diinenos, las podofilotoxinas, inductores de diferenciación, y taxoles. Algunos miembros útiles de esas clases incluyen, por ejemplo, metotrexato, metopterina, diclorometotrexato, 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, arabinósido de citosina, melfalán, leurosina, leurosideina, actinomicina, daunorubicina, doxorubicina, mitomicina C, mitomicina A, carminomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina y derivados de la podofilotoxina tales como etopósido o etopósido fosfato, vinblastina, vincristina, vindesina, taxol, taxotere ácido retinoico, ácido butírico, N³-acetil espermidina, camptotecina, y sus análogos. Otros medicamentos incluyen dolastatina y duocarmicina.

Un experto en la técnica puede realizar modificaciones químicas en el compuesto deseado para hacer que las reacciones de ese compuesto sean más convenientes para los propósitos de preparar conjugados de la invención.

30 En determinadas realizaciones, D es un resto de fármaco que tiene un grupo funcional químicamente reactivo por medio del cual el fármaco está unido a L¹ o X. En ciertos casos, el grupo funcional se selecciona de una amina primaria, una amina secundaria, hidroxilo y sulfhidrilo. En ciertos casos, el grupo funcional es una amina primaria o una amina secundaria. En ciertos casos, el grupo funcional es hidroxilo. En ciertos casos, el grupo funcional es sulfhidrilo.

35 Como se analizó anteriormente, el enlazador autoinmolador hidrófilo terminará normalmente con un grupo oxicarbonilo

(-O-C(O)-). Por lo tanto, un resto de fármaco que contiene amino reaccionaría fácilmente con el grupo oxicarbonilo para formar un grupo carbamato. En determinadas realizaciones, D es un resto de fármaco que contiene amino, en el que el dmg está conectado a L¹ o X a través del grupo amino.

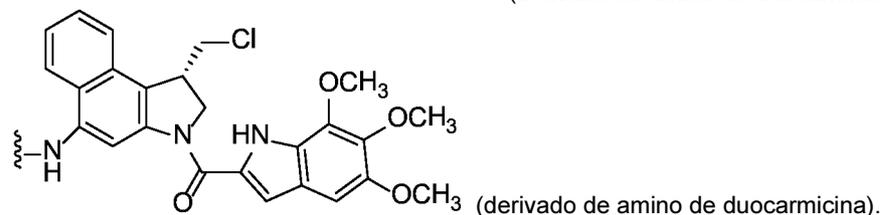
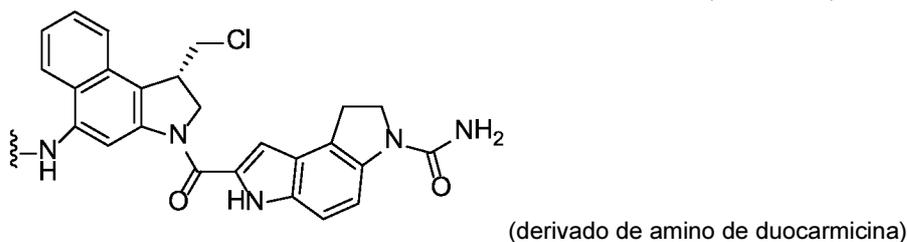
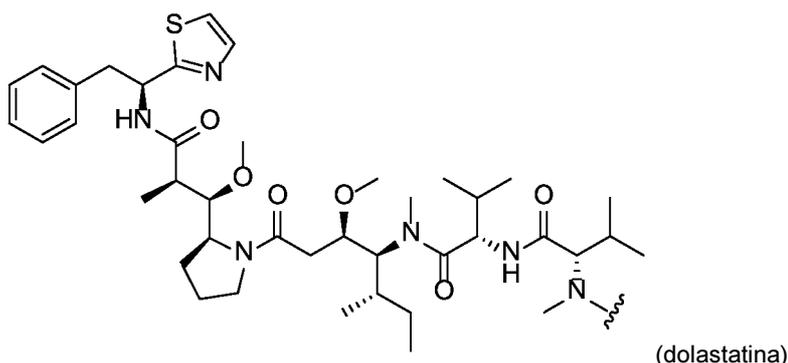
5 Sin embargo, si el resto de fármaco no contiene un grupo amino, el segundo enlazador autoinmolador o enlazador de auto-eliminación de ciclación de L¹ puede proporcionar un potencial de diseño para una variedad más amplia de restos que pueden usarse. En determinadas realizaciones, D es un resto de fármaco que contiene hidroxilo o sulfhidrilo, en el que el fármaco está conectado a L¹ a través del grupo hidroxilo o sulfhidrilo.

10 Los fármacos que contienen amino representativos incluyen mitomicina-C, mitomicina-A, daunorubicina, doxorubicina, aminopterin, actinomicina, bleomicina, 9-amino camptotecina, N⁸-acetil espermidina, 1-(2-cloroetil)-1,2-dimetanosulfonil hidrazida, talisomicina, citarabina, dolastatina y sus derivados. Los medicamentos que contienen aminoácidos también incluyen derivados amino de medicamentos que no contienen naturalmente un grupo amino. En determinadas realizaciones, D es duocarmicina, dolastatina, tubulicina, doxorubicina (DOX),
 15 paclitaxel o mitomicina C (MMC), o sus derivados amino.

Las fármacos representativas que contienen hidroxilo incluyen etopósido, camptotecina, taxol, esperamicina, 1,8-dihidroxi-biciclo [7.3.1] trideca-4-9-dieno-2,6-diin-13-ona, (patente de Estados Unidos n.º 5.198.560),
 20 podofilotoxina, anguidina, vincristina, vinblastina, morfolina-doxorubicina, n-(5,5-diacetoxi-pentil) doxorubicina, duocarmicina y sus derivados.

Los fármacos representativos que contienen sulfhidrilo incluyen esperamicina y 6-mercaptopurina, y sus derivados.

Un determinado grupo de agentes citotóxicos para su uso como fármacos en las presentes realizaciones incluyen
 25 fármacos de las siguientes fórmulas:



30 Resto dirigido

Un resto dirigido como se describe en la presente divulgación se refiere a un resto o molécula que se une específicamente, forma complejos con, reacciona con, o se asocia con una población celular dada. Por ejemplo, un
 35 resto dirigido puede unirse específicamente, formar complejo con, reaccionar con, o asociarse con un resto receptivo o receptor asociado con una población celular dada (por ejemplo, una población celular dada buscada para tratar terapéuticamente o de otra manera modificar biológicamente). En un conjugado descrito en el presente documento, un resto dirigido descrito en el presente documento está enlazado a través de un enlazador a un resto de fármaco en el conjugado. En algunas realizaciones, el resto dirigido es capaz de suministrar un resto de fármaco (por ejemplo, un

resto de fármaco utilizado con fines terapéuticos) a una población de células diana particular a la que se une el resto dirigido, forma complejos con, reacciona con, o se asocia con.

5 El resto dirigido puede incluir, por ejemplo, proteínas de peso molecular grande tales como, por ejemplo, anticuerpos, proteínas, polipéptido o péptido, y resto no peptídico. Una proteína, polipéptido, o resto peptídico descrito en el presente documento puede incluir, por ejemplo, transferrina, albúmina sérica, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento tumoral ("TGF"), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), insulina y factores de crecimiento I y II de tipo insulina. El resto no peptídico puede incluir, por ejemplo, hidratos de carbono, lectinas y apoproteína procedente de una lipoproteína de baja densidad. Una proteína, un anticuerpo, un polipéptido, o un péptido en ciertas realizaciones puede referirse a su forma no modificada, una forma que se ha modificado para ser utilizada en un conjugado descrito en el presente documento, tal como se usa para unirse a un enlazador, o un resto que está en un conjugado descrito en el presente documento.

15 En algunas realizaciones, el resto dirigido es un anticuerpo (o un resto anticuerpo o un resto dirigido contra anticuerpo). En algunas realizaciones, el resto dirigido comprende un anticuerpo. En algunas realizaciones, el resto dirigido comprende un grupo sulfhidrilo (-SH) (por ejemplo, un grupo sulfhidrilo reactivo libre (-SH)) o se puede modificar para que contenga dicho grupo sulfhidrilo. En algunas realizaciones, el resto dirigido comprende un anticuerpo con un grupo sulfhidrilo (por ejemplo, un grupo sulfhidrilo reactivo libre). En algunas realizaciones, el resto dirigido comprende un grupo tiol libre tal como un anticuerpo con un grupo tiol libre o puede modificarse para contener dicho grupo tio. En algunas realizaciones, el resto dirigido que comprende un grupo sulfhidrilo o un grupo tiol se une a un enlazador a través del átomo de azufre en el grupo sulfhidrilo.

25 En algunas realizaciones, el resto dirigido (por ejemplo, un resto dirigido contra el anticuerpo) tiene uno o más sitios de unión para enlazar con el resto del fármaco. Por ejemplo, un resto dirigido T (por ejemplo, un anticuerpo) puede tener múltiples sitios (por ejemplo, múltiples grupos sulfhidrilo) para unirse a un resto de fármaco enlazador (por ejemplo, A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D donde A es adecuado para unión a un grupo sulfhidrilo del anticuerpo de direccionamiento). En algunas realizaciones, el grupo objetivo puede tener de 1 a 20 sitios de unión. En algunas realizaciones, el resto dirigido puede tener de 1 a 20, de 1 a 10, de 1 a 8, de 1 a 6, 1 a 4, 2 a 8, 2 a 4 o 2 a 4 sitios de unión. En algunas realizaciones, el resto dirigido tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 sitios de unión. En algunas realizaciones, el resto dirigido tiene 2 sitios de unión. En algunas realizaciones, el resto dirigido tiene 1 sitio de unión. En algunas realizaciones, el resto dirigido tiene 4 sitios de unión. En algunos casos, ciertos sitios potenciales de unión pueden no ser accesibles para unirse a un grupo farmacológico. Por lo tanto, el número de sitios de unión en un resto dirigido T puede dar como resultado un conjugado de fármaco que tiene menos cantidad de restos de fármaco unidos que el número de sitios potenciales de unión. En algunas realizaciones, uno o más de los sitios de unión pueden ser accesibles para unir un resto farmacológico. Por ejemplo, un resto dirigido al anticuerpo puede tener uno o dos grupos sulfhidrilo en cada cadena del anticuerpo accesible para unirse al resto de fármaco a través de un enlazador.

40 En algunas realizaciones, el resto dirigido es un anticuerpo o un resto dirigido de anticuerpo. Un anticuerpo descrito en el presente documento se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a un objetivo, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, *etc.*, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, pero también sus fragmentos de unión a antígeno (como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de la misma), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. En función por secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstas pueden además dividirse en "subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

55 Un anticuerpo incluido o usado en un resto dirigido descrito en el presente documento (o un resto dirigido contra un anticuerpo) puede abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, *etc.*), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos), monocatenarios (ScFv), anticuerpos biespecíficos, anticuerpos multispecíficos, mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida. Los anticuerpos pueden ser murinos, rata, camello, humanos o cualquier otro origen (incluidos los anticuerpos humanizados). En algunas realizaciones, un anticuerpo utilizado en un resto dirigido descrito en el presente documento (o un resto dirigido de anticuerpo) es cualquiera de los siguientes: anticuerpo biespecífico, multispecíficos, monocatenario, moléculas bifuncionales, y quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido conferido por al menos una región hipervariable (HVR) o región determinante de complementariedad (CDR) del anticuerpo. Los anticuerpos utilizados en la presente divulgación también incluyen

anticuerpos de dominio único que son el dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo o el dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo. Holt *et al.*, *Trends Biotechnol.* 21:484-490, 2003. Procedimientos para hacer anticuerpos de dominio que comprenden el dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo o el dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo, que contiene tres de los seis HVR o CDR de origen natural de un anticuerpo, También son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Muyldermans, *Rev. Mol. Biotechnol.* 74:277-302, 2001.

En algunas realizaciones, un anticuerpo incluido o utilizado en un resto dirigido descrito en el presente documento (o un resto dirigido de anticuerpo) es un anticuerpo monoclonal. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), El anticuerpo monoclonal no es una mezcla de anticuerpos discretos. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales utilizados en la presente divulgación pueden producirse por el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495, o puede hacerse mediante procedimientos de ADN recombinante como los descritos en las patentes de EE.UU. N.º 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., 1990, *Nature*, 348: 552-554, por ejemplo.

En algunas realizaciones, un anticuerpo incluido o utilizado en un resto dirigido descrito en el presente documento (o un resto dirigido de anticuerpo) es un anticuerpo quimérico. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo que tiene una región variable o parte de una región variable de una primera especie y una región constante de una segunda especie. Un anticuerpo quimérico intacto comprende dos copias de una cadena ligera quimérica y dos copias de una cadena pesada quimérica. La producción de anticuerpos quiméricos es conocida en la técnica (Cabilly y col., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:3273-3277; Harlow y Lane (1988), *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory). Normalmente, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable de ambas cadenas ligeras y pesadas imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otro. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que, por ejemplo, las regiones variables pueden derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas utilizando hibridomas o células B fácilmente disponibles de organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Mientras que la región variable tiene la ventaja de ser fácil de preparar, y la especificidad no se ve afectada por su origen, la región constante que es humana tiene menos probabilidades de provocar una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, La definición no se limita a este ejemplo en particular.

En algunas realizaciones, un anticuerpo incluido o usado en un resto dirigido descrito en el presente documento (o un resto dirigido contra anticuerpo) es un anticuerpo humanizado. Como se usa en el presente documento, los anticuerpos humanizados se refieren a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina, o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen al antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de un HVR o CDR del receptor se reemplazan por residuos de un HVR o CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como el ratón, rata, o conejo que tiene la especificidad deseada, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, Los residuos de la región de la estructura Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la HVR o CDR importada o secuencias marco, pero se incluyen para refinar y optimizar aún más el rendimiento de anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en la que todas o sustancialmente todas las regiones HVR o CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima al menos una parte de una región o dominio (Fc) de inmunoglobulina constante, normalmente de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos pueden tener regiones Fc modificadas como se describe en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen uno o más HVR o CDR (uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que se han alterado con respecto al anticuerpo original, que también se denominan uno o más HVR o CDR "derivados de" uno o más HVR o CDR del anticuerpo original.

En algunas realizaciones, un anticuerpo incluido o usado en un resto dirigido descrito en el presente documento (o un resto dirigido contra anticuerpo) es un anticuerpo humano. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para hacer que los anticuerpos humanos se conozcan en la técnica. Un anticuerpo humano usado en el presente documento incluye anticuerpos que

comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humana o al menos un polipéptido de cadena ligera humana. Un ejemplo de este tipo es un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets y col., 1998, PNAS, (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Los anticuerpos humanos también pueden producirse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Este enfoque se describe en las patentes de EE.UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016. Como alternativa, el anticuerpo humano puede prepararse inmortalizando linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner y col., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95 y la patente de EE.UU. n.º 5.750.373.

En algunas realizaciones, un anticuerpo incluido o utilizado en un resto dirigido descrito en el presente documento (o un resto dirigido contra un anticuerpo) se une específicamente a un antígeno en una célula cancerosa como una célula cancerosa no hematopoyética (por ejemplo, célula de cáncer colorrectal, pancreático o gástrico). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo que contiene carbohidratos en CD43, por ejemplo, un anticuerpo descrito en la patente de EE.UU. N.º 7.674.605, la Patente de los Estados Unidos n.º 7.982.017, PCT/US2007/013587 (Publicación No. WO 2007/146172), o PCT/US2008/087515 (publicación n.º WO 2009/079649). En algunas realizaciones, El anticuerpo es el anticuerpo h5F1Ca.1.

La tabla 1 a continuación muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y ligera 5F1Ca.1 (h5F1Ca.1) humanizada.

Tabla 1 (A). secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de h5F1Ca.1 (SEC ID NO: 1) (las CDR de Kabat en algunas realizaciones están subrayadas); la secuencia en la región constante está en cursiva)

```

1  QVQLVQSGAEVKKPKGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWIRQAPGQGLEWIGYINPYNGGTQY
61  NEKFKGRATLTSDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARTFPYYFDYWGQGTLLTVSSAS
121 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
181 YLSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
241 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
301 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
361 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQ
30  421 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO:1)

```

Tabla 1 (B). secuencia de aminoácidos de cadena ligera de h5F1Ca.1 (SEC ID NO: 2) (las CDR de Kabat en algunas realizaciones están subrayadas); la secuencia en la región constante está en cursiva)

```

1  DVVMTQTPLSLPVTLGEPASISCRSSQSIHLSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRF
61  SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPALTFGGGTKLEIKRTVAAPSV
121 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
35  181 SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:2)

```

En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo h5F1Ca.1 o un anticuerpo derivado del anticuerpo h5F1Ca.1. Las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de h5F1Ca.1 se exponen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una, dos, o tres HVR (o CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo h5F1Ca.1 (o un anticuerpo derivado del anticuerpo h5F1Ca.1). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un fragmento o una región del anticuerpo h5F1Ca.1. En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo h5F1Ca.1. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo h5F1Ca.1. En otra realización más, el fragmento comprende una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo h5F1Ca.1 (o un anticuerpo derivado de h5F1Ca.1). En otra realización más, el fragmento comprende una, dos, o tres HVR (o CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo h5F1Ca.1 (o un anticuerpo derivado de h5F1Ca.1). En algunas realizaciones, la una o más HVR (o CDR) derivadas del anticuerpo h5F1Ca.1 son al menos aproximadamente el 85 %, al menos de aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente al 87 %, al menos de aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente al 89 %, al menos aproximadamente al 90 %, al menos aproximadamente al 91 %, al menos aproximadamente al 92 %, al menos aproximadamente al 93 %, al menos aproximadamente al 94 %, al menos aproximadamente al 95 %, al menos aproximadamente al 96 %, al menos aproximadamente al 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad con al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis HVR (o CDR) de h5F1Ca.1. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una, dos o tres HVR (o CDR) de la SEC

ID NO:1 y/o una región variable de cadena ligera que comprende una, dos o tres HVR (o CDR) de la SEC ID NO:2. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las tres HVR (o CDR) de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende tres HVR (o CDR) de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-118 de la SEQ ID NO: 1 y/o una región variable de la cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-113 de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, El anticuerpo es anticuerpo humanizado.

En algunas realizaciones, un anticuerpo incluido o utilizado en un resto dirigido descrito en el presente documento (o un resto dirigido de anticuerpo) se une específicamente a un receptor de transferrina (como el receptor de transferrina humana) expresado por células cancerosas no hematopoyéticas (por ejemplo, una célula de cáncer de pulmón, de ovario, mama, próstata, hígado, endometrial, colorrectal, pancreático o gástrico). El anticuerpo puede unirse específicamente a una modificación (como un carbohidrato) en un receptor de transferrina expresado por células cancerosas no hematopoyéticas. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un carbohidrato en un receptor de transferrina expresado por células cancerosas no hematopoyéticas. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a un epítipo que contiene carbohidratos en un receptor de transferrina, por ejemplo, un anticuerpo descrito en la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/584.125, presentada el 6 de enero de 2012, o en la solicitud de patente PCT n.º US2013/020263 (publicada como WO 2013/103800). En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo quimérico 5D7-54.17 (c5D7), 5D7-54.17, o un anticuerpo derivado del anticuerpo 5D7-54.17 (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N.º 61/584.125). En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo c5D7.

La tabla 2 a continuación muestra las secuencias de aminoácidos de la secuencia de la cadena pesada y la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo c5D7.

Tabla 2 (A). Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de c5D7 (SEC ID NO: 3) (las CDR de Kabat en algunas realizaciones están subrayadas; la secuencia en la región constante está en cursiva)

```

1  EVQLQDSGPEVVKPGASMKMSCKTSGYKFTGYMDWVKQSLGASFEWIGRVIPSNGDTRY
61  NQKFEGKATLTVDRSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARPLSGNAADYWGQTSVTVSTA
121 STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
181 LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
241 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
301 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
361 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
421 QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:3)

```

Tabla 2 (B). secuencia de aminoácidos de cadena ligera de c5D7 (SEC ID NO: 4) (las CDR de Kabat en algunas realizaciones están subrayadas); la secuencia en la región constante está en cursiva)

```

1  ETTVTQSPASLSVATGKVTIRCITSTDIDDDMNWYQOKPGEPPKLLISDGNTLRPGVPS
61  RFSSSGYGTDFVFTIENTLSEDITDYCYMQSDNMPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFFP
121 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT
181 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:4)

```

En algunas realizaciones, el anticuerpo es el anticuerpo c5D7 o un anticuerpo derivado del anticuerpo c5D7. Las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo c5D7 se exponen en la SEQ ID NO:3 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente (véase la Tabla 2). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una, dos, o tres HVR (o CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo c5D7 (o un anticuerpo derivado del anticuerpo c5D7). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un fragmento o una región del anticuerpo c5D7. En una realización, EL fragmento es una cadena ligera del anticuerpo c5D7. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo c5D7. En otra realización más, el fragmento comprende una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo c5D7 (o un anticuerpo derivado del anticuerpo c5D7). En otra realización más, el fragmento comprende una, dos, o tres HVR (o CDR) de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo c5D7 (o un anticuerpo derivado de c5D7). En algunas realizaciones, las una o más HVR (o CDR) derivadas del anticuerpo c5D7 son al menos aproximadamente el 85 %, al menos de aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente al 87 %, al menos de aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente al 89 %, al menos aproximadamente al 90 %, al menos aproximadamente al 91 %, al menos aproximadamente al 92 %, al menos aproximadamente al 93 %, al menos aproximadamente al 94 %, al menos aproximadamente al 95 %, al menos aproximadamente al 96 %, al menos aproximadamente al 97 %, al menos aproximadamente el 98 %, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad con al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis HVR (o CDR) de anticuerpo c5D7. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una, dos o tres HVR (o CDR) de la SEC ID NO:3 y/o una región variable de cadena ligera que comprende una, dos o tres HVR (o CDR) de la SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones,

el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las tres HVR (o CDR) de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende tres HVR (o CDR) de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO: 3 y/o una región variable de la cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-108 de SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, El anticuerpo es anticuerpo humanizado.

Como se usa en el presente documento, "Porcentaje (%)" de identidad de secuencia de aminoácidos" y "homología" con respecto a una secuencia se refiere al porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y no considerar cualquier sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, Software ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando.

En algunas realizaciones, una CDR descrita en el presente documento es CDR de Kabat, CDR de Chothia o CDR de contacto. En algunas realizaciones, la CDR es una CDR de Kabat. En algunas realizaciones, la CDR es una CDR de Chothia. En otras realizaciones, la CDR es una combinación de una CDR de Kabat y una de Chothia (también denominada "CDR combinada" o "CDR extendida"). En otras palabras, para cualquier realización dada que contenga más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de Kabat, Chothia, y/o combinadas. Los procedimientos para determinar las CDR son conocidos en el campo.

Una región variable de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, en solitario o en combinación. En general, la o las regiones variables median la unión del antígeno y definen la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Las regiones variables pueden tener tramos relativamente invariables denominados regiones marco (FR) (por ejemplo, FR de 15-30 aminoácidos) separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" ("HVR") (por ejemplo, HVR que son cada una 9 -12 aminoácidos de longitud). En algunas realizaciones, los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina beta, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se pueden mantener juntas muy cerca por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes pueden no estar involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero pueden exhibir varias funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Una región constante de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, en solitario o en combinación. Una región constante de un anticuerpo generalmente proporciona estabilidad estructural y otras funciones biológicas como la asociación de la cadena de anticuerpos, secreción, movilidad transplacentaria y unión al complemento, pero no está involucrado con la unión al antígeno. La secuencia de aminoácidos y las secuencias de exones correspondientes en los genes de la región constante dependerán de la especie de la que se deriva; sin embargo, las variaciones en la secuencia de aminoácidos que conducen a los alotipos serán relativamente limitadas para regiones constantes particulares dentro de una especie. La región variable de cada cadena se une a la región constante mediante una secuencia polipeptídica de enlace. La secuencia de enlace está codificada por una secuencia "J" en el gen de la cadena ligera, y una combinación de una secuencia "D" y una secuencia "J" en el gen de la cadena pesada.

El término "región hipervariable" ("HVR") cuando se usa en el presente documento se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, alrededor de los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL, y alrededor de 31-35B (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la VH (en una realización, H1 es de aproximadamente 31-35); Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en la VL, y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en la VH; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Hay múltiples maneras de determinar las CDR, por ejemplo, un enfoque basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* 273:927-948.). Las HVR que son regiones determinantes de la complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de la secuencia y son las más utilizadas (Kabat et al. citado anteriormente). Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un compromiso entre los CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizados por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las

estructuras cristalinas complejas disponibles. Como se usa en el presente documento, una CDR puede ser una CDR definida por cualquiera de los enfoques o por una combinación de dos o tres de los enfoques. La CDR puede ser CDR de Kabat, CDR de Chothia o CDR de contacto. Los residuos de cada una de estos HVR se indican a continuación.

	bucle Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

5 Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2), y 89-97 u 89-96 (L3) en la VL, y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (una realización preferida) (H2), y 93-102, 94-102, o 95-102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable están numerados de acuerdo con Kabat y col., *citado anteriormente*, para cada una de estas definiciones de HVR extendida.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo diseñado por cisteína que comprende un aminoácido cisteína libre en la cadena pesada o la cadena ligera. La ingeniería de un aminoácido cisteína libre en el anticuerpo puede proporcionar una funcionalidad electrofílica reactiva que puede permitir además compuestos de anticuerpos conjugados, como compuestos de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) con moléculas de fármacos en sitios
 15 específicos (es decir, conjugación específica del sitio). Junutula proporciona ejemplos de anticuerpos diseñados con cisteína y medios para generar anticuerpos diseñados mediante cisteína, JR y col., (2008) *Nat. Biotech.* 26(8):925-932; Lyons, A *et al.*, (1990) *Prot. Engineering* 3(8):703-708; y Stimmel, JB y col., (2000) *J. Biol. Chem.* 275(39):30445-30450. En algunas realizaciones, el anticuerpo está diseñado para sustituir los restos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos naturales) en la cadena pesada o ligera con uno o más residuos de cisteína siempre que los
 20 grupos tiol reactivos de los residuos de cisteína tengan poco o ningún impacto del plegamiento o ensamblaje del anticuerpo y no alteran significativamente la unión del antígeno. En algunas realizaciones, los residuos de cisteína se evalúan para determinar la reactividad de los grupos tiol de cisteína diseñados recién introducidos. El valor de la reactividad del tiol es un término numérico relativo en el intervalo de 0 a 1,0 y se puede medir para cualquier anticuerpo diseñado con cisteína. En algunas realizaciones, los valores de reactividad de tiol de los anticuerpos modificados con
 25 cisteína de la invención son cualquiera de aproximadamente 0,6 a 1,0; 0,7 a 1,0; o 0,8 a 1,0. Los anticuerpos diseñados con cisteína para la conjugación específica del sitio proporcionados por el documento WO 2006/034488, el documento WO 2010/141902, el documento WO 2013/093809, el documento WO 2008/038024, el documento WO 2008/070593, el documento WO 2009/092011, WO 2011/005481 y WO 2011/156328.

30 Un anticuerpo diseñado por cisteína puede prepararse mutagenizando una secuencia de ácido nucleico de un anticuerpo parental reemplazando uno o más restos de aminoácidos por cisteína para codificar el anticuerpo diseñado mediante cisteína; expresando el anticuerpo de ingeniería cisteína; y aislando el anticuerpo de ingeniería de cisteína. En algunas realizaciones, el anticuerpo de ingeniería de cisteína es un fragmento de anticuerpo; por ejemplo, un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un anticuerpo de cadena simple (ScFv). En algunas realizaciones, el anticuerpo
 35 está diseñado para incluir una o más sustituciones de cisteína de los restos de aminoácidos S157, T169 y S442 (numeración de la UE). En algunas realizaciones de la invención, una h5F1Ca.1, el anticuerpo c5D7 o un anticuerpo derivado de h5F1Ca.1 o c5D7 está diseñado para comprender uno o más residuos de cisteína libres.

40 En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones de la cadena pesada de IgG se reemplazan con un residuo de cisteína: 40, 43, 84, 88, 103, 112, 113, 114, 115, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 161, 168, 172, 234, 235, 237, 239, 246, 249, 265, 267, 269, 270, 276, 278, 282, 283, 284, 287, 289, 292, 293, 297, 298, 299, 300, 302, 303, 312, 314, 315, 318, 320, 324, 326, 327, 330, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 339, 345, 347, 354, 355, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 398, 399, 392, 393, 400, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 442, 443, y 444; numeración según el índice de la UE de Kabat y col. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA, en lo sucesivo "Kabat").

50 En algunas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez o más restos de aminoácidos en cualquier combinación de las siguientes posiciones de la cadena pesada de IgG se reemplazan con un residuo de cisteína: 40, 43, 84, 88, 103, 112, 113, 114, 115, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 161, 168, 172, 234, 235, 237, 239, 246, 249, 265, 267, 269, 270, 276, 278, 282, 283, 284, 287, 289, 292, 293, 297, 298, 299, 300, 302, 303, 312, 314, 315, 318, 320, 324, 326, 327, 330, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 339, 345, 347, 354, 355, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 370, 373, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 398, 399, 392, 393, 400, 401, 404, 411, 413, 414, 416, 418, 419, 421, 422, 428, 431, 432, 437, 438, 439, 440, 442, 443 y 444; numeración según el índice de la UE de Kabat.

55 En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones de la cadena

ligera lambda de IgG se reemplazan con un residuo de cisteína: 7, 15, 20, 22, 25, 43, 110, 111, 125, 144, 149, 155, 158, 161, 168, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, según el índice de la UE de Kabat.

5 En algunas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez o más restos de aminoácidos en cualquier combinación de las siguientes posiciones de la cadena ligera lambda de IgG se reemplazan con un residuo de cisteína: 7, 15, 20, 22, 25, 43, 110, 111, 125, 144, 149, 155, 158, 161, 168, 185, 188, 189, 191, 197, 205, 206, 207, 208 y 210, según el índice de la UE de Kabat.

10 En algunas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones de la cadena ligera kappa de IgG se reemplazan con un residuo de cisteína: 7, 15, 20, 22, 25, 43, 110, 111, 144, 168, 183 y 210, según la numeración de Kabat.

15 En algunas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez o más restos de aminoácidos en cualquier combinación de las siguientes posiciones de la cadena ligera kappa de IgG se reemplazan con un residuo de cisteína: 7, 15, 20, 22, 25, 43, 110, 111, 144, 168, 183 y 210, según la numeración de Kabat.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo está aislado. Un anticuerpo aislado se refiere a un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. En algunas realizaciones, el anticuerpo es sustancialmente puro. El término "sustancialmente puro" puede referirse a un material con una pureza de al menos el 50 % (es decir, libre de contaminantes), más preferentemente al menos un 90 % de pureza, más preferentemente al menos un 95 % de pureza, más preferentemente al menos un 98 % de pureza, más preferentemente al menos un 99 % de pureza. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo es IgG (como IgG₁, IgG₂, o IgG₄). En algunas realizaciones, el anticuerpo es IgG humana, tal como IgG₁ humana.

30 Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden incluir además análogos y derivados que se modifican, es decir, mediante el enlace covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicho enlace covalente permita al anticuerpo retener su inmunoespecificidad de unión a antígeno. Por ejemplo, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Las modificaciones químicas pueden llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, escisión química específica, acetilación, formulación, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra el resto T en compuestos de fórmulas (I) - (V), o una sal o solvato o estereoisómero de los mismos, es un anticuerpo parcialmente conjugado con un resto de fármaco, de tal manera que puede estar vinculado adicionalmente a restos de fármacos adicionales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se pretende que un compuesto de fórmula (I) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo abarque un compuesto de fórmula (Ia) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo. Asimismo, un compuesto de fórmula (II) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo pretende abarcar un compuesto de fórmula (IIa) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; un compuesto de fórmula (III) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo pretende abarcar un compuesto de fórmula (IIIa) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; un compuesto de fórmula (IV) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo pretende abarcar un compuesto de fórmula (IVa) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; y un compuesto de la fórmula (V) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo pretende abarcar un compuesto de la fórmula (Va) o una sal o solvato o estereoisómero del mismo.

50 Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden incluir anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de células cancerosas o un anticuerpo para el tratamiento del cáncer. Los procedimientos para fabricar anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de células cancerosas son conocidos en la técnica. Los anticuerpos pueden incluir cualquiera de los siguientes: anticuerpo anti-HER2, tal como un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado (por ejemplo, HERCEPTIN (Trastuzumab; Genentech, CA)), anticuerpo anti-CD20 tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico (por ejemplo, RITUXAN (rituximab; Genentech)), OvaRex (AltaRex Corporation, MA), Panorex (Glaxo Wellcome, NC), BEC2 (ImClone Systems Inc., NY), IMC-C225 (ImClone Systems Inc., NY), Vitaxin (MedImmune, Inc., MD), Campath EH (Leukosite, MA), SMART MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA), LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ), SMART ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA), Oncolym (Techniclone, Inc., CA), anticuerpo anti-CD2 tal como mAb anti-CD2 humanizado (por ejemplo, Allomune (BioTransplant, CA)), anticuerpo anti-VEGF tal como anticuerpo anti-VEGF humanizado (por ejemplo, bevacizumab (Genentech, Inc., CA)), CEAcide (Immunomedics, NJ), anticuerpo anti-KDR tal como un anticuerpo quimérico anti-KDR (por ejemplo, IMC-1C11 (ImClone Systems, NJ)), anticuerpo anti-EGFR tal como anticuerpo quimérico anti-EGFR (por ejemplo, Cetuximab (ImClone, NJ)), mAb BR96 (Trail, P. A. y col., Science 1993, 261, 212-215), BR64 (Trail, P A y col., Cancer Research 1997, 57, 100-105), anticuerpos anti-CD30 y mAb contra el antígeno CD 40 como el mAb S2C6. Los anticuerpos pueden incluir además anticuerpos contra cualquiera de los siguientes antígenos: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, alfa fetoproteína, CA 242, anhidrasa carbónica IX (CAIX/CA9), CA 6, cripto, mesotelina, integrina av, LIV-1 (también conocido como SLC39A6 o ZIP6), SLC44A4 (AGS-5), guanilil ciclasa C (GCC), ENPP3, FOLR1, EGFRVIII,

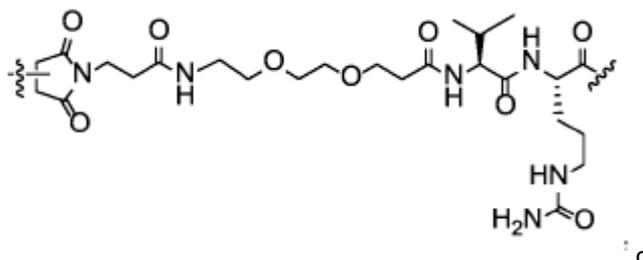
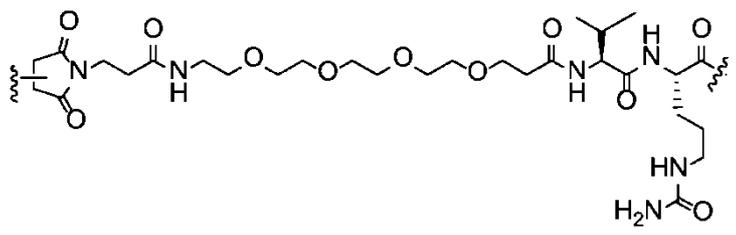
MUC16, receptor endotelial ETB (ETBR), NaPi2b (proteína de transporte de fosfato dependiente de sodio 2b, también conocido como SLC34A2), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), 5T4, STEAP1, nectina-4, GPNMB, molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM), EphA2, receptor alfa de folato (FRA), CanAg, miosina humana no muscular tipo A (nmMHCA), SLITRK6, inmunoglobulina de células T y dominio 1 de mucina (TIM-1, también conocido como HAVCR1), factor de tejido (TF), fosfatasa alcalina placentaria, antígeno específico de la próstata, fosfatasa ácida prostática, factor de crecimiento epidérmico, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, anti-receptor de transferrina, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, PSA, receptor IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, CD138 (sindecán-1), CD79b, CD74, CD70, CD56, CD37, CD19, molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 5 (CEACAM5, también conocida como CD66e), glicoproteína epitelial-1 (EGP-1, también conocida como TROP2, TACSTD2, GA733-1, M1S1), gonadotropina coriónica humana, CD38, CD40, mucina, P21, MPG y el producto del oncogen Neu.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden incluir además anticuerpos que pueden unirse tanto a un receptor como a un complejo de receptor expresado en un linfocito activado. El receptor o el complejo receptor puede comprender un miembro de la superfamilia de los genes de las inmunoglobulinas, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocina, un receptor de la quimiocina, una proteína de histocompatibilidad mayor, una lectina, o una proteína control del complemento. Los ejemplos no limitantes de miembros adecuados de la superfamilia de las inmunoglobulinas son CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1, e ICOS. Los ejemplos no limitantes de miembros adecuados de la superfamilia de receptores de TNF son CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL-RI, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 y APO-3. Los ejemplos no limitantes de integrinas adecuadas son CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 y CD104. Los ejemplos no limitantes de lectinas adecuadas son las lectinas del tipo C, lectina de tipo S, y lectina de tipo I. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden incluir además anticuerpos que son inmuno-específicos para un antígeno viral o microbiano. Un antígeno viral puede incluir cualquiera de los siguientes: un péptido viral, proteína polipeptídica (por ejemplo, gp120 de VIH, nef de VIH, glicoproteína F del VSR, neuramimidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, HTLV tax, glicoproteína del virus del herpes simple (por ejemplo, gB, gC, gD y gE) y el antígeno superficial de la hepatitis B) que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria. Un antígeno microbiano puede incluir cualquiera de los siguientes: un péptido microbiano, polipéptido, una proteína, sacárido, polisacárido, o molécula de lípido (por ejemplo, una bacteria, hongos, protozoo patógeno o polipéptido de levadura incluyendo, por ejemplo, LPS y un polisacárido capsular 5/8) que es capaz de estimular una respuesta inmune.

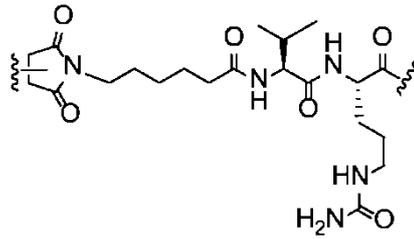
Métodos de fabricar un resto dirigido (por ejemplo, un anticuerpo, un polipéptido, un péptido o resto no peptídico) se conocen en la técnica, tal como los procedimientos descritos en la patente de Estados Unidos n.º 7.674.605, la Patente de los Estados Unidos n.º 7.982.017, PCT/US2007/013587 (Publicación No. WO 2007/146172), o PCT/US2008/087515 (publicación n.º WO 2009/079649).

Enlazadores representativos

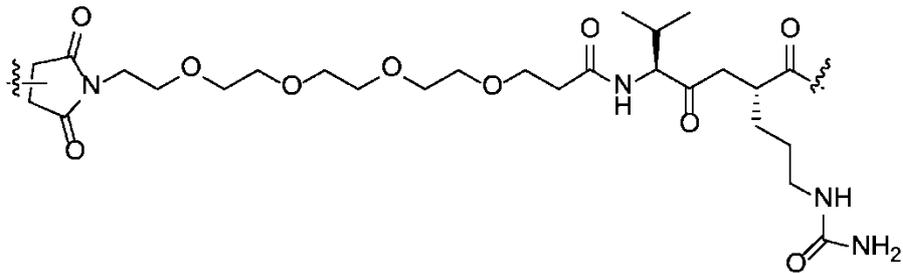
En ciertos casos, la porción "-A-L⁴-L³-L²-" o "-A-L⁴-L³-" en el compuesto de fórmula (II) o (IIa) es:



45

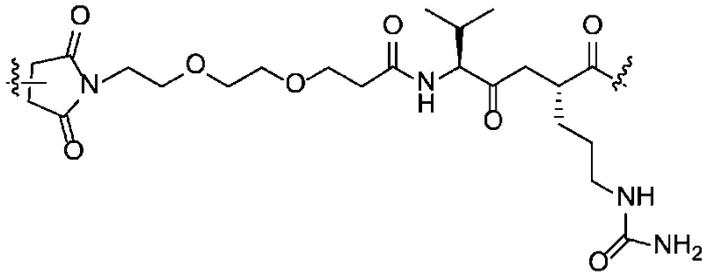


En ciertos casos, la porción "-A-L⁴-L³-L²-" o "-A-L⁴-L³-" en el compuesto de fórmula (II) o (IIa) es:



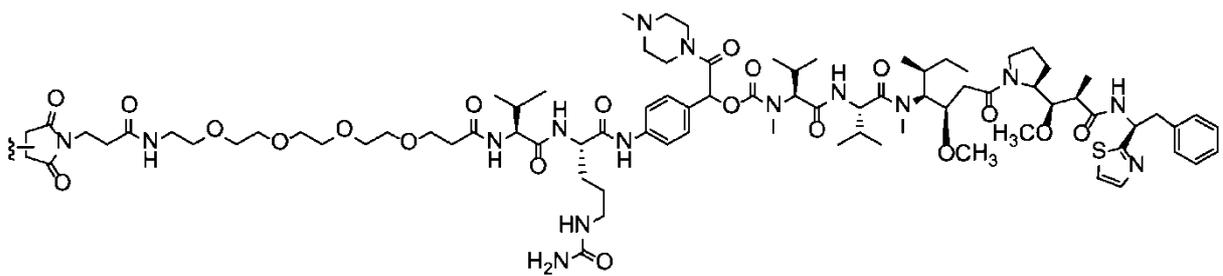
5

En ciertos casos, la porción "-A-L⁴-L³-L²-" o "-A-L⁴-L³-" en el compuesto de fórmula (II) o (IIa) es:

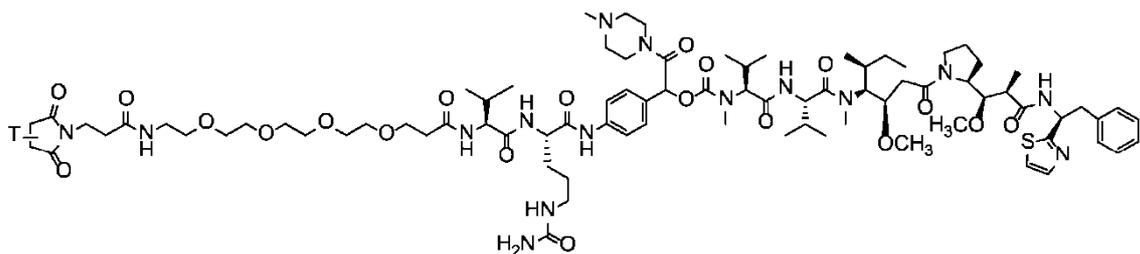


10

En ciertos casos, la porción "-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D" en el compuesto de fórmula (II) o (IIa) es:



En tales casos, la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (III):

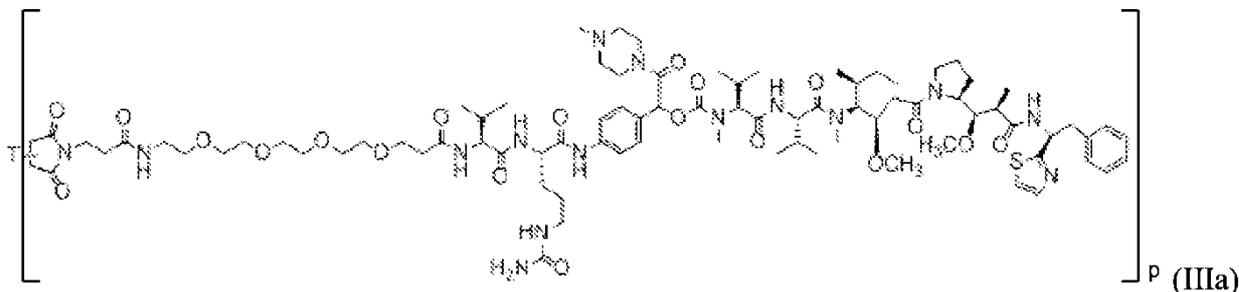


(III),

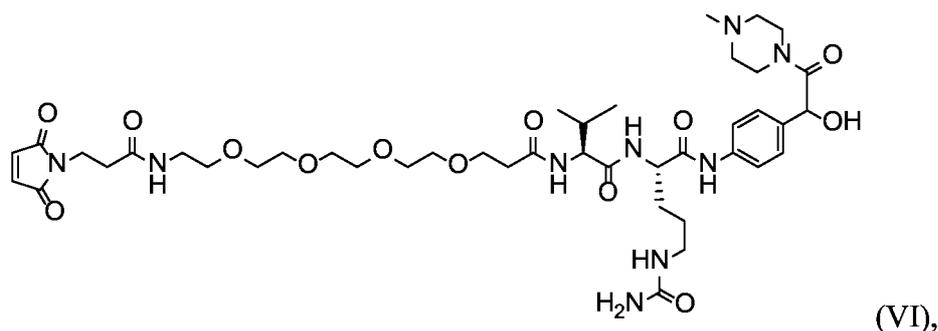
15

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto dirigido. En ciertos casos, en la Fórmula (III), T es un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es h5F1Ca.1 o c5D7.

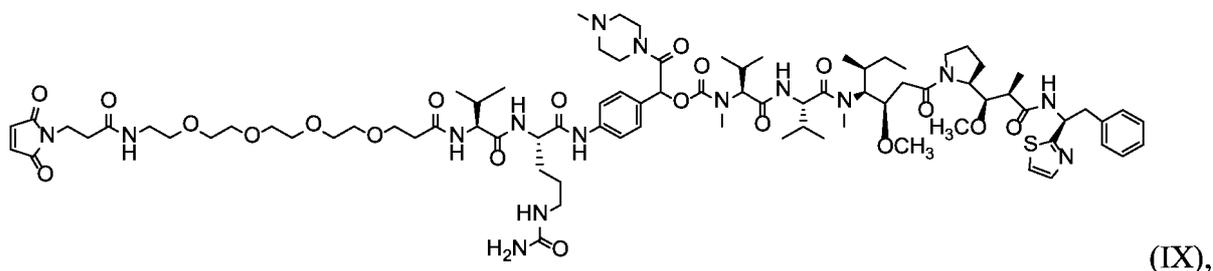
En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto de Fórmula (IIIa):



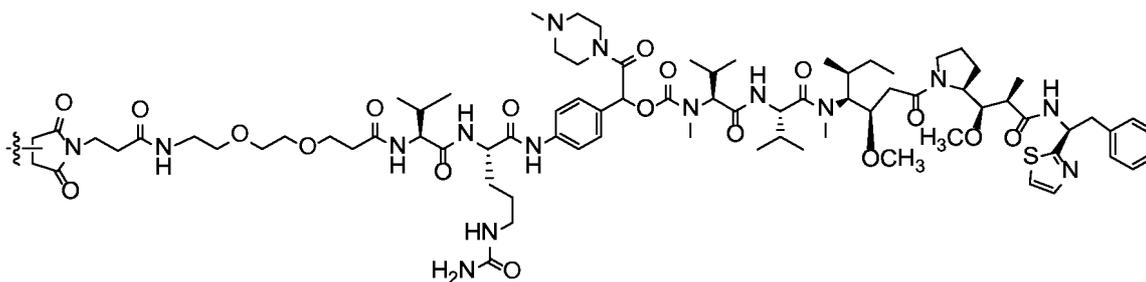
- 5 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto dirigido y p es 1 a 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 8. En algunas realizaciones, p es de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es de 1 a 4. En algunas realizaciones, p es 2 a 4. En algunas realizaciones, p es 1, 2, 3 o 4. En algunas realizaciones, p es 2. En algunas realizaciones, p es 3. En algunas realizaciones, p es 4. En ciertos casos, en la Fórmula (IIIa), T es un anticuerpo, opcionalmente, cuando uno o más restos de aminoácidos de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo se reemplazan con residuos de cisteína. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es h5F1Ca.1 o c5D7, o h5F1Ca.1 donde uno o más restos de aminoácidos de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo se reemplazan con residuos de cisteína, o c5D7 donde uno o más restos de aminoácidos de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo se reemplazan con residuos de cisteína.
- 10
- 15 La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (VI):



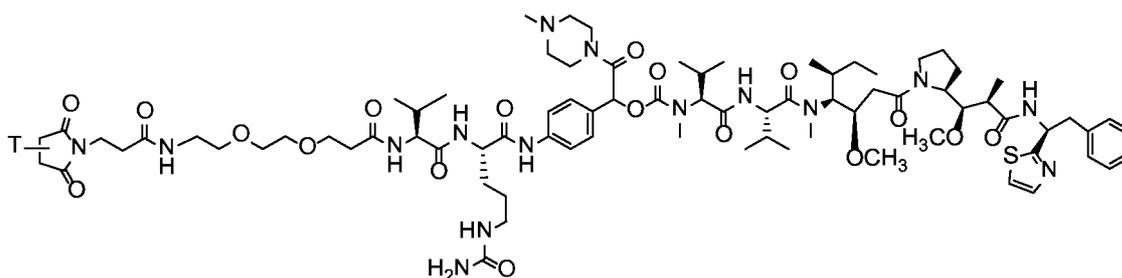
- o una sal o solvato del mismo.
- 20 La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (IX):



- 25 o una sal o solvato del mismo.
- En determinados casos, la porción "-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D" en el compuesto de Fórmula (II) o (IIa) es:



En tales casos, la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (IV):

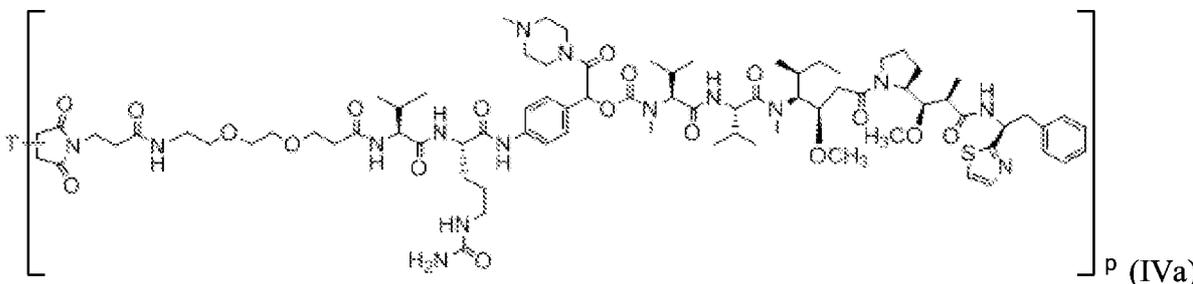


(IV),

5

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento. En determinados casos, en la Fórmula (IV), T es un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es h5F1Ca.1 o c5D7.

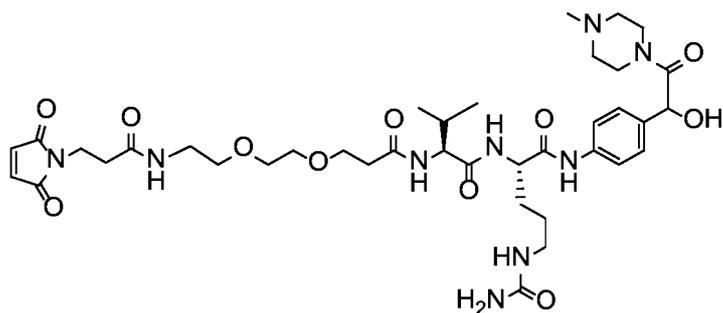
10 En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto de Fórmula (IVa):



15 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento y p es de 1 a 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 8. En algunas realizaciones, p es de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es de 1 a 4. En algunas realizaciones, p es de 2 a 4. En algunas realizaciones, p es 1, 2, 3 o 4. En algunas realizaciones, p es 2. En algunas realizaciones, p es 3. En algunas realizaciones, p es 4. En determinados casos, en la Fórmula (IVa), T es un anticuerpo, opcionalmente donde uno o más residuos de aminoácido de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo están reemplazadas por residuos de cisteína. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es h5F1Ca.1 o c5D7 o h5F1Ca.1 donde uno o más residuos de aminoácido de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo están reemplazados por residuos de cisteína o c5D7 donde uno o más residuos de aminoácido de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo están reemplazados por residuos de cisteína.

25 La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (VII):

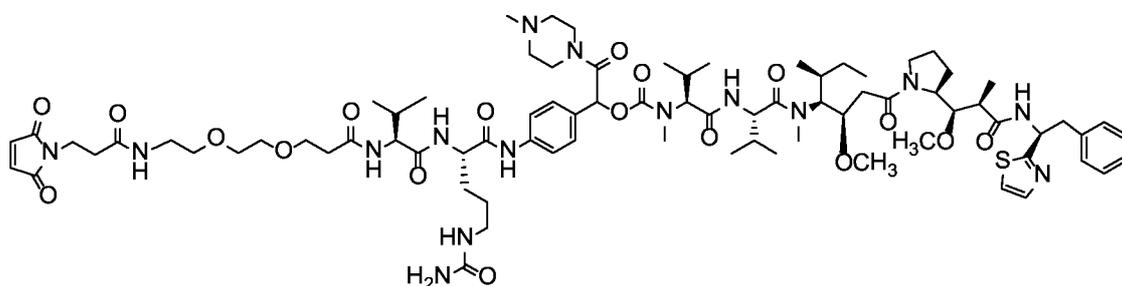
25



(VII),

o una sal o solvato del mismo.

5 La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (X):

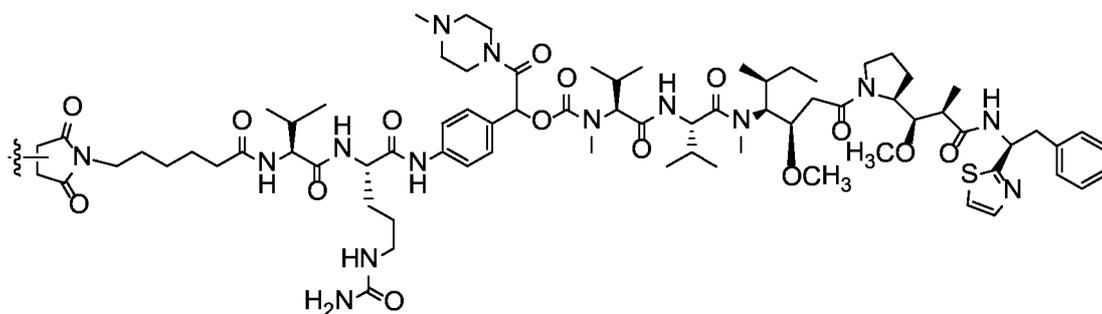


(X),

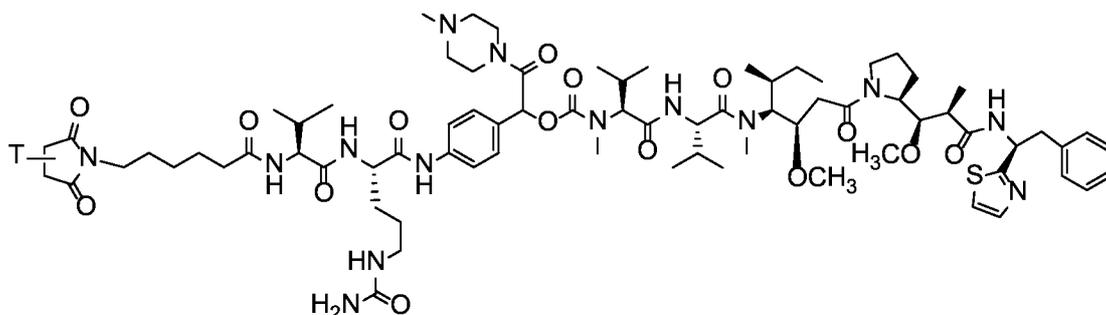
o una sal o solvato del mismo.

10

En determinados casos, la porción "-A-L⁴-L³-L²-X-L¹-D" en el compuesto de Fórmula (II) o (IIa) es:



15 En tales casos, la presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (V):

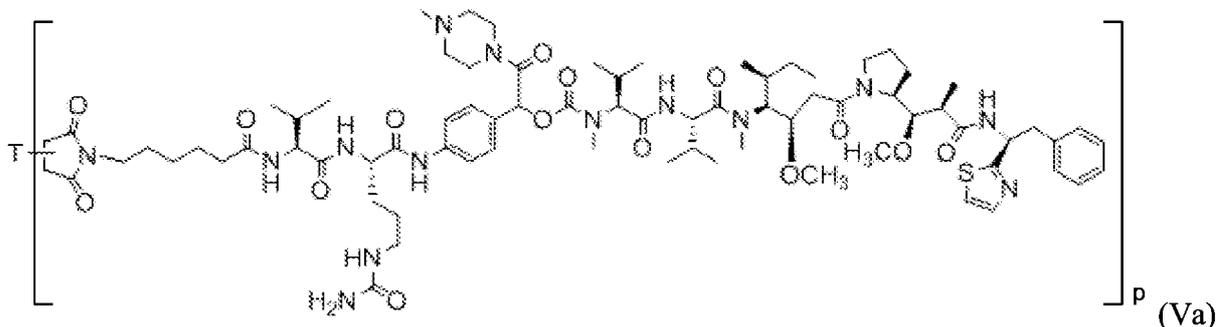


(V)

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento. En determinados casos, en la Fórmula (V), T es un anticuerpo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es h5F1Ca.1 o c5D7.

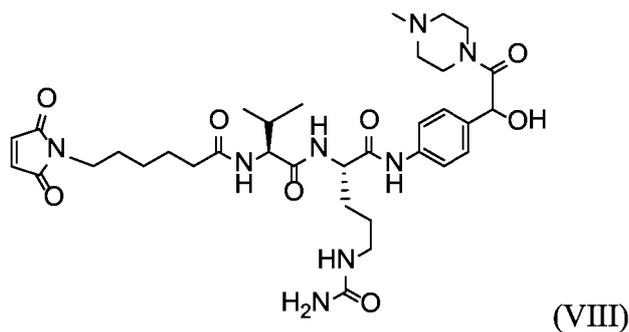
20

En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto de Fórmula (Va):



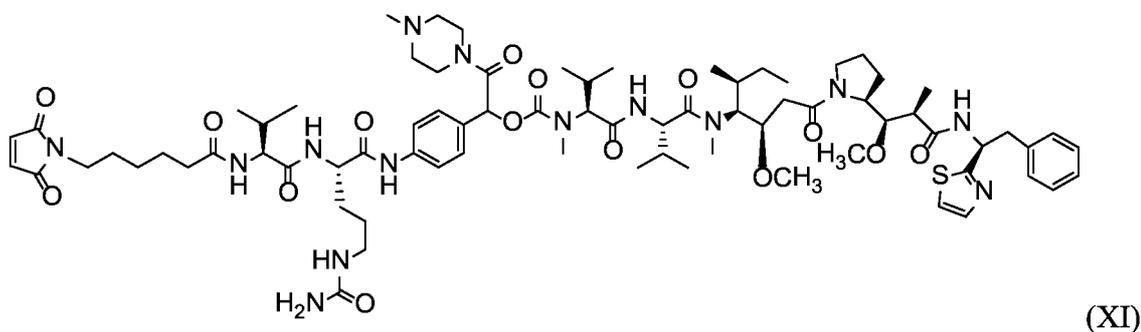
- o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que T es un resto de direccionamiento y p es de 1 a 20. En algunas realizaciones, p es de 1 a 8. En algunas realizaciones, p es de 1 a 6. En algunas realizaciones, p es de 1 a 4. En algunas realizaciones, p es de 2 a 4. En algunas realizaciones, p es 1, 2, 3 o 4. En algunas realizaciones, p es 2. En algunas realizaciones, p es 3. En algunas realizaciones, p es 4. En determinados casos, en la Fórmula (Va), T es un anticuerpo, opcionalmente donde uno o más residuos de aminoácido de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo están reemplazadas por residuos de cisteína. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es h5F1Ca.1 o c5D7 o h5F1Ca.1 donde uno o más residuos de aminoácido de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo están reemplazados por residuos de cisteína o c5D7 donde uno o más residuos de aminoácido de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo están reemplazados por residuos de cisteína.

La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (VIII):



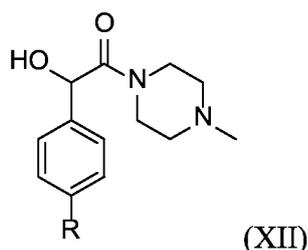
o una sal o solvato del mismo.

La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (XI):



o una sal o solvato del mismo

La presente divulgación proporciona un compuesto de Fórmula (XII)



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que R es NO₂ o NH₂.

- 5 Los compuestos de las Fórmulas (II)-(V) o (IIa)-(Va) pueden prepararse y/o formularse como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales no tóxicas de una forma de base libre de un compuesto que posee la actividad farmacológica deseada de la base libre. Estas sales pueden derivarse de ácidos inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos no limitantes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, monohidrógeno-fosfatos, dihidrogenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formiatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butina-1,4-dioatos, hexina-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, metilsulfonatos, propilsulfonatos, besilatos, xilenosulfonatos, naftaleno-1-sulfonatos, naftaleno-2-sulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, γ -hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos y mandelatos. Se encuentran listas de otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985.

20 Para un compuesto de una cualquiera de las Fórmulas (II)-(V) o (IIa)-(Va) que contiene nitrógeno básico, una sal farmacéuticamente aceptable puede prepararse por cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido nítrico, ácido bórico, ácido fosfórico y similares o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido fenilacético, ácido propiónico, ácido esteárico, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido isetiónico, ácido succínico, ácido valérico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido láurico, un ácido piranosidílico, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa-hidroxi ácido, tal como ácido mandélico, ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tales como ácido benzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido naftoico o ácido cinnámico, un ácido sulfónico, tal como ácido laurilsulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico o ácido etanosulfónico, o cualquier mezcla de ácidos compatible, tales como aquellas dadas como ejemplos en el presente documento, y cualquier otro ácido y mezcla de los mismos que se consideren equivalentes o sustitutos aceptables a la luz del nivel normal de habilidad en esta tecnología.

35 También se proporcionan composiciones que comprenden uno o más compuestos de las fórmulas (II) - (V) o (IIa) - (Va), o una sal o solvato o estereoisómeros de los mismos. En los compuestos de las fórmulas (II) - (V) o (IIa) - (Va), o una sal o solvato o estereoisómeros de los mismos, el resto dirigido puede tener uno o más sitios de unión para enlazar con el resto de fármaco. Dependiendo de la accesibilidad de los sitios de unión en el resto dirigido y de la concentración relativa del resto de fármaco en la formación del conjugado, una parte de los sitios de unión puede no estar unida a un resto de fármaco en el conjugado formado. Puede formarse una mezcla de compuestos que tienen diversos grupos de fármacos en cada uno de los restos dirigidos. Por tanto se proporciona también una composición, que comprende uno o más compuestos de las fórmulas (IIa) - (Va), o una sal o solvato o estereoisómeros de los mismos. Por ejemplo, para una molécula de direccionamiento que tiene 4 sitios de unión, la composición puede comprender uno o más compuestos seleccionados de un compuesto de fórmula IIa en la que p es 1, un compuesto de fórmula IIa en la que p es 2, un compuesto de fórmula IIa en la que p es 3, y un compuesto de fórmula IIa en la que p es 4. Las cantidades relativas de compuestos en la composición pueden ajustarse para lograr una relación deseable entre el resto de fármaco y el resto dirigido. En algunas de las realizaciones, la composición comprende predominantemente uno o dos de los compuestos.

La "relación fármaco-anticuerpo" (DAR) en un compuesto o composición de la invención se define como la relación molar entre los restos de fármaco en el compuesto o composición y los anticuerpos en el compuesto o composición. Cuando un anticuerpo tiene más de un sitio de unión, más de un resto de fármaco puede estar unido a cada anticuerpo. En algunos casos, se obtiene una mezcla que comprende más de una molécula de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC). Las relaciones fármaco-anticuerpo de los conjugados anticuerpo-fármaco pueden medirse por procedimientos analíticos conocidos en la técnica, por ejemplo, los procedimientos descritos en Jeffrey, y col., *Bioconjug. Chem.* 24(7): 1256-1263 (2013); y Sun y col., *Bioconjug. Chem.* 16(5):1282-1290 (2005). En algunas realizaciones, la composición que comprende uno o más ADC de los detallados en el presente documento tiene un DAR promedio de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 6, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5, o aproximadamente 2 a

aproximadamente 4. En algunas realizaciones preferentes, la composición tiene un DAR promedio de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5 o aproximadamente 2 a aproximadamente 3, o aproximadamente 2, o aproximadamente 3. En algunas otras realizaciones preferidas, la composición tiene un DAR promedio de aproximadamente de $2,5 \pm 10\%$. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido contiene sitios de unión diseñados con cisteína y la composición tiene un DAR promedio de aproximadamente 2,0.

Composiciones farmacéuticas

Para fines de tratamiento, una composición farmacéutica de las realizaciones comprende al menos un compuesto de Fórmulas (II) - (V) o (IIa) - (Va), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables o un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un excipiente farmacéuticamente aceptable es una sustancia que no es tóxica y, por lo demás, biológicamente adecuada para la administración a un sujeto. Dichos excipientes facilitan la administración de los compuestos descritos en el presente documento y son compatibles con el principio activo. Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen estabilizantes, lubricantes, tensioactivos, diluyentes, antioxidantes, aglutinantes, agentes colorantes, agentes de carga, emulsionantes o agentes modificadores del sabor. En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas según las realizaciones son composiciones estériles. Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar utilizando técnicas de composición conocidas o que están disponibles para los expertos en la materia.

Las composiciones estériles también están contempladas por las realizaciones, incluyendo composiciones que estén de acuerdo con las regulaciones nacionales y locales que rigen dichas composiciones.

Las composiciones farmacéuticas y los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse como soluciones, emulsiones, suspensiones, dispersiones, o complejos de inclusión tales como ciclodextrinas en disolventes o vehículos farmacéuticos adecuados, o como píldoras, comprimidos, pastillas, supositorios, sobrecitos, grageas, gránulos, polvos, polvos para reconstitución, o cápsulas junto con vehículos sólidos de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica para la preparación de diversas formas de dosificación. Las composiciones farmacéuticas de las realizaciones pueden administrarse mediante una vía de administración adecuada, tal como oral, parenteral, rectal, nasal, tópica u ocular, o por inhalación. Preferentemente, las composiciones se formulan para administración intravenosa u oral.

Para administración oral, los compuestos de las realizaciones pueden proporcionarse en forma sólida, tal como un comprimido o cápsula, o como una solución, emulsión o suspensión. Para preparar las composiciones orales, los compuestos de las realizaciones pueden formularse para dar una dosis de, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg al día, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20 mg/kg al día, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg al día. Los comprimidos orales pueden incluir el principio o principios activos mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables compatibles tales como diluyentes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes. Las cargas inertes adecuadas incluyen carbonato de sodio y de calcio, Fosfato de sodio y de calcio, lactosa, almidón, azúcar, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los excipientes orales líquidos a modo de ejemplo incluyen etanol, glicerol, agua y similares. Almidón, polivinilpirrolidona (PVP), glicolato sódico de almidón, celulosa microcristalina y ácido alginico son agentes disgregantes a modo de ejemplo. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina. El agente lubricante, si está presente, puede ser estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden revestirse con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal, o pueden revestirse con un revestimiento entérico.

Las cápsulas para administración oral incluyen cápsulas de gelatina dura y blanda. Para preparar cápsulas de gelatina dura, el o los principios activos pueden mezclarse con un sólido, diluyente semisólido o líquido. Las cápsulas de gelatina blanda se pueden preparar mezclando el principio activo con agua, un aceite tal como aceite de cacahuete o aceite de oliva, parafina líquida, una mezcla de mono y diglicéridos de ácidos grasos de cadena corta, polietilenglicol 400 o propilenglicol.

Los líquidos para administración oral pueden estar en forma de suspensiones, soluciones, emulsiones o jarabes o pueden liofilizarse o presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas composiciones líquidas pueden contener opcionalmente: excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, metilcelulosa, alginato de sodio, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y similares); vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite (por ejemplo, aceite de almendra o aceite de coco fraccionado), propilenglicol, alcohol etílico o agua; conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico); agentes humectantes tales como lecitina; y, si se desea, agentes aromatizantes o colorantes.

Las composiciones de las realizaciones pueden formularse para administración rectal como un supositorio. Para uso parenteral, incluyendo las vías intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal o subcutánea, los agentes de las realizaciones pueden proporcionarse en soluciones o suspensiones acuosas estériles, tamponadas a un pH e

isotonicidad apropiados o en un aceite aceptable por vía parenteral. Los vehículos acuosos adecuados incluyen la solución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. Dichas formas se pueden presentar en forma de dosis unitaria, tal como ampollas o dispositivos de inyección desechables, en formas de dosis múltiples, tales como viales de los que se puede retirar la dosis apropiada, o en una forma sólida o preconcentrado que se puede usar para preparar una formulación inyectable. Las dosis de infusión ilustrativas varían de aproximadamente 1 a 1000 µg/kg/minuto de agente mezclado con un vehículo farmacéutico durante un período que varía de varios minutos a varios días.

Para administración nasal, inhalada u oral, las composiciones farmacéuticas de las realizaciones pueden administrarse usando, por ejemplo, una formulación en aerosol que también contiene un vehículo adecuado.

Para las aplicaciones tópicas, los compuestos de las realizaciones se formulan preferentemente como cremas o pomadas o un vehículo similar adecuado para la administración tópica. Para la administración tópica, los compuestos de la invención pueden mezclarse con un vehículo farmacéutico a una concentración de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de fármaco a vehículo. Otro modo de administrar los agentes de las realizaciones puede utilizar una formulación de parche para efectuar administración transdérmica.

La presente divulgación proporciona las fórmulas (II) - (V) o (IIa) - (Va) para usar en un procedimiento para matar una célula, que comprende administrar a la célula una cantidad del compuesto suficiente para destruir la célula. En determinadas realizaciones, la célula es una célula cancerosa. En determinadas realizaciones, la célula cancerosa es una célula de cáncer gástrico, célula de cáncer pancreático, célula de cáncer colorrectal, célula cancerosa pulmonar o célula de cáncer de ovario.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona las fórmulas (II) - (V) o (IIa) - (Va) para usar en un procedimiento para tratar el cáncer en un individuo que lo necesite, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del compuesto. En determinadas realizaciones, la célula cancerosa es una célula de cáncer gástrico, célula de cáncer pancreático, célula de cáncer colorrectal, célula cancerosa pulmonar o célula de cáncer de ovario.

Kits

La presente divulgación proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes que comprenden un compuesto de Fórmulas (II) - (V) o (IIa) - (Va) útiles para el tratamiento o la prevención del cáncer. El kit puede comprender además instrucciones para su uso en el tratamiento del cáncer.

La presente divulgación también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes que comprenden uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de las presentes realizaciones. Opcionalmente asociado con dicho recipiente o recipientes puede ser un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

Síntesis de conjugados de fármacos

Las realizaciones también se dirigen a procesos e intermedios útiles para preparar compuestos objeto o una sal o solvato o estereoisómero de los mismos.

Están disponibles muchas referencias generales que proporcionan esquemas de síntesis química comúnmente conocidos y condiciones útiles para sintetizar los compuestos desvelados (véase, por ejemplo, Smith y March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, Quinta edición, Wiley-Interscience, 2001.)

Los compuestos como se describen en el presente documento se pueden purificar por cualquiera de los medios conocidos en la técnica, incluyendo medios cromatográficos, tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía preparativa de capa fina, cromatografía en columna ultrarrápida y cromatografía de intercambio iónico. Puede utilizarse cualquier fase estacionaria adecuada, incluyendo fases normales e inversas, así como resinas iónicas. Más normalmente, los compuestos desvelados se purifican a través de cromatografía sobre gel de sílice y/o alúmina. Véase, por ejemplo, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2ª ed., ed. L. R. Snyder y J. J. Kirkland, John Wiley and Sons, 1979; y *Thin Layer Chromatography*, E. Stahl (ed.), Springer-Verlag, Nueva York, 1969.

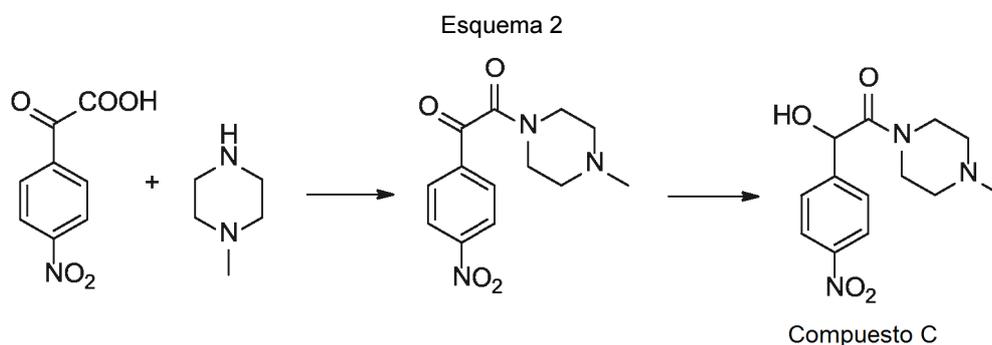
Durante cualquiera de los procesos para la preparación de los compuestos en cuestión, puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas involucradas. Esto se puede lograr por medio de grupos protectores convencionales como se describe en trabajo estándar, tal como T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *"Protective Groups in Organic Synthesis"*, 4ª ed., Wiley, Nueva York 2006. Los grupos protectores pueden ser eliminados en una fase posterior conveniente usando métodos conocidos en la técnica.

Las entidades químicas a modo de ejemplo útiles en los métodos de las realizaciones se describirán ahora por referencia a esquemas sintéticos ilustrativos para su preparación general en el presente documento y los ejemplos específicos que siguen. Los expertos reconocerán que, para obtener los diversos compuestos del presente documento, los materiales de partida se pueden seleccionar adecuadamente de manera que los sustituyentes

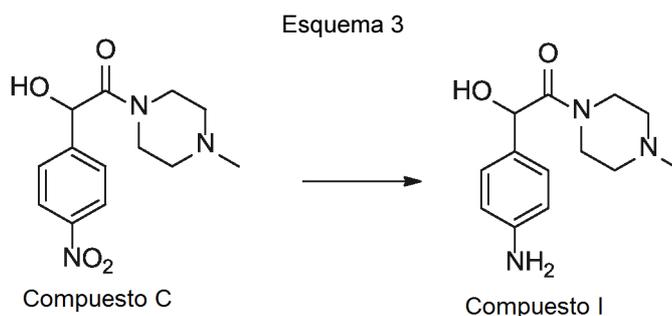
finalmente deseados se llevarán a través del esquema de reacción con o sin protección, según sea apropiado, para producir el producto deseado. Como alternativa, puede ser necesario o deseable emplear, en lugar del sustituyente finalmente deseado, un grupo adecuado que pueda usarse a través del esquema de reacción y reemplazarse según sea apropiado con el sustituyente deseado. Además, un experto en la técnica reconocerá que las transformaciones mostradas en los esquemas siguientes se pueden realizar en cualquier orden que sea compatible con la funcionalidad de los grupos pendientes particulares. Cada una de las reacciones representadas en los esquemas generales se realiza preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 0 °C a la temperatura de reflujo del disolvente orgánico utilizado. A menos que se especifique de otro modo, las variables son como se han definido anteriormente en referencia a la Fórmula (II).

Los conjugados de las presentes realizaciones pueden construirse uniendo el resto de fármaco al anticuerpo a través de un enlazador que comprende un espaciador auto inmolativo hidrófilo.

Las síntesis representativas para la porción de enlazador de los compuestos de Fórmula (II) se describen en esquemas posteriores, y los ejemplos particulares siguientes.

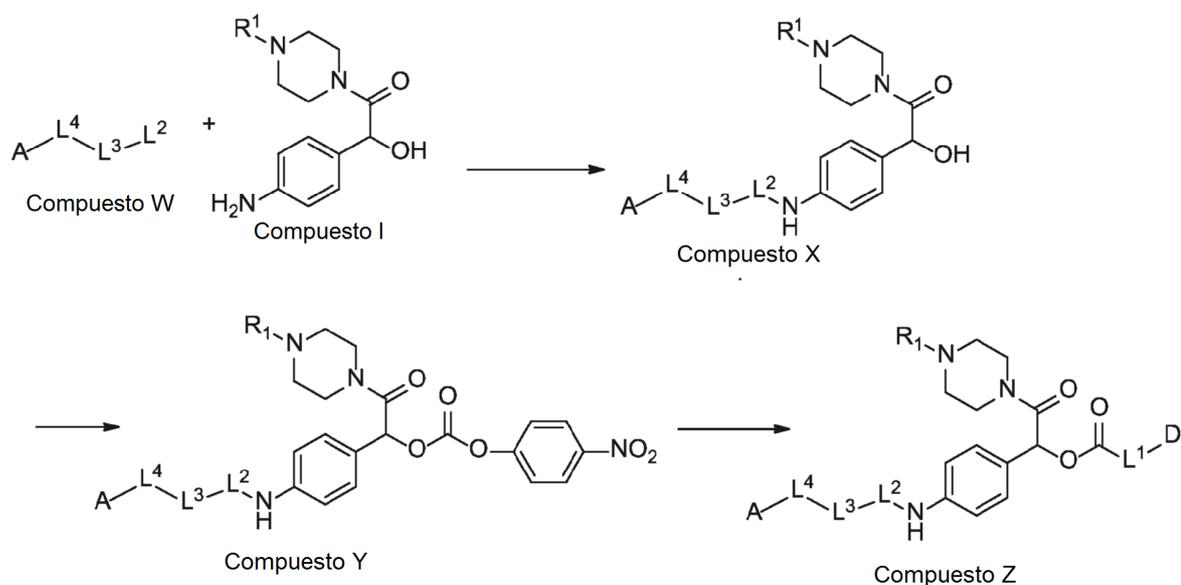


La síntesis del Compuesto C a partir de 4-nitrobenzaldehído se muestra más adelante en el Esquema 2. Se convierte ácido 4-nitrofenilglicólico en el cloruro de ácido correspondiente usando un reactivo de cloración, tal como SOCl_2 , PCl_3 , o PCl_5 . Después, el cloruro de ácido se hace reaccionar con 1-metilpiperazina para dar el intermedio de cetoamida. Como alternativa, el ácido 4-nitrofenilglicólico puede acoplarse a la 1-metilpiperazina con el uso de un agente de acoplamiento, tal como EDCI. El intermedio de cetoamida contiene un grupo ceto, que después se reduce con un reactivo de reducción, tal como DIBAL-H, BH_3 , $\text{LiAlH}_4\text{-AlCl}_3$, $\text{LiAlH}_4\text{-BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ o borohidruro sódico, para producir el Compuesto C.



Con respecto al Esquema 3, el grupo nitro del Compuesto C se reduce para producir un grupo anilina en el Compuesto I mediante hidrogenación catalítica con catalizadores, tales como paladio, níquel o platino. Los ejemplos de catalizadores de hidrogenación adecuados incluyen Pd/C y níquel Raney.

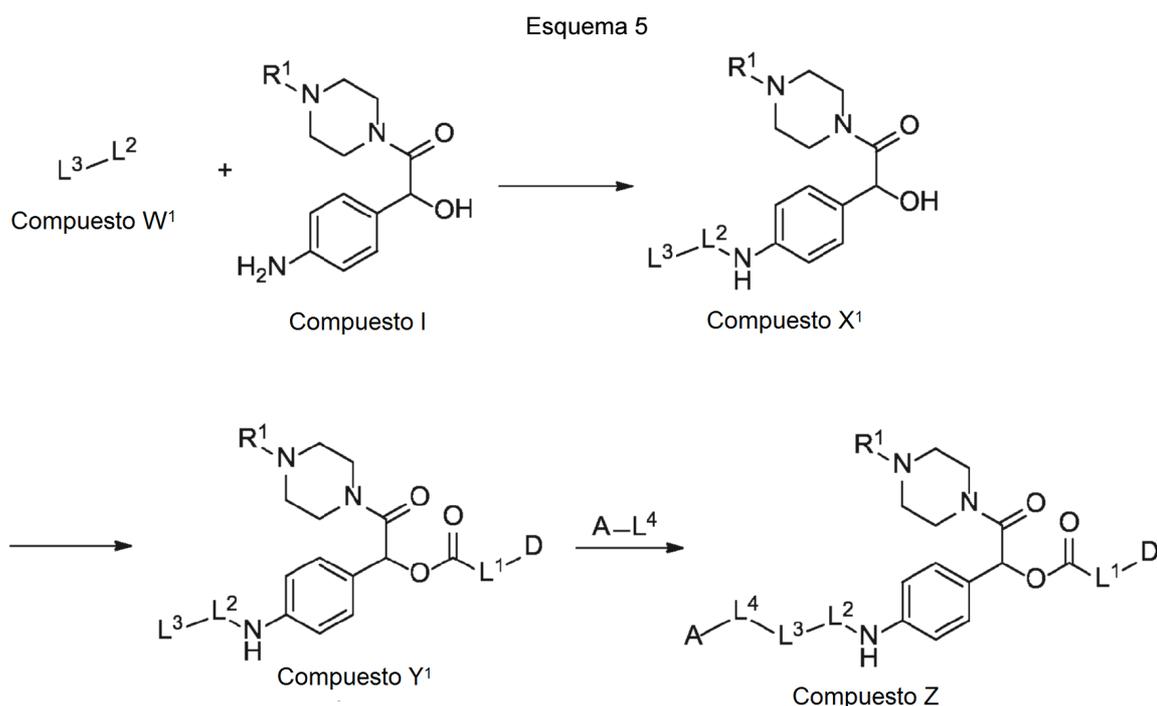
Esquema 4



Con respecto al Esquema 4, el Compuesto I proporciona la porción de enlazador auto inmolativo hidrófilo en los compuestos de las presentes realizaciones. El grupo amino del Compuesto I puede reaccionar con el Compuesto W a través de condiciones de acoplamiento de péptidos convencionales para producir el Compuesto X. Pueden utilizarse reactivos, tales como EDCI/HOBt, HOBt, PyBOP, HATU o BEM (Carpino, L. A. J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 4397. Carpino, L. A.; El-Faham, A. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 5401. Li, P.; Xu, J. C. J. Pept. Res. 2001, 58, 129.) en presencia de una base tal como DIEA u otras bases familiares para un experto en la materia y en un disolvente apropiado.

Con referencia continuada al Esquema 4, el grupo hidroxilo del Compuesto X se convierte en un carbonato activado usando cloroformiato de 4-nitrofenilo. Con el Compuesto Y, la reacción con un fármaco con un grupo amino puede producir el Compuesto Z. Si el fármaco no contiene ningún grupo amino, un segundo, espaciador auto inmolativo intermedio o un enlazador de autoeliminación de ciclación puede situarse entre el resto de fármaco y el grupo aminobenciloxicarbonilo, como se ha analizado anteriormente.

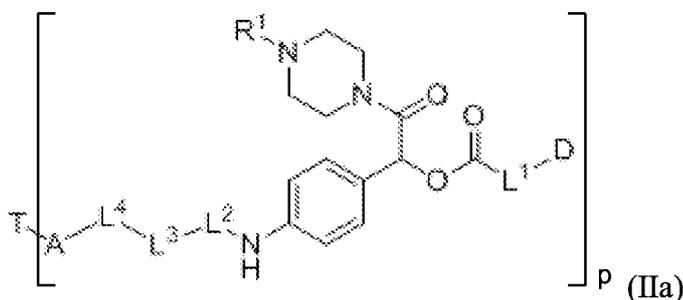
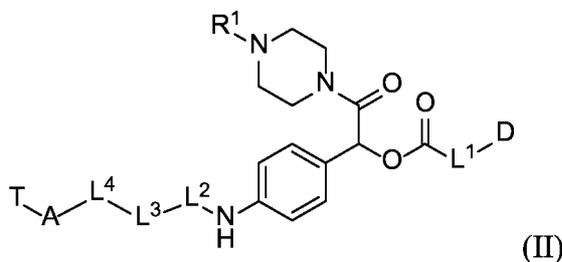
En determinadas realizaciones, en referencia al Esquema 5 posterior, la porción $-L^3-L^2-$ del enlazador está unida al Compuesto I. Después se une la porción $-A-L^4-$.



Un proceso para preparar el compuesto de las presentes realizaciones incluye preparar una solución del anticuerpo en un tampón y tratar con una solución del agente de reducción, tal como TCEP. Se determina la cantidad de tioles libres. Cuando la cantidad de tioles libres alcanza una cantidad predeterminada, el anticuerpo parcialmente reducido se alquila con la porción de fármaco del enlazador.

5

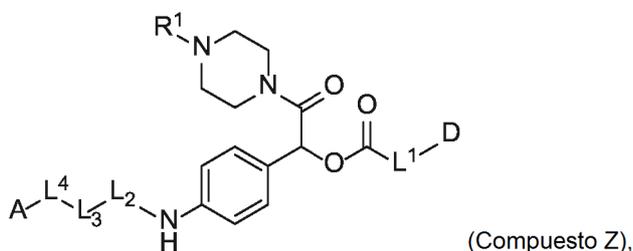
En algunas realizaciones, se proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula (II) o (IIa):



10

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo; en la que D, T, L¹, L², L³, L⁴, A y p, cuando sea aplicable, son como se definen para la Fórmula (II) o (IIa), que comprende hacer reaccionar un anticuerpo que porta uno o más tioles libres (o grupos sulfhidrido) con el Compuesto Z:

15



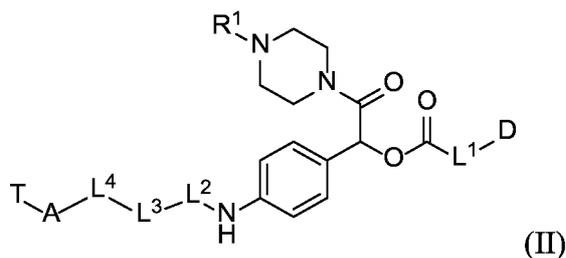
20

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo que porta uno o más tioles libres (o grupos sulfhidrido) es h5F1Ca.1 o c5D7. En algunas realizaciones, el anticuerpo que porta uno o más tioles libres (o grupos sulfhidrido) es h5F1Ca.1 donde uno o más residuos de aminoácido de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo están reemplazados por residuos de cisteína, o c5D7 donde uno o más residuos de aminoácido de la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo están reemplazadas por residuos de cisteína. En algunas realizaciones, el proceso comprende además un método para preparar el Compuesto Z como se detalla en el presente documento. En algunas realizaciones, el proceso comprende además un método para preparar uno o más de los intermedios sintéticos que conducen al Compuesto Z (por ejemplo, Compuesto Y y Compuesto X) como se detalla en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporciona un compuesto producido por cualquier de los procesos detallados en el presente documento. Se proporciona además una composición que comprende uno o más compuestos producidos por cualquiera de los procesos detallados en el presente documento.

25

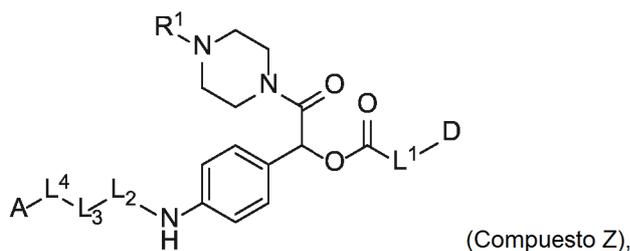
30

En algunas realizaciones, se proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula (II):



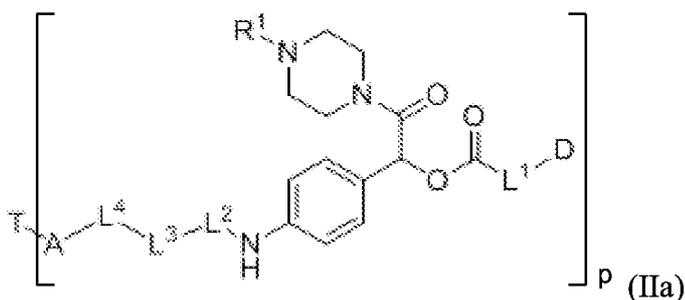
o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
en donde:

- 5 D es un resto de profármaco;
T es un anticuerpo;
R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;
L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
10 L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
L³ es un enlazador de péptidos;
15 L⁴ es un enlace o un espaciador; y
A es una unidad de acilo;
que comprende hacer reaccionar un anticuerpo con el Compuesto Z:



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo.

En algunas realizaciones, se proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula (II):

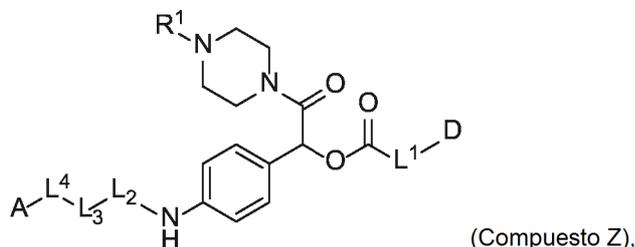


o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
en donde:

- 25 p es de 1 a 20;
D es un resto de profármaco;
T es un anticuerpo;
R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;
L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
30 en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;

L³ es un enlazador de péptidos;
 L⁴ es un enlace o un espaciador; y
 A es una unidad de acilo;
 que comprende hacer reaccionar un anticuerpo con el Compuesto Z:

5



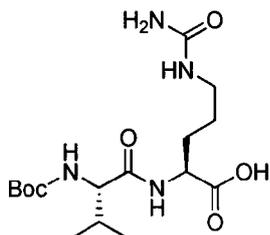
o una sal o solvato o estereoisómero del mismo.

10 Se proporciona además un compuesto producido por cualquier de los proceso de preparación de compuestos y/o métodos de preparación de compuestos como se detalla en el presente documento. También se proporciona una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende uno o más de los compuestos producidos por cualquiera de los procesos de preparación de compuestos y/o métodos de preparación de compuestos como se detalla en el presente documento.

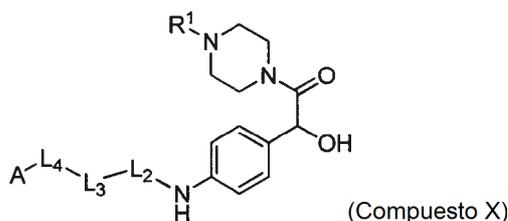
15

La presente divulgación proporciona los procesos para la preparación de los compuestos e intermedios en los Esquemas 4 y 5. Se pretende que los compuestos representados en los Esquemas 4 y 5 tengan valencias completas o adecuadamente protegidas con grupos protectores opcionales o grupos salientes cuando sea adecuado. Por ejemplo, como se muestra en el esquema "Síntesis del Compuesto TAP-18H", L³-L² puede ser

20



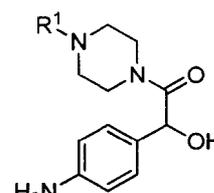
La presente divulgación proporciona un método para preparar el Compuesto X:



25

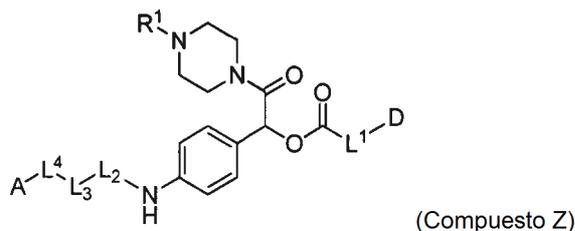
o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
 en donde:

30 L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
 en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
 35 L³ es un enlazador de péptidos;
 L⁴ es un enlace o un espaciador; y A es una unidad de acilo; y
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;



que comprende: hacer reaccionar el Compuesto W: A-L⁴-L³-L², y el Compuesto I

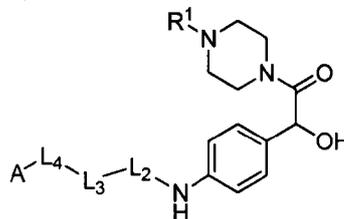
La presente divulgación proporciona un método para preparar el Compuesto Z:



5

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
en donde:

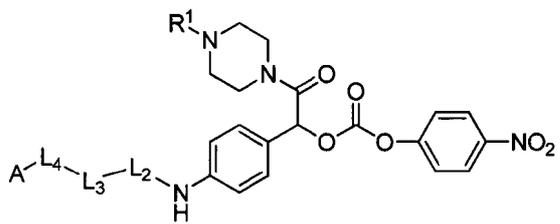
- 10 D es un resto de profármaco;
L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces
L² es un enlace;
15 en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
L³ es un enlazador de péptidos;
L⁴ es un enlace o un espaciador; y A es una unidad de acilo; y
R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;



20

que comprende: hacer reaccionar el Compuesto X:
para formar el Compuesto Y:

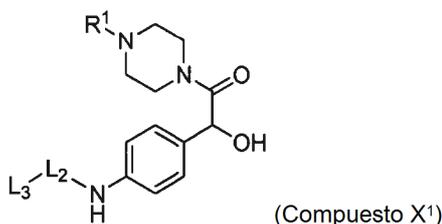
y cloroformiato de p-nitrofenilo



25

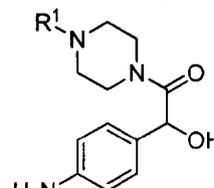
hacer reaccionar el Compuesto Y con un compuesto que comprende L¹-D.

La presente divulgación proporciona un método para preparar el Compuesto X¹:



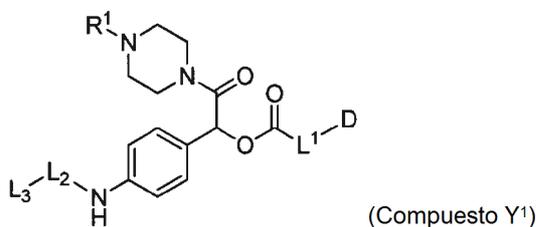
o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
 en donde:

- 5 L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
 en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
 L³ es un enlazador de péptidos; y
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;



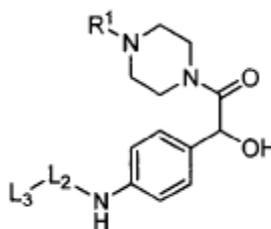
- 10 que comprende: hacer reaccionar el Compuesto W¹: L³-L², y el Compuesto I

La presente divulgación proporciona un método para preparar el Compuesto Y¹:



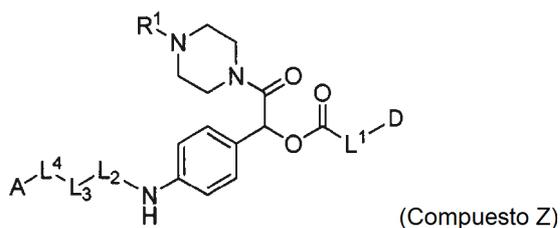
- 15 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
 en donde:

- 20 D es un resto de profármaco;
 L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
 L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
 en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
 25 L³ es un enlazador de péptidos; y
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;



que comprende: hacer reaccionar el Compuesto X¹: L¹-D, y un compuesto que comprende

- 30 La presente divulgación proporciona un método para preparar el Compuesto Z:



- 35 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
 en donde:

D es un resto de profármaco;

L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces

5 L² es un enlace;

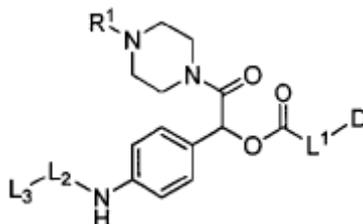
en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;

L³ es un enlazador de péptidos;

L⁴ es un enlace o un espaciador;

A es una unidad de acilo; y

10 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;

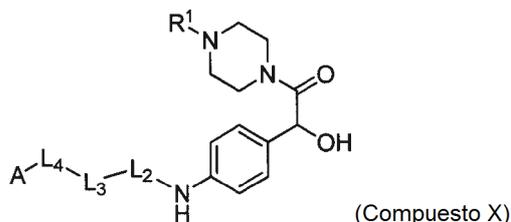


que comprende: hacer reaccionar el Compuesto Y¹:
comprende A-L⁴.

, y un compuesto que

La presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula:

15



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
en donde:

20

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces

L² es un enlace;

en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;

25

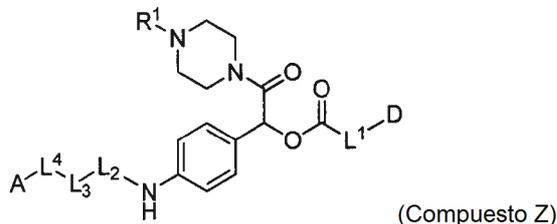
L³ es un enlazador de péptidos;

L⁴ es un enlace o un espaciador; y A es una unidad de acilo; y

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido.

La presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula:

30



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
en donde:

35

D es un resto de profármaco;

L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces

40

L² es un enlace;

en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;

L³ es un enlazador de péptidos;

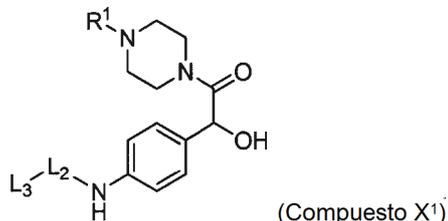
L⁴ es un enlace o un espaciador; y

A es una unidad de acilo; y

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido.

La presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula:

5



o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
en donde:

10

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;

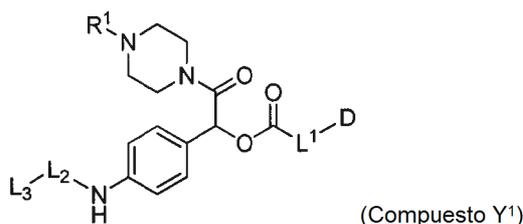
en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;

15

L³ es un enlazador de péptidos; y

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido.

La presente divulgación proporciona un compuesto de fórmula:



20

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
en donde:

25

D es un resto de profármaco;

L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo, o un enlazador de autoeliminación de ciclación;

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

en el que si L¹ es un segundo enlazado auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;

30

en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;

L³ es un enlazador de péptidos; y

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitan la invención.

35

Ejemplo 1

Materiales y métodos

40 Humanización del anticuerpo 5F1

El injerto en la región determinante de la complementariedad (CDR) se utilizó para generar la región variable de 5F1Ca.1 humanizado (h5F1Ca.1). Brevemente, las CDR de las regiones variables 5F1 murinas se incorporaron en el marco de las regiones variables humanas (los anticuerpos aceptores) mediante tecnología de ADN recombinante. La selección de aceptadores de marcos humanos se realizó mediante búsquedas de BLASTP en toda la base de datos de Genbank no redundante. La VH del anticuerpo humano CAA79298 (Genbank no. CAA79298), que era 67.8% idéntico a la región variable de la cadena pesada 5F1 murina, y la VL del anticuerpo humano ABI74084 (Genbank n.º ABI74084), que tenía una identidad del 80,4 % con la región variable de la cadena ligera de 5F1 murina, se utilizaron como los anticuerpos aceptores. Algunos residuos de los anticuerpos aceptores se mutaron a los residuos homólogos murinos para evitar cambios de conformación de las regiones variables. La secuencia final de aminoácidos de la

50

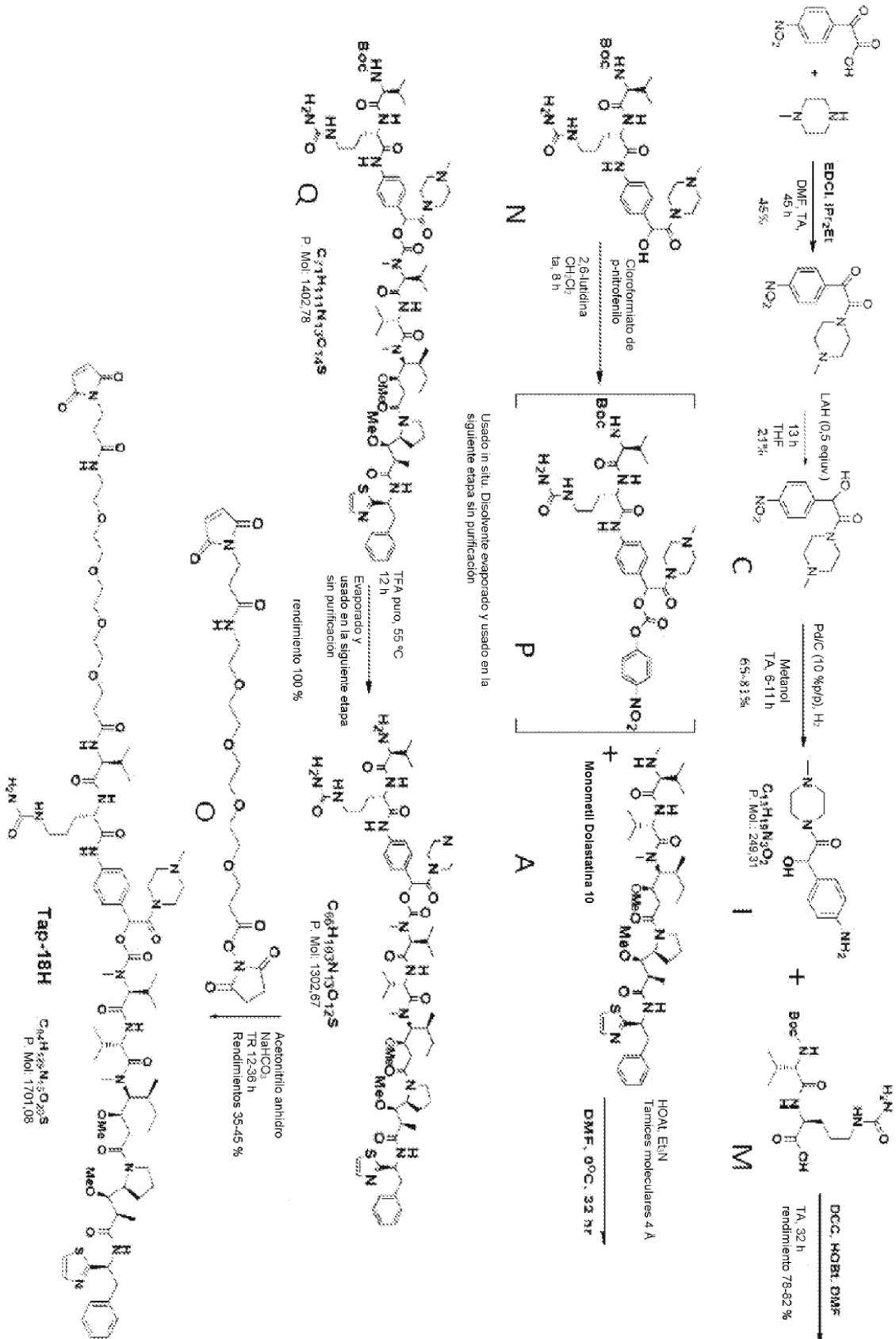
cadena pesada y ligera de h5F1Ca.1 se muestra en la Tabla 1.

- 5 Los fragmentos VH y VL se insertaron luego en el vector pcDNA5-FRT-hIgG1K a través del sitio NheI y el sitio AvrII para la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente. El plásmido completamente ensamblado h5F1Ca.1/pcDNA5-FRT-hIgG1, que contenía tanto los genes de cadena pesada como de cadena ligera de h5F1Ca.1, se utilizó para expresar el anticuerpo h5F1Ca.1.

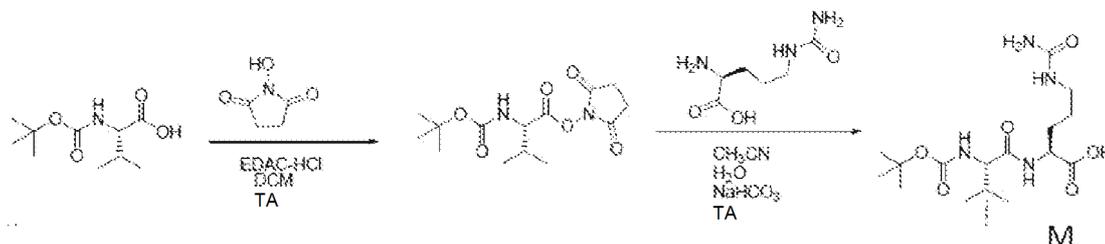
Síntesis de fármaco enlazador

- 10 La síntesis del Compuesto Tap-18H se muestra más adelante en el esquema. Las síntesis de los Compuestos M y O intermedios también se muestran más adelante en los esquemas.

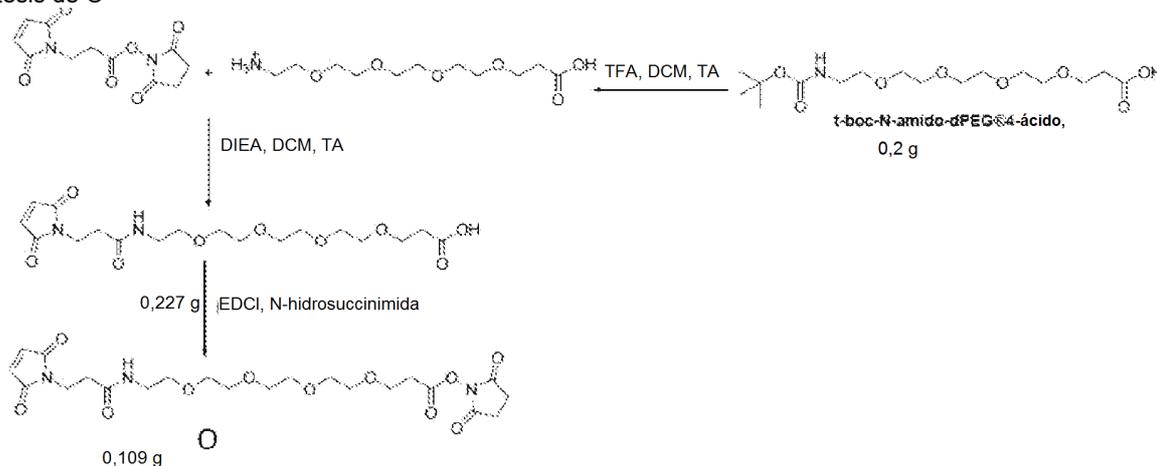
Síntesis del Compuesto TAP-18H



Síntesis de M



Síntesis de O



5

En referencia al esquema de síntesis del Compuesto Tap-18H, se condensó ácido 4-nitrofenilglicólico disponible en el mercado con N-metilpiperazina usando PCl_5 , o EDCI e IPr_2Et en DMF, o 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina en CH_2Cl_2 y N-metilmorfolina como agente de acoplamiento para producir la cetoamida deseada. En un procedimiento típico, se añadió una solución de 2-cloro-4,6-dimetoxi-1,3,5-triazina (5 mmol) en CH_2O_2 (20 ml), N-metilmorfolina (15 mmol) a 0-5 °C en agitación continua. Se formó una suspensión de color blanco después de 30-40 minutos y a esta mezcla se añadió ácido 4-nitrofenilglicólico en CH_2Cl_2 (10 ml), dando como resultado la formación de una solución transparente. Después de agitar la mezcla durante 1 hora, se añadió N-metilpiperazina (5 mmol) a temperatura ambiente. Después de la finalización de la reacción (TLC, 10 minutos), la mezcla se lavó con una solución acuosa al 10 % de NaHCO_3 (2 x 10 ml), seguido de H_2O (3 x 10 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y la retirada del disolvente a presión reducida produjo un producto en bruto, que se purificó adicionalmente por recristalización o cromatografía en columna (éter de pet.:acetato de etilo = 8:2).

El compuesto de cetoamida se redujo adicionalmente con 0,5 cantidades equivalentes de LiAlH_4 en presencia de THF o DIBAL-H o borohidruro sódico para producir el Compuesto de nitro C. [B. P. Bandgar y S. S. Pandit, Tetrahedron Letters 44 (2003) 3855-3858]

El Compuesto de nitro C se redujo al Compuesto de anilina I tanto por tratamiento con SnCl_2 como hidrogenación catalítica con Pd/C (10 % p/p) como catalizador en metanol a temperatura ambiente durante aproximadamente 6-11 horas con un rendimiento del 65-81 %. Este pudo obtenerse a través de los siguientes procedimientos usando un sistema MultiMaxIR con un RB04-50 Reactor B. El reactor se cargó inicialmente con 35 ml de metanol, 0,03 mg de Pd al 10 %/C y 0,0252 mol del Compuesto nitro C y el hidrógeno se añadió en el reactor hasta una presión de 6,3 bar (H_2 , const.).

En referencia al esquema de síntesis del Compuesto M, se trató L-valina protegida con Boc con N-hidroxisuccinimida y EDAC-HCl en DCM o N-hidroxisuccinimida y EDC en DCM para dar el éster de succinimida. Este éster activado se hizo reaccionar con L-Citrulina y CH_3CN , H_2O , NaHCO_3 para formar el Compuesto M protegido con Boc.

En referencia al esquema de síntesis del Compuesto Tap-18H, el Compuesto I de anilina se acopló con el Compuesto M protegido con Boc por medio de DCC/HOBt en DMF a temperatura ambiente durante 32 horas para dar el Compuesto N (rendimiento 78-82 %) o con PS-carbodiimida, en el que la reacción de síntesis del Compuesto N se realizó partiendo de 100 mg del Compuesto M con 1,5 equivalentes del Compuesto de anilina I en presencia de dos equivalentes de PS-carbodiimida y 1,7 equivalentes de HOBt en DCM durante 24 horas. El análisis de CL/EM mostró el pico con la masa deseada y una conversión de aproximadamente 50-60 %.

Después, el Compuesto N de producto acoplado se hizo reaccionar con cloroformiato de 4-nitrofenilo en presencia de

2,6-lutidina en DCM a TA durante 8 horas para producir el Compuesto de carbonato P, La CL/EM mostró el pico con la masa deseada.

El tratamiento del Compuesto de carbonato P con monometil Dolastatina 10 en presencia de HOAt y Et₃N en DMF dio como resultado la formación del Compuesto Q.

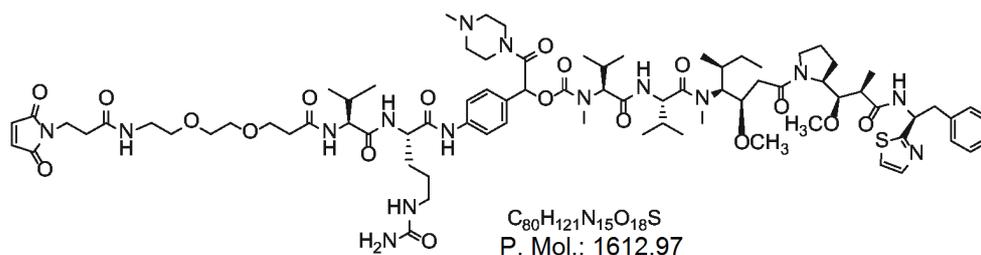
En referencia al esquema de síntesis del Compuesto O, se trató β-alanina con anhídrido maleico en DMF y el ácido así obtenido se hizo reaccionar con N-hidroxisuccinimida (NHS) en condiciones de acoplamiento de DCC para dar NHS-éster. El grupo protector BOC en t-blc-N-amido-dPEG4-ácido disponible en el mercado se retiró por tratamiento con TFA para dar la sal TFA de la amina, que se hizo reaccionar con el NHS éster previamente sintetizado. El ácido carboxílico así obtenido se aisló y se acopló con N-hidroxisuccinimida usando EDCI para formar el Compuesto O de NHS éster.

En referencia al esquema de síntesis del Compuesto Tap-18H, el grupo Boc en el Compuesto Q se retiró con TFA y la amina libre se acopló con el Compuesto O de NHS éster en acetonitrilo anhidro y NaHCO₃ a temperatura ambiente durante 12-36 horas para producir el producto final Tap-18H con un rendimiento del 35-45 %.

La Figura 5 muestra un espectro de RMN de Tap-18H.

Síntesis del Compuesto TAP-18Hr1

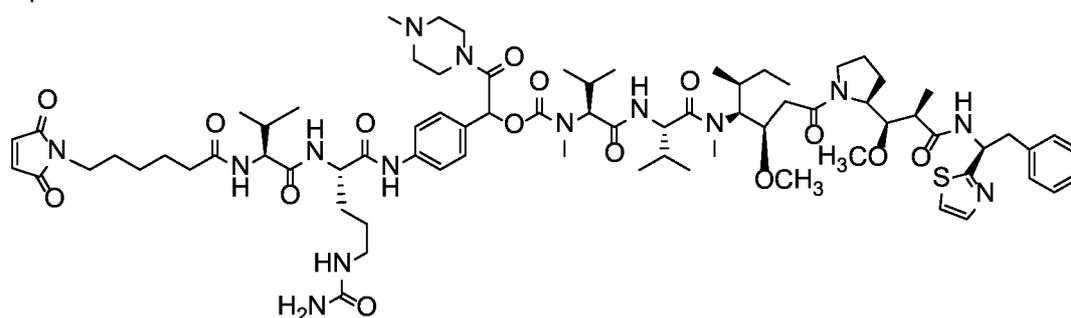
Tap-18Hr1 se sintetizó con la fórmula que se muestra más adelante. La Figura 6 muestra el espectro de RMN de Tap-18Hr 1.



(Tap-18Hr1)

Síntesis del Compuesto TAP-18Hr2

Tap-18Hr2 se sintetizó con la fórmula que se muestra más adelante. La Figura 7 muestra el espectro de RMN de Tap-18Hr2.



(Tap-18Hr2)

Preparación de conjugados de fármaco anticuerpo (ADC)

h5F1Ca.1 se preparó por el procedimiento tradicional. DTT y DTP A se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). TCEP se obtuvo de Acros (Morris Plains, NJ). DTNB se obtuvo de Thermo Scientific (Rockford, IL). Fosfato de sodio, borato de sodio y cloruro de sodio se obtuvieron de J.T. Panadero (Center Valley, PA). La cisteína se obtuvo de Alfa Aesar (Ward Hill, MA).

h5F1Ca.1 se redujo con aproximadamente 1,3 equivalentes de TCEP en borato de sodio 0,025 M, pH 8, NaCl 0,025 M, DTPA 1 mM durante 2 horas a 37 °C. La concentración de proteína se cuantificó utilizando un valor de absorbancia de 1,42 a 280 nm para una solución de 1,0 mg/ml, y la concentración molar se determinó utilizando un peso molecular de 150.000 g/mol. La concentración de tioles de mAb-cisteína producida se determinó mediante titulación con DTNB. Normalmente, se obtienen aproximadamente de 2,0 a 2,5 tioles/mAb cuando se usan 1,3 equivalentes molares de

TCEP.

El h5F1Ca.1 parcialmente reducido se alquiló con 1,2 molar de maleimidocaproil-fármacos/mAb-cisteína tiol o maleimido-fármacos/mAb-cisteína tiol. La reacción de alquilación se realizó a 10 °C durante 60 minutos. Se usó cisteína (1 mM final) para inactivar el exceso de maleimidocaproil-fármacos o maleimido-fármacos sin reaccionar. Los ADC se ajustaron primero a pH 5 con ácido acético 1 M y se aplicaron a una columna HiTrap™ SP FF (GE Healthcare) a un caudal de 1 ml/min. El tamaño de la columna fue de 1 ml por 10 mg de ADC. La columna se equilibró previamente con 5 volúmenes de columna de tampón de unión, acetato de sodio 25 mM con DMSO al 15 %, pH 5. Tras la aplicación, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de unión y luego se eluyó con tampón de elución, acetato de sodio 25 mM pH 5, DMSO al 0-15 %, NaCl 300 mM. Las ADC purificadas se cambiaron a solución salina tamponada con fosfato mediante diálisis durante la noche a 4 °C. Líneas celulares

Las células cancerosas gástricas SNU-16 (BCRC, n.º de cat. 60212), las células de cáncer colorrectal COLO 205 (ATCC, n.º de cat. CCL-222), DLD-1 (ATCC, n.º de cat. CCL-221) y SW480 (ATCC, n.º de cat. CCL-228) se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO, n.º de cat. 22400) suplementado con FBS al 10% (GIBCO, n.º de cat. 26140) y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (GIBCO, n.º de cat. 15140).

La línea celular de cáncer colorrectal DLD-1 (BCRC, v. 60132) se cultivó en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10%, Piruvato sódico 1 mM (GIBCO, n.º de cat. 11360) y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina.

La línea celular de cáncer de páncreas PANC-1 (BCRC, n.º de cat. 60284) se cultivó en medio de Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO, n.º de cat. 11965) suplementado con 10 % de FBS y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina.

Las células de cáncer pancreático Panc 02.03B se adaptaron de Panc 02.03 (ATCC, n.º de cat. CRL-2553), y se cultivó sin insulina en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 15 %, 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina y piruvato de sodio 1 mM (GIBCO, n.º de cat. 11360).

Análisis de ADC por HPLC de Fase Inversa

Los ADC Se analizaron en condiciones de desnaturalización y reducción calentando con DTT 25 mM, clorhidrato de guanidina 3 M a 80 °C durante 10 minutos. Se aplicaron 50 µg de ADC desnaturalizado a una columna PLRP-S (2,1 x 150 mm, 8 µm, 1000Å, Aligent (Santa Clara, CA)). El caudal fue 0,8 ml/min y la temperatura de columna fue 80 °C. El disolvente A fue ácido trifluoroacético al 0,05 % en agua y el disolvente B fue ácido trifluoroacético al 0,04 % en acetonitrilo. El método incluyó lo siguiente: 25 % de B isocrático durante 3 minutos; un gradiente lineal de 25 a 50 % de B; un gradiente lineal de 2 minutos a 95 % de B; un gradiente lineal de 1 minutos a 25 % de B; y 25 % de B isocrático durante 2 minutos. Las asignaciones de pico se hicieron con h5F1Ca.1 no conjugado (L0 y H0). L1, H1, H2 y H3 se asignaron por sus tiempos de elución, espectros de UV (la proporción A248/280 aumenta con la carga de fármaco), y perfil SDS-PAGE (cadena ligera y cadena pesada).

Citotoxicidad *in vitro* mediante ensayo WST-1

Se sembraron células cancerosas SNU-16, Panc 02.03B, COLO 205 y SW480 1×10^4 , 3×10^3 , 2×10^4 y $1,2 \times 10^4$ células/pocillo, respectivamente, en placas de microtitulación de 96 pocillos. Las células cancerosas DLD-1 y PANC-1 se sembraron 1×10^4 células/pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos. h5F1Ca.1/Tap18H ADC, h5F1Ca.1/Tap18Hr1 o el anticuerpo desnudo h5F1Ca.1 se agregaron por triplicado a una concentración final de 3 µg/ml y 1 µg/ml o concentraciones finales indicadas y un volumen final de 200 µl/pocillo. Las células se incubaron luego a 37 °C y 5 % de CO₂, y la viabilidad celular se detectó a las 72 horas o 96 horas mediante el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche (Nutley, NJ), n.º cat. 11644807001) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, al final de la incubación, se retiraron 100 µl de medio y se agregaron 10 µl/pocillo de WST-1 a la línea celular probada. Después del desarrollo óptimo del color (cuando DO₄₅₀ del control no tratado \square 1.00), se midió la absorbancia a 450 nm (valor DO₄₅₀) mediante espectrofotómetro (Molecular Devices (Sunnyvale, CA), Lector de microplacas VERSAmax). Se obtuvo la media de los triplicados y se restó el fondo (control medio). Los valores de DO₄₅₀ resultantes se utilizaron para calcular el % de inhibición de acuerdo con la siguiente fórmula: $[\text{DO}_{450} \text{ disolvente} - \text{DO}_{450} \text{ muestra}]/[\text{DO}_{450} \text{ disolvente}] * 100$. El disolvente indica el control no tratado.

Tratamiento de ADC en modelo de xenoinjerto de cáncer

Para establecer un modelo de xenoinjerto subcutáneo, se implantaron 5×10^6 células SNU-16 en el flanco derecho de ratones SCID C.B-17 (Lasco, Taipei, Taiwan). El tratamiento con ADC se inició cuando el volumen promedio del tumor alcanzó 110-120 mm³ (marcado como Día 1). h5F1Ca.1/Tap18H o h5F1Ca.1/Tap18Hr1 se inyectó por vía intravenosa a 1 o 2 mg/kg en 100 µl. El volumen del tumor se midió dos veces por semana con un calibrador en dos dimensiones perpendiculares, y se calculó de acuerdo con la fórmula $(0,52 * \text{longitud} * \text{ancho} * \text{ancho})$.

Resultados

Análisis de ADC por HPLC de fase invertida

- 5 La reducción y desnaturalización de HPLC de fase inversa se utilizó para separar y caracterizar cadenas ligeras y pesadas con diferentes fármacos. En este método, el tratamiento previo del ADC con clorhidrato de guanidina 3M y el exceso de DTT a 80 ° C desnaturaliza el anticuerpo y rompe la cadena y los disulfuros intracatenarios permiten la separación de la cadena ligera con 0 o 1 fármacos (L0 y L1) y la cadena pesada con 0, 1, 2, 3 fármacos (H0, H1, H2, H3) (Fig. 1). En general, la dolastatina-10 es más hidrófoba que la MMAE. Sin embargo, los datos muestran que la
- 10 cadena pesada y ligera con el fármaco dolastatina-10 se eluyó antes que el fármaco monometil auristatina E (MMAE) en los picos L1, H1, H2 y H3. Esto muestra que el grupo extra de piperazina en el fármaco a base de dolastatina 10 reduce la hidrofobicidad de la molécula. Esta característica del grupo de la piperazina puede reducir la posible agregación en la alta carga de fármaco por ADC causada por la hidrofobicidad de la dolastatina-10.
- 15 La Figura 1 muestra la caracterización HPLC de fase inversa de los ADC. La Figura 1 (A) muestra el cromatograma para h5F1Ca.1/Tap-18H. La Figura 1 (B) muestra el cromatograma para h5F1Ca.1/MMAE. Se muestra la cadena ligera con 0 o 1 fármacos (L0 y L1) y cadena pesada con 0, 1, 2, 3 fármacos (H0, H1, H2, H3).

Citotoxicidad i

- 20 La actividad citotóxica *in vitro* de h5F1Ca.1/Tap18H se evaluó en las líneas celulares de cáncer positivo para el antígeno h5F1Ca.1 (SNU-16, COLO 205 y Panc02.03B) y la línea celular negativa para el antígeno (SW480). La citotoxicidad por el anticuerpo h5F1Ca.1 desnudo también se probó en paralelo. Como se muestra en la Tabla 3, mientras que h5F1Ca.1 solo no fue capaz de inducir citotoxicidad en las concentraciones analizadas (3 y 1 µg/ml),
- 25 h5F1Ca.1/Tap18H inhibió eficazmente el crecimiento de líneas celulares de cáncer, SNU-16, COLO 205 y Panc02.03B. No se observó toxicidad en la línea celular negativa de antígeno SW480, indicando que el ADC mató fue a través de un mecanismo de focalización específico. Estos resultados demuestran que el ADC administró el fármaco citotóxico a las células cancerosas objetivo con especificidad de antígeno.

30 Tabla 3 Actividad citotóxica *in vitro* por h5F1Ca.1/Tap18H

(% de inhibición)		3 µg/ml	1 µg/ml
SNU-16	h5F1Ca.1/Tap18H	95,7	90,6
	h5F1Ca.1	-13,7	-0,1
COLO 205	h5F1Ca.1/Tap18H	90,1	82,4
	h5F1Ca.1	-11,0	-7,2
Panc 02.03B	h5F1Ca.1/Tap18H	81,0	78,4
	h5F1Ca.1	-12,5	-6,4
SW480	h5F1Ca.1/Tap18H	-20,9	-12,4
	h5F1Ca.1	-9,2	-3,8

Nota: Los valores negativos indican ninguna inhibición observada en los pocillos ensayados.

La actividad citotóxica del h5F1Ca.1/Tap18Hr1 también se evaluó en un experimento separado. De forma similar, la inhibición eficaz se indujo por h5F1Ca.1/Tap18Hr1 en la línea celular de cáncer gástrico de unión positiva SNU-16, pero no en la línea celular colorrectal de unión negativa SW480 (Tabla 4).

35

Tabla 4 Actividad citotóxica *in vitro* por h5F1Ca.1/Tap18Hr1

(% de inhibición)		3 µg/ml	1 µg/ml
SNU-16	h5F1Ca.1/Tap18Hr1	98,2	97,0
	h5F1Ca.1	4,0	3,3
SW480	h5F1Ca.1/Tap18Hr1	5,4	1,9
	h5F1Ca.1	-3,0	1,2

Nota: La inhibición por debajo del 10 % se considera un valor de fondo del ensayo. Los valores negativos indican ninguna inhibición observada en los pocillos ensayados.

Evaluación *in vivo* de ADC

- 40 La potencia de ADC h5F1Ca.1/Tap18H se evaluó *in vivo* frente a las líneas celulares de cáncer gástrico SNU-16. Cuando el tamaño del tumor inoculado alcanzó 120 mm³ (marcado como Día 1), los ratones se trataron con una sola

dosis de ADC o vehículo a 2 mg/kg. Comparado con el grupo de vehículo en el que tumor creció rápidamente y se aproximó a 400 mm³ al día 12, el grupo de h5F1Ca.1/Tap18H mostró remisión en el Día 5, y los tamaños de tumor medios se suprimieron adicionalmente hasta <20 mm³ en el día 12 (Figura 2). El peso corporal de estos ratones permaneció sin cambios en los grupos tanto de tratamiento como de vehículo. Por lo tanto, los datos muestran que h5F1Ca.1/Tap18H puede inhibir eficazmente el crecimiento de un tumor con antígeno positivo en ratones SCID.

La Figura 2 muestra un gráfico de la actividad antitumoral *in vivo* por h5F1Ca.1/Tap18H frente a SNU-16 de cáncer gástrico.

La potencia de ADC h5F1Ca.1/Tap18Hr1 se evaluó *in vivo* frente a las líneas celulares de cáncer gástrico SNU-16. Cuando el tamaño del tumor inoculado alcanzó 100 mm³ (marcado como día 1), los ratones se trataron con 2 dosis semanales de vehículo o ADC a 1 mg/kg. Como se muestra en la Figura 3, la administración de h5F1Ca.1/Tap18Hr1 provocó la regresión del tumor, en el que el tamaño medio del tumor se suprimió hasta <10 mm³. El peso corporal de estos ratones permaneció sin cambios en los grupos tanto de tratamiento como de vehículo. Por lo tanto, nuestros datos muestran que h5F1Ca.1/Tap18Hr1 puede inhibir eficazmente el crecimiento de un tumor con antígeno positivo en ratones SCID.

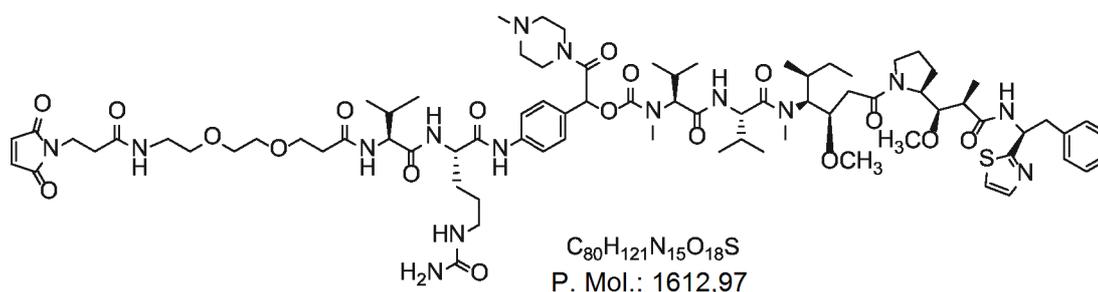
Ejemplo 2: Efectos de anticuerpo anti-TfR basados en conjugado anticuerpo fármaco (ADC) en la inhibición del crecimiento tumoral

Preparación de conjugados anticuerpo fármaco (ADC)

Se produjo 5D7-54,17 quimérico (c5D7) a partir de células Flp-In CHO transfectadas con vector de expresión, pcDNA5-FRT-hlgG1, que contienen los genes de región variable de cadena pesada y ligera de murina 5D7-54,17. Después, el anticuerpo c5D7 se conjugó el fármaco citotóxico monometil dolastatina 10 para evaluar su efecto antitumoral *in vivo* mediante un enlazador que contiene piperazina (véase Tabla 5 para estructura). En un ejemplo, en primer lugar se redujo c5D7 purificado con 3,0 equivalentes de TCEP (o tris(2-carboxietil)fosfina) en borato sódico 0,025 M pH 8, NaCl 0,025 M, DTPA 1 mM (o ácido pentético o ácido dietileno triamino pentaacético) durante 2 h a 37 °C. La concentración de proteína se cuantificó usando un valor de absorbancia de 1,346 a 280 nm para una solución a 1,0 mg/ml, y la concentración molar determinada usando un peso molecular de 145,194 g/mol. La concentración de tioles de mAb-cisteína producidos se determinó mediante valoración con DTNB (o 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)). Normalmente se produjeron de 4,0 a 4,5 tioles/mAb cuando se usaron 3,0 equivalentes molares de TCEP. Se alquiló c5D7 parcialmente reducido con 2,4 moles de maleimidocaproil-monometil dolastatina 10/mAb-cisteína tiol. La reacción de alquilación se realizó a 10 °C durante 30 min. Se usó cisteína (1 mM final) se usó para inactivar cualquier exceso sin reaccionar de fármaco de maleimidocaproil-monometil dolastatina 10. Los ADC resultantes se cargaron en una solución salina tamponada con fosfato mediante diálisis durante una noche a 4 °C.

Tap-18Hr1 se sintetizó con la fórmula que se muestra más adelante. La Figura 6 muestra el espectro de RMN de Tap-18Hr1.

Tabla 5: La porción de Enlazador-Fármaco del conjugado Anticuerpo-Fármaco.



(Tap-18Hr1)

Los inventores examinaron adicionalmente la actividad citotóxica *in vitro* del c5D7/Tap18Hr1 en la línea celular de cáncer colorrectal de unión positiva DLD-1, y la línea celular pancreática de unión negativa PANC-1. Consistente con los datos presentados anteriormente, una inhibición eficaz del rendimiento en células de DLD-1 se indujo mediante c5D7/Tap18Hr1 pero no mediante únicamente el anticuerpo c5D7 (Tabla 6). No se observó ninguna inhibición en la línea celular de unión negativa PANC-1 a las dosis indicadas. En conjunto, estos resultados demuestran que nuestro ADC liberó únicamente fármaco citotóxico a las células cancerosas diana que expresan el antígeno específico.

Tabla 6: Actividad citotóxica *in vitro* por c5D7/Tap18Hr1

(% de inhibición)		0,3 µg/ml	0,1 µg/ml
DLD-1	c5D7/Tap18Hr1	62,0	35,4
	c5D7	-0,3	0,6
PANC-1	c5D7/Tap18Hr1	1,4	2,9
	c5D7	4,5	4,6

Nota: La inhibición por debajo del 10 % se considera un valor de fondo del ensayo. Los valores negativos indican ninguna inhibición observada en los pocillos ensayados.

Tratamiento con ADC en modelo de xenoinjerto de cáncer

- 5 Para establecer un modelo de xenoinjerto subcutáneo, se implantaron 5×10^6 células de cáncer colorrectal DLD-1 en el flanco derecho de ratones C.B-17 SCID (Lasco, Taipei, Taiwan). Se administró por vía intravenosa ADC de c5D7 conjugado con fármaco a 3 mg/kg a los días 1 y 5 tras la inoculación del tumor. El volumen del tumor se midió dos veces a la semana con un calibrador en dos dimensiones perpendiculares, y se calculó de acuerdo con la fórmula ($0,52 \times \text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{anchura}$).

Resultados

- 15 El anticuerpo quimérico 5D7-54.17 (c5D7) se usó en la preparación del conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC), c5D7/Tap18Hr1 (véase anteriormente para los métodos de preparación del ADC). La actividad antitumoral de c5D7/Tap18Hr1 se evaluó *in vivo* en ratones SCID trasplantados con DLD-1. El tratamiento se inició a los días 1 y 5 tras la inoculación del tumor con vehículo o ADC a 3 mg/kg. Comparado con el grupo de vehículo en el que tumor se aproximó a 500 mm^3 al día 14, c5D7/Tap18Hr1 suprimió por completo el crecimiento tumoral a lo largo del periodo de estudio (Figura 4). El peso corporal de los ratones de ambos grupos permaneció sin cambios después del tratamiento (25 g de media). Los datos muestran que la liberación dirigida al cáncer de fármaco citotóxico por el receptor de anti-transferrina c5D7 fue capaz de inhibir eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo*.

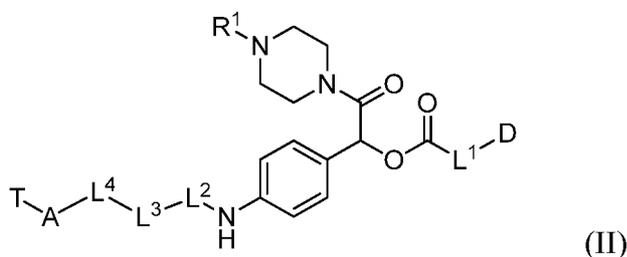
Referencias

- 25 1. Carter, PJ y Senter, PD. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Cancer J.* 2008; 14: 154-169)
 2. Teicher, BA. Antibody-drug conjugate targets. *Current cancer Drug Targets* 2009, 9: 982-1004.
 3. Ducry, L y Stump, B. Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjugate chem.*, 2010, 21: 5-13.
 30 4. Koblinski, JE., Ahram, M y Sloane, BF. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chem. Acta* 2000; 291: 113-135.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:

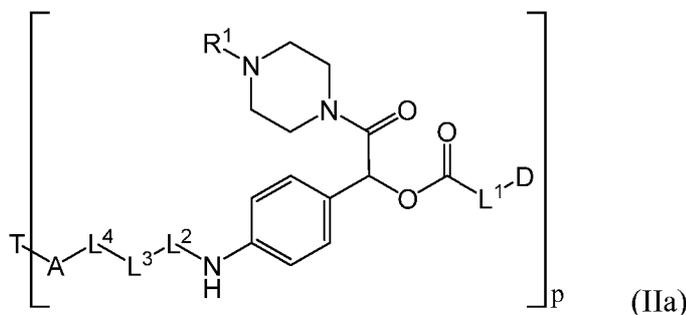
5 (i) fórmula (II):



10 o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo; en donde:

D es un resto de fármaco;
 T es un resto de direccionamiento;
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;
 15 L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
 L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
 en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
 20 L³ es un enlazador de péptidos;
 L⁴ es un enlace o un espaciador; y
 A es una unidad de acilo;
 o

25 (ii) fórmula (IIa):



30 o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo; en donde:

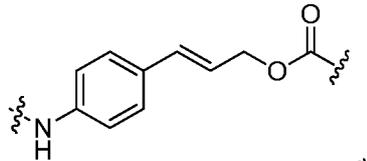
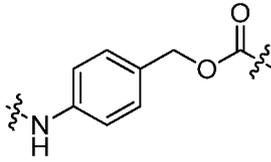
p es de 1 a 20;
 D es un resto de fármaco;
 T es un resto de direccionamiento;
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;
 35 L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
 L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
 en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
 40 L³ es un enlazador de péptidos;
 L⁴ es un enlace o un espaciador; y
 A es una unidad de acilo.

45 2. El compuesto de fórmula (IIa) de la reivindicación 1, en el que p es de 1 a 4.

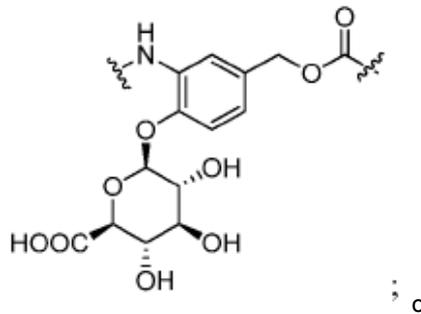
3. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, en el que L¹ es:

- (a) un enlace; o
 (b) un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, en donde opcionalmente

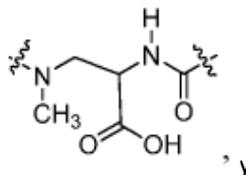
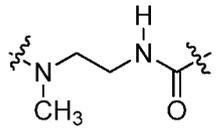
- 5 (i) L¹ es un enlazador de aminobenciloxycarbonilo;
 (ii) L¹ se selecciona entre el grupo que consiste en



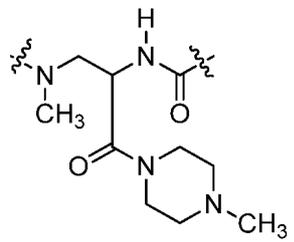
10



- (iii) L¹ se selecciona entre el grupo que consiste en



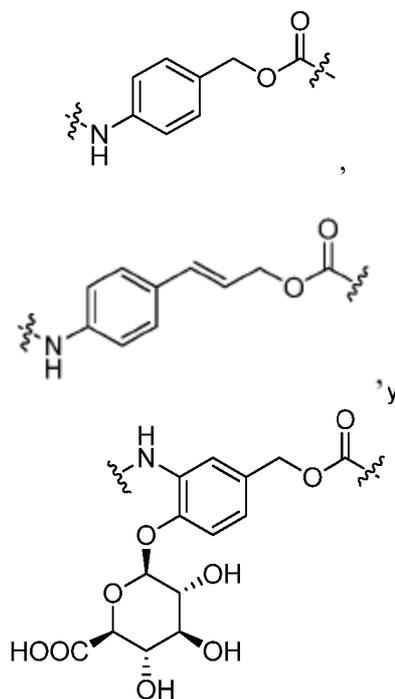
15



4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que L² es:

- 20 (a) un enlace; o
 (b) un segundo enlazador auto inmolativo,
 en donde opcionalmente

- 25 (i) L² es un enlazador de aminobenciloxycarbonilo; o
 (ii) L² se selecciona entre



5

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que L^3 es:

- (a) un enlazador de péptidos de 1 a 10 residuos de aminoácidos, en donde opcionalmente L^3 es un enlazador de péptidos de 2 a 4 residuos de aminoácidos; o
 (b) un enlazador de péptidos que comprende al menos un residuo de lisina o de arginina; o
 (c) un enlazador de péptidos que comprende un residuo de aminoácido seleccionado entre lisina, D-lisina, citrulina, arginina, prolina, histidina, ornitina y glutamina; y/o un enlazador de péptidos que comprende un residuo de aminoácido seleccionado entre valina, isoleucina, fenilalanina, metionina, asparagina, prolina, alanina, leucina, triptófano y tirosina; o
 (d) una unidad dipeptídica seleccionada entre valina-citrulina, prolina-lisina, metionina-D-lisina, asparagina-D-lisina, isoleucina-prolina, fenilalanina-lisina y valina-lisina, en donde opcionalmente L^3 es valina-citrulina.

6.

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que L^4 es:

20

- (a) un enlace; o
 (b) un espaciador, en donde opcionalmente

25

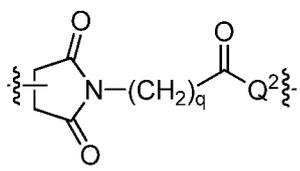
- (i) el espaciador es polialquilenglicol, alquileo, alquenileno, alquinileno o poliamina;
 (ii) L^4 es $L^{4a}\text{-C(O)}$, $L^{4a}\text{-C(O)-NH}$, $L^{4a}\text{-S(O)}_2$ o $L^{4a}\text{-S(O)}_2\text{-NH}$, en donde cada L^{4a} es independientemente polialquilenglicol, alquileo, alquenileno, alquinileno o poliamina;
 (iii) L^4 es $L^{4a}\text{-C(O)}$, en donde L^{4a} es polialquilenglicol, alquileo, alquenileno, alquinileno o poliamina;
 (iv) L^4 es $L^{4a}\text{-C(O)}$, en donde L^{4a} es un polialquilenglicol;
 (v) L^4 es $L^{4a}\text{-C(O)}$, en donde L^{4a} es un polietilenglicol;
 (vi) el espaciador es de la fórmula $\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{-O-CH}_2\text{)}_m\text{-CH}_2\text{-C(O)-}$, en donde m es un número entero de 0 a 30;
 (vii) L^4 es $L^{4a}\text{-C(O)}$, en donde L^{4a} es alquileo.

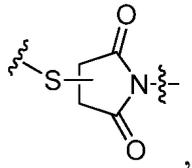
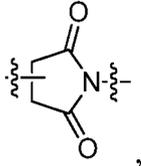
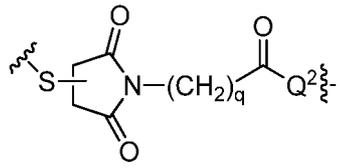
30

7. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que A se selecciona entre:

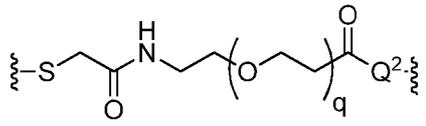
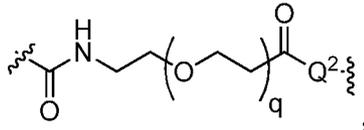
35

- (i) el grupo que consiste en

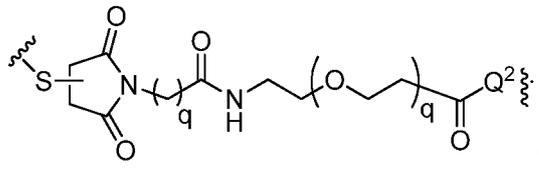
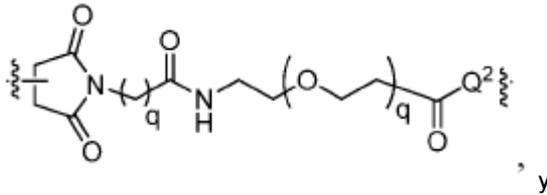




5

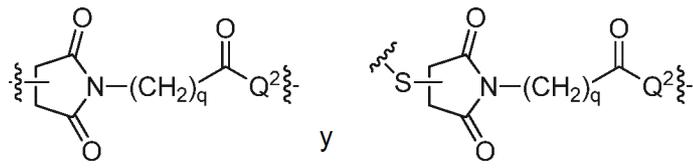


10



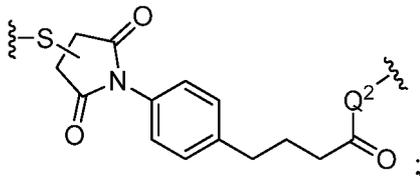
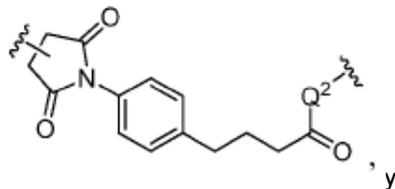
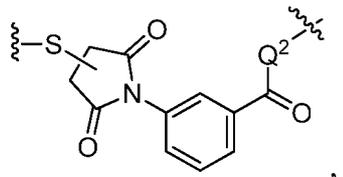
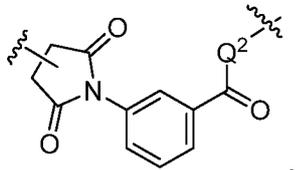
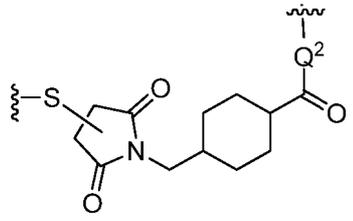
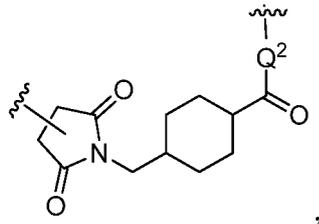
15

en los que cada Q^2 es NH u O, y cada q es independientemente un número entero de 1 a 10;
 (ii) el grupo que consiste en



20

en los que cada Q^2 es independientemente NH u O y cada q es independientemente un número entero de 1 a 10,
 en donde opcionalmente q es 2, 3, 4 o 5; o
 (iii) el grupo que consiste en



5

10

en el que cada Q^2 es independientemente NH u O.

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que T es un anticuerpo;
y en donde opcionalmente T es:

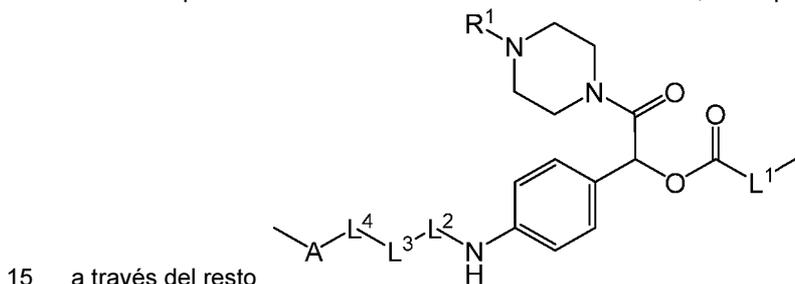
- (i) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 2;
- (ii) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 4;
- (iii) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-118 de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-113 de la SEQ ID NO: 2;
- (iv) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-108 de SEQ ID NO: 4;
- (v) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEC ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEC ID NO:2; o

(vi) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO:4.

5 9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que uno o más restos de aminoácidos de la cadena pesada y/o de la cadena ligera se reemplazan con un residuo de cisteína; y opcionalmente

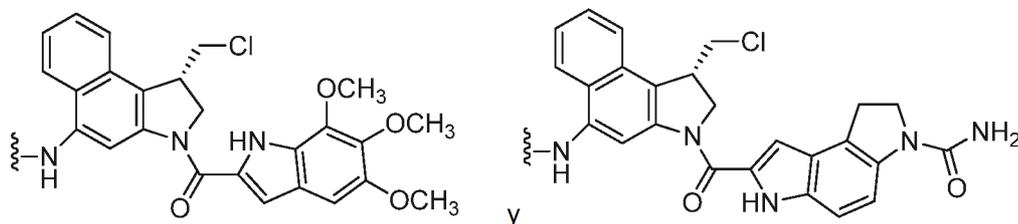
10 (i) en el que uno o más restos de aminoácidos de la cadena pesada se reemplazan con un residuo de cisteína; (ii) en el que uno o más restos de aminoácidos de la región Fc del anticuerpo se reemplazan con un residuo de cisteína; o (iii) en el que el uno o más restos de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo en las posiciones 157, 169 y/o 442 usando la numeración de la UE se reemplazan con un residuo de cisteína.

10. El compuesto de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que D está unido a T mediante un residuo de cisteína

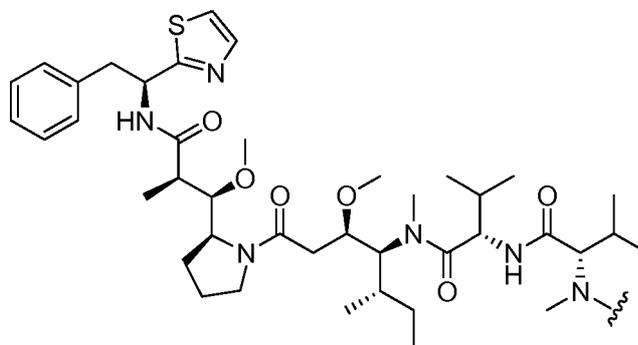


11. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que D es un resto de fármaco que contiene amino, en el que el fármaco está conectado a L¹ a través del grupo amino; y en el que opcionalmente

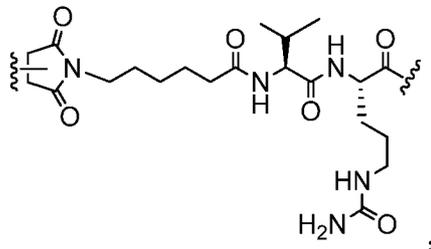
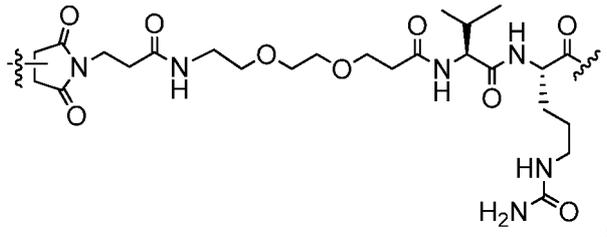
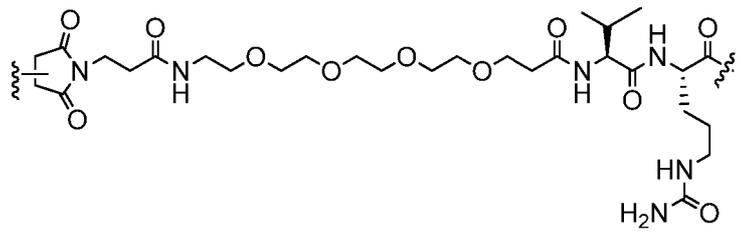
20 (i) D es duocarmicina, dolastatina, tubulisina, doxorubicina (DOX), paclitaxel o mitomicina C (MMC) o un derivado amino de los mismos; (ii) D se selecciona entre el grupo que consiste en



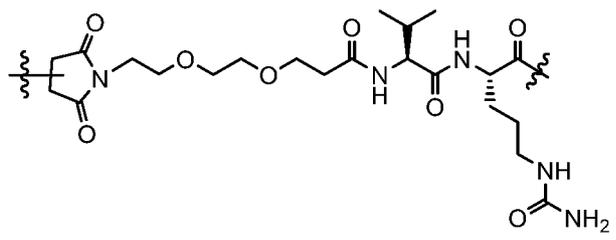
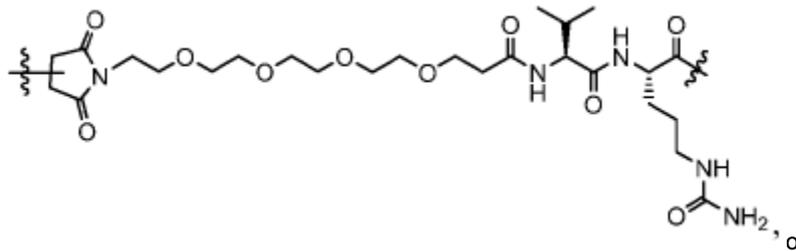
25 o (iii) D es:



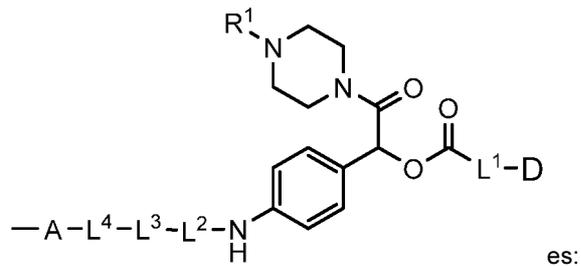
30 12. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que -A-L⁴-L³-L²- es

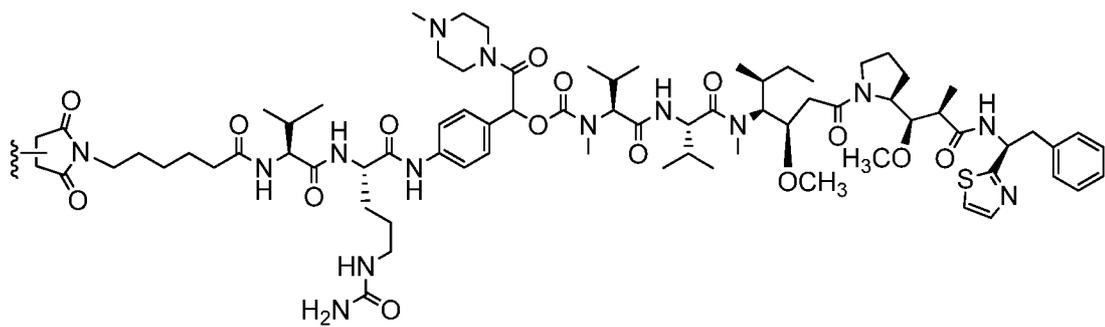
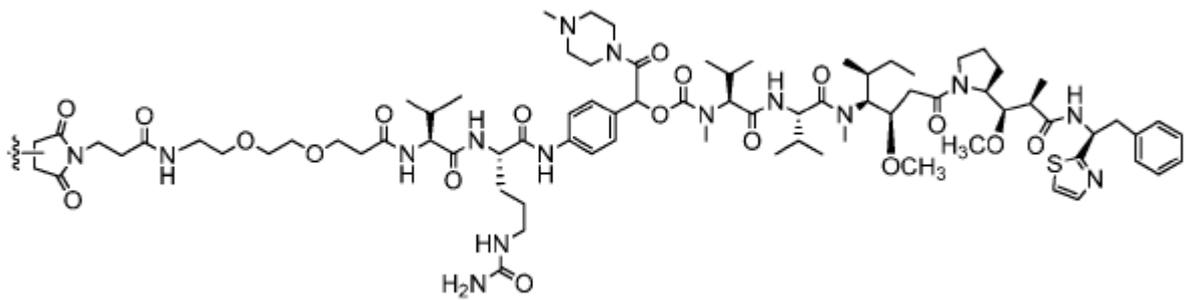
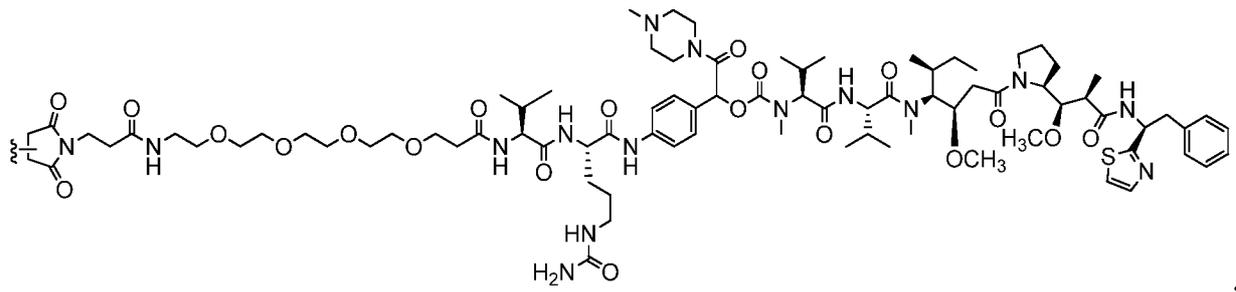


5



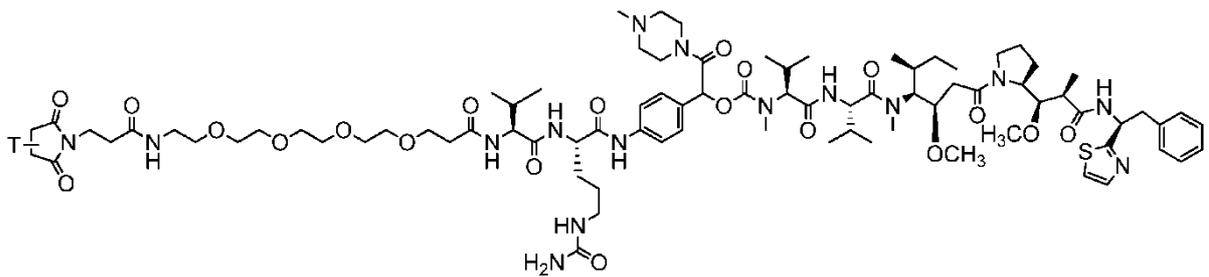
10 13. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el resto



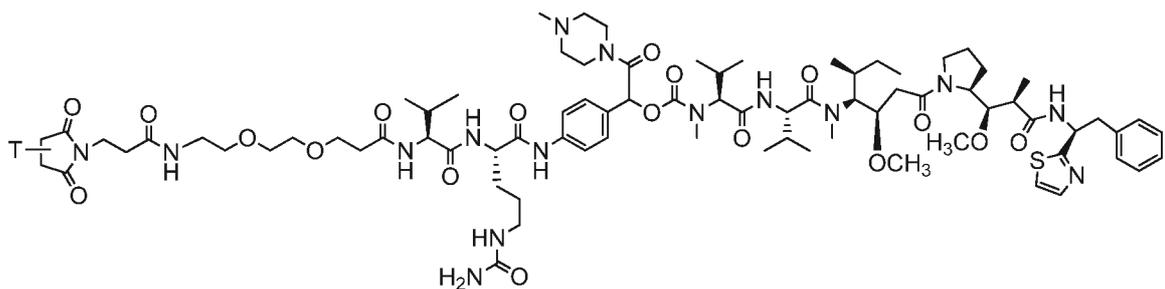


5

14. Un compuesto de la reivindicación 1, teniendo las fórmulas (III), (IV) o (V):

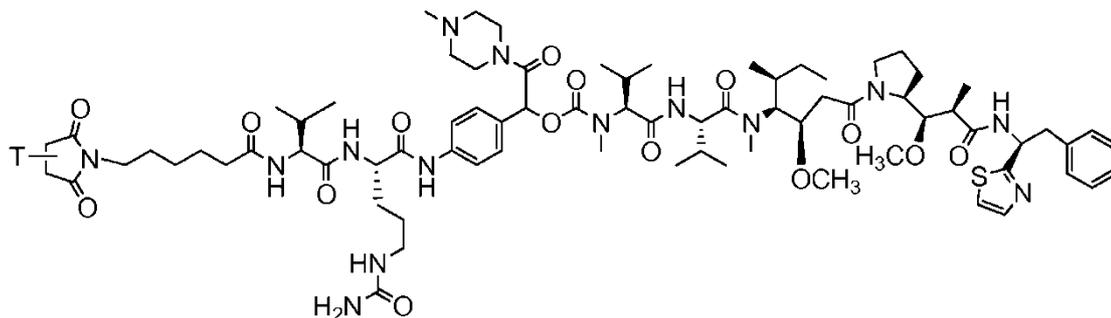


(III),



(IV), o

10

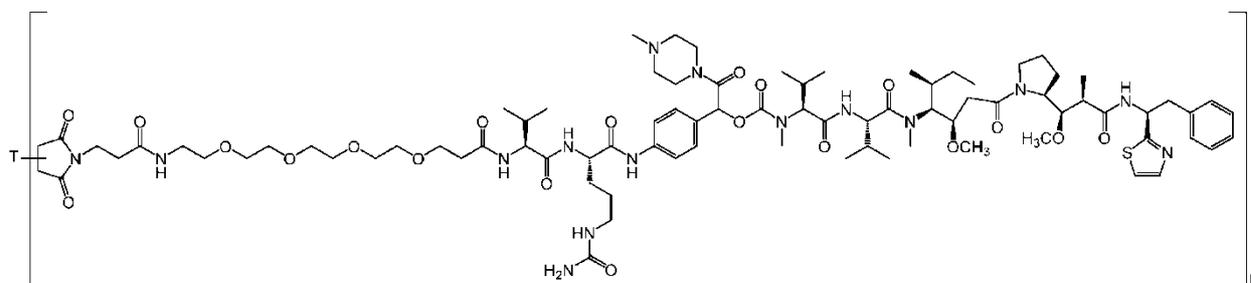


(V),

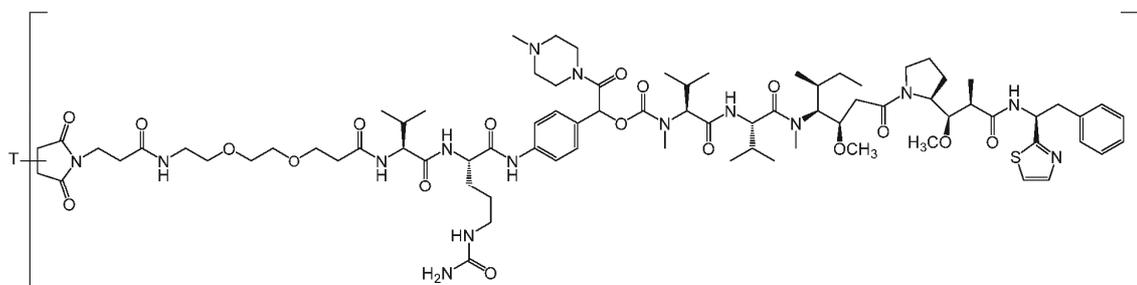
o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo; en donde T es:

- 5
- (a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 2;
- (b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 4;
- 10 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-118 de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-113 de SEQ ID NO: 2;
- (d) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-108 de SEQ ID NO: 4;
- 15 (e) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEC ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEC ID NO:2 o
- (f) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO:4;
- 20

o teniendo las fórmulas (IIIa), (IVa) o (Va):

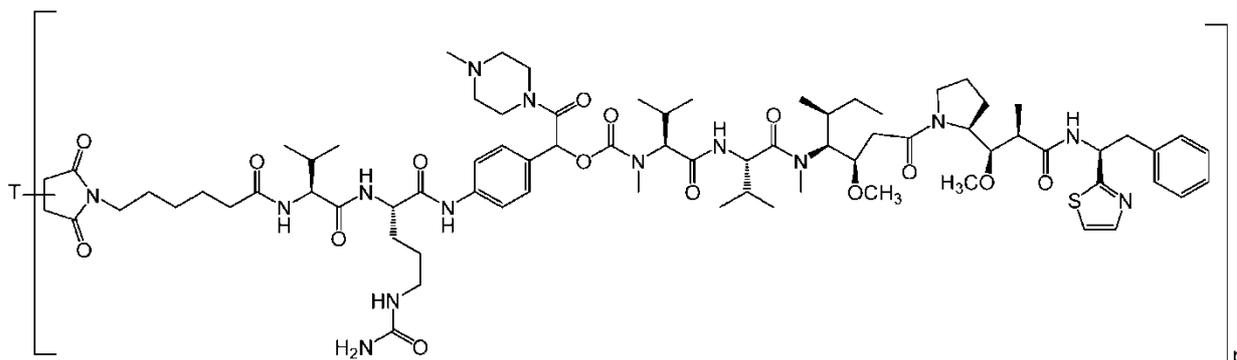


(IIIa),



(IVa), o

25



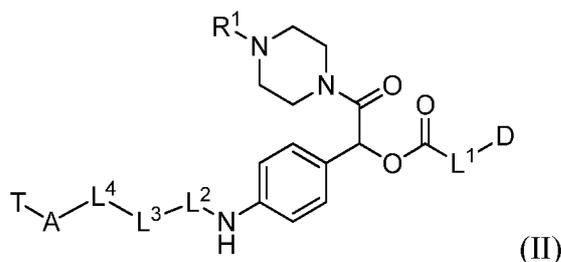
(Va),

o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo; en donde p es 1 a 4 y T es:

- 5 (a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 2;
- (b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR de la SEQ ID NO: 4;
- 10 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-118 de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-113 de SEQ ID NO: 2;
- (d) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende los aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-108 de SEQ ID NO: 4;
- 15 (e) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEC ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEC ID NO:2 o
- (f) un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la SEQ ID NO:4.

20 15. Un proceso para preparar un compuesto de la fórmula:

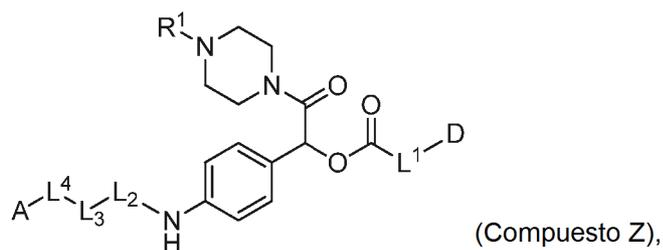
(i) fórmula (II):



25

o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo;
en la que:

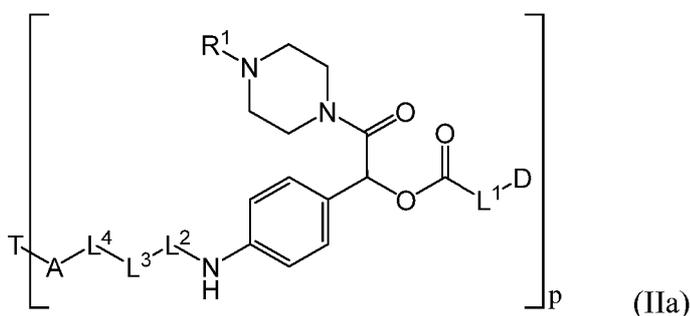
- 30 D es un resto de fármaco;
- T es un anticuerpo;
- R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;
- L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
- L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
- 35 en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
- en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
- L³ es un enlazador de péptidos;
- L⁴ es un enlace o un espaciador; y
- 40 A es una unidad de acilo;
- que comprende hacer reaccionar un anticuerpo con el Compuesto Z:



o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo;
o

5

(ii) fórmula (IIa):



10 o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo;
en la que:

p es de 1 a 20;

D es un resto de fármaco;

15 T es un anticuerpo;

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;

L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo o un enlazador de autoeliminación de ciclación;

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

20 en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;

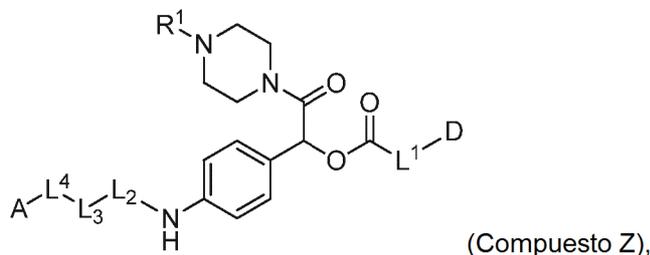
en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;

L³ es un enlazador de péptidos;

L⁴ es un enlace o un espaciador; y

A es una unidad de acilo;

25 que comprende hacer reaccionar un anticuerpo con el Compuesto Z:



30 o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo, opcionalmente en donde el anticuerpo comprende uno o más grupos sulfhidrilo.

16. Un compuesto o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo, en donde el compuesto se prepara por un proceso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el anticuerpo comprende uno o más grupos sulfhidrilo.

35 17. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y 16, o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

18. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y 16, o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo, para su uso en un procedimiento de matar a una célula, comprendiendo el procedimiento administrar a la célula una cantidad de dicho compuesto suficiente para matar la célula;

5 en donde opcionalmente la célula es una célula cancerosa;

y en donde opcionalmente la célula cancerosa es una célula de cáncer gástrico, célula de cáncer pancreático, célula de cáncer colorrectal, célula de cáncer de pulmón, célula de cáncer de esófago, célula de cáncer de vesícula biliar, célula cancerosa de cabeza y cuello, célula de cáncer de hígado, célula de carcinoma endometrial, célula de carcinoma de glándula salival, célula de linfoma, célula de cáncer de mama, célula de cáncer de cuello de útero o célula de cáncer de ovario.

10

19. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y 16, o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer;

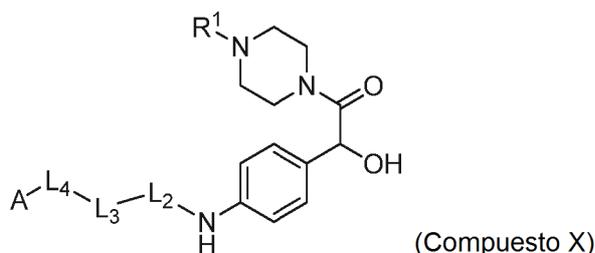
15

en donde, opcionalmente, el cáncer es cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, carcinoma de endometrio, carcinoma de las glándulas salivales, linfoma, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino o cáncer de ovario.

20. Un kit que comprende conforme al compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y 16, o una sal o solvato o un estereoisómero del mismo, en donde opcionalmente el kit comprende además instrucciones para su uso en el tratamiento del cáncer.

20

21. Un método de preparación de un compuesto que es: (i) Compuesto X:



25

o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo; en la que:

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

30

L³ es un enlazador de péptidos;

L⁴ es un enlace o un espaciador; y

A es una unidad de acilo; y

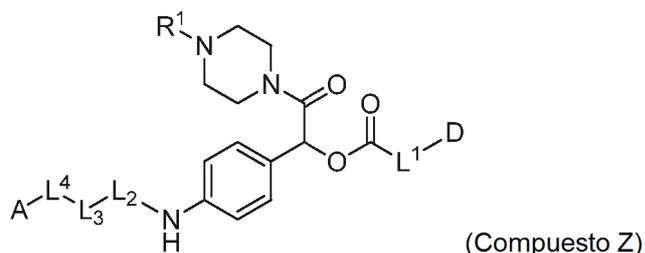
R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;



35

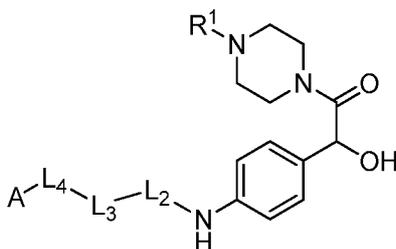
que comprende hacer reaccionar el Compuesto W: A-L⁴-L³-L²; y el Compuesto I:

(ii) Compuesto Z:



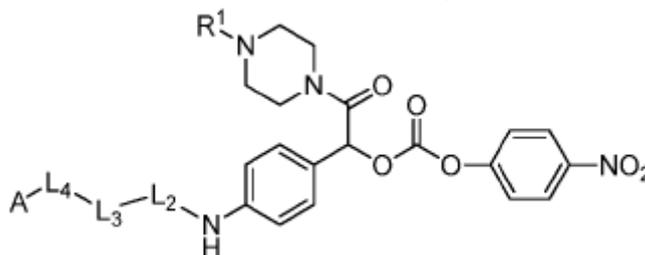
o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo;
 en la que:

- 5 D es un resto de fármaco;
 L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
 L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación,
 entonces L² es un enlace;
 10 en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
 L³ es un enlazador de péptidos;
 L⁴ es un enlace o un espaciador; y
 A es una unidad de acilo
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;
 que comprende:



15 hacer reaccionar el Compuesto X:

y cloroformiato de p-nitrofenilo

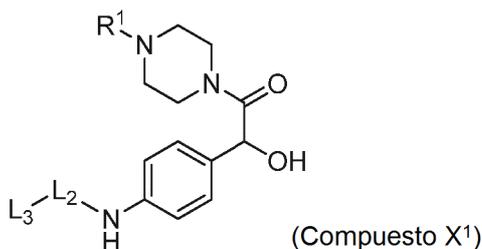


para formar el Compuesto Y:
 reaccionar el Compuesto Y con un compuesto que comprende L¹-D;

; y hacer

20 (iii) Compuesto X¹:

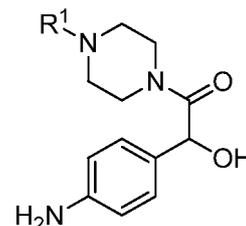
20



25 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
 en la que:

25

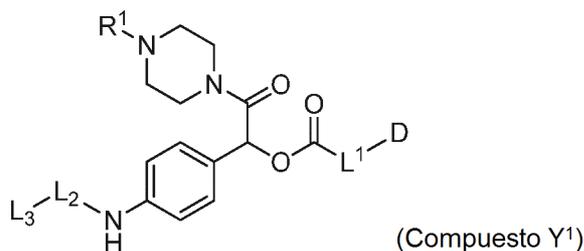
- L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 L³ es un enlazador de péptidos; y
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;



que comprende: hacer reaccionar el Compuesto W¹: L³-L²; y el Compuesto I

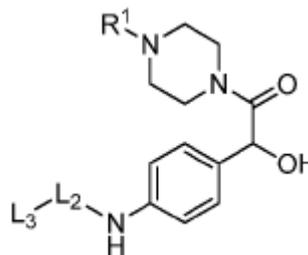
30

(iv) Compuesto Y¹:

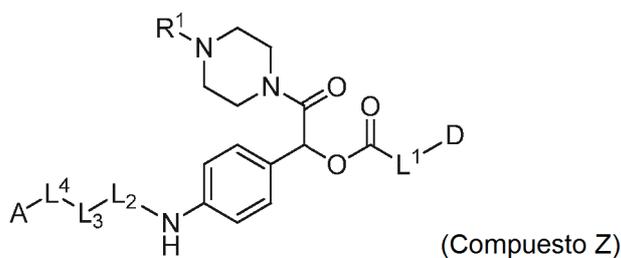


5 o una sal o solvato o estereoisómero del mismo;
en la que:

D es un resto de fármaco;
L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
10 en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
L³ es un enlazador de péptidos; y
R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;

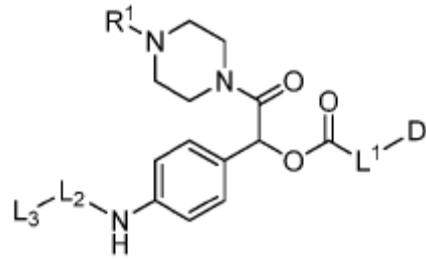


15 que comprende: hacer reaccionar el Compuesto X¹:
comprende L¹-D;
o (v) Compuesto Z:



20 o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo;
en la que:

D es un resto de fármaco;
L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
25 en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación, entonces L² es un enlace;
en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
L³ es un enlazador de péptidos;
L⁴ es un enlace o un espaciador;
A es una unidad de acilo; y
30 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;



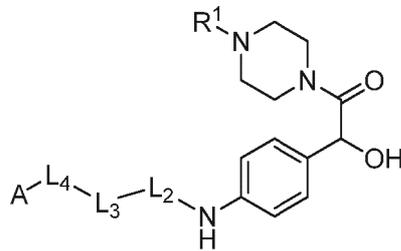
que comprende: hacer reaccionar el Compuesto Y¹:
compuesto que comprende A-L⁴.

, y un

22. Un compuesto que es:

5

(i) un compuesto de fórmula:



(Compuesto X)

10

o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo;
en la que:

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

L³ es un enlazador de péptidos;

15

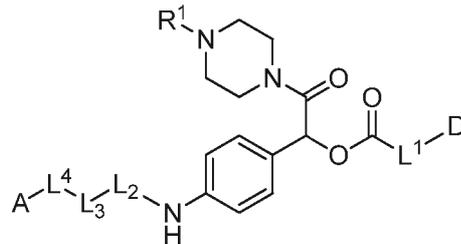
L⁴ es un enlace o un espaciador; y

A es una unidad de acilo; y

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;

(ii) un compuesto de fórmula:

20



(Compuesto Z)

o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo;
en la que:

25

D es un resto de fármaco;

L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo o un enlazador de autoeliminación de ciclación;

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;

30

en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación,
entonces L² es un enlace;

en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;

L³ es un enlazador de péptidos;

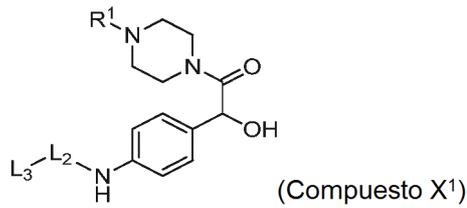
L⁴ es un enlace o un espaciador; y

A es una unidad de acilo; y

35

R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido;

(iii) un compuesto de fórmula:



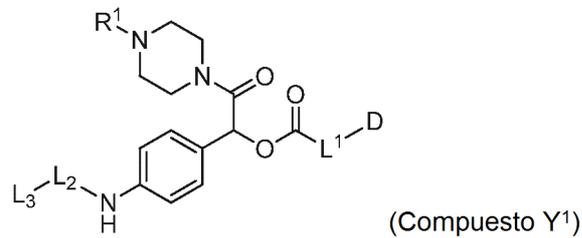
o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo;
 en la que:

5

L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 L³ es un enlazador de péptidos; y
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido, o heterociclilo sin sustituir o sustituido;

10

(iv) un compuesto de fórmula:



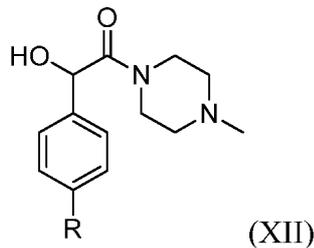
o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo;
 en la que:

15

D es un resto de fármaco;
 L¹ es un enlace, un segundo enlazador autoinmolativo o un enlazador de autoeliminación de ciclación;
 L² es un enlace o un segundo enlazador auto inmolativo;
 20 en donde si L¹ es un segundo enlazador auto inmolativo o un enlazador de auto eliminación de ciclación,
 entonces L² es un enlace;
 en donde si L² es un segundo enlazador auto inmolativo, entonces L¹ es un enlace;
 L³ es un enlazador de péptidos; y
 R¹ es hidrógeno, alquilo C₁₋₃ sin sustituir o sustituido o heterociclilo sin sustituir o sustituido; o

25

(v) un compuesto de Fórmula (XII)



o una sal o un solvato o un estereoisómero del mismo; en la que R es NO₂ o NH₂.

30

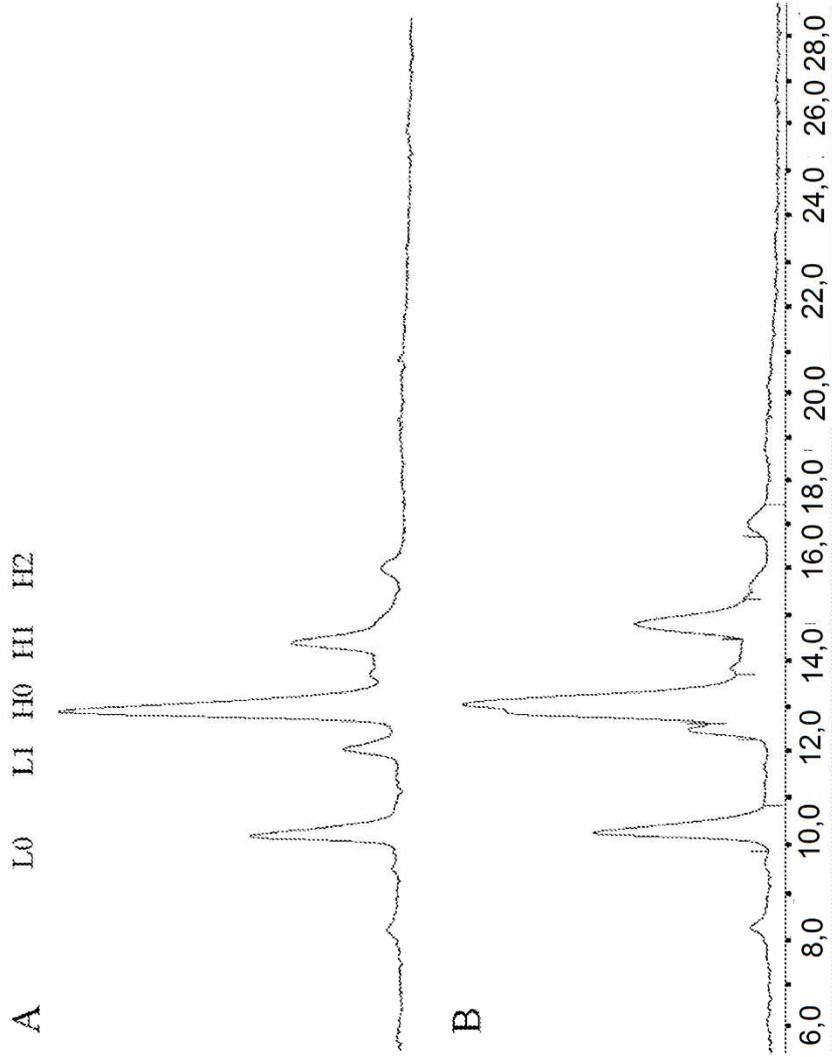


Figura 1

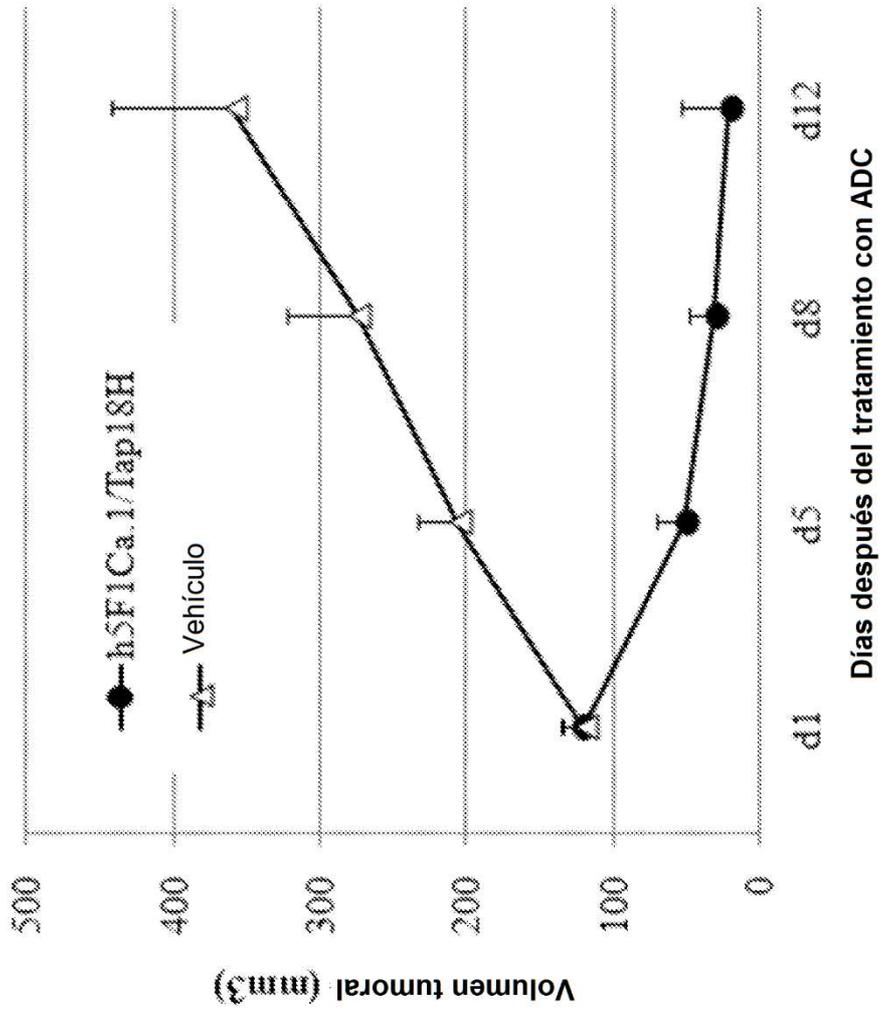


Figura 2

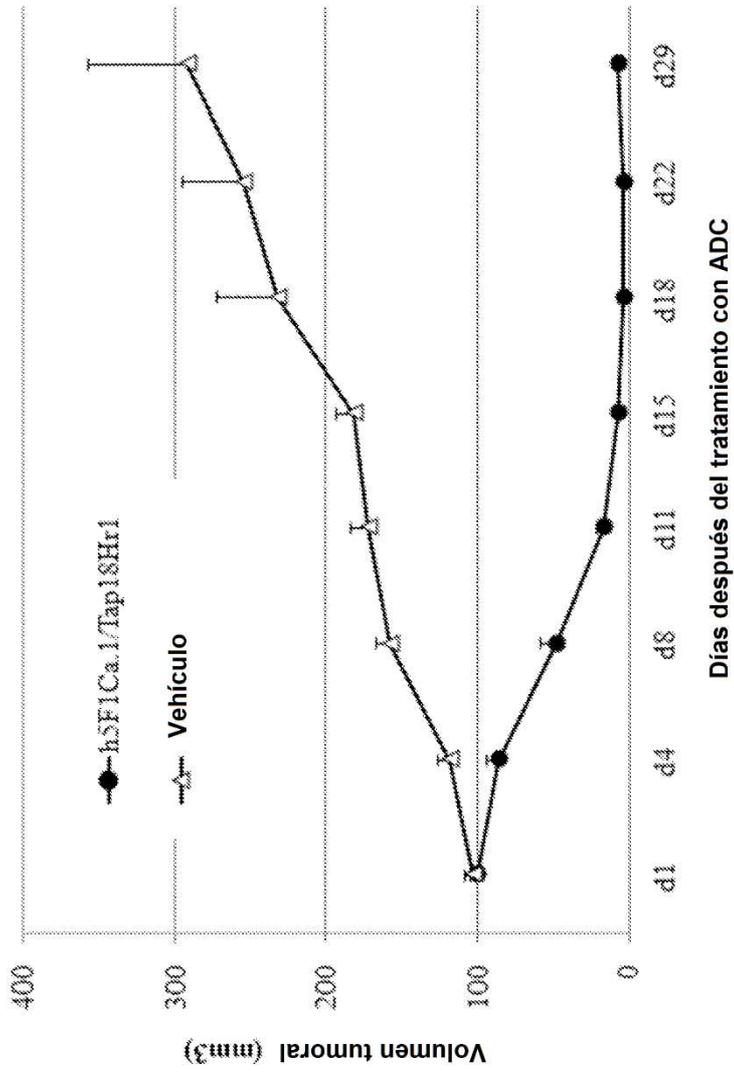


Figura 3

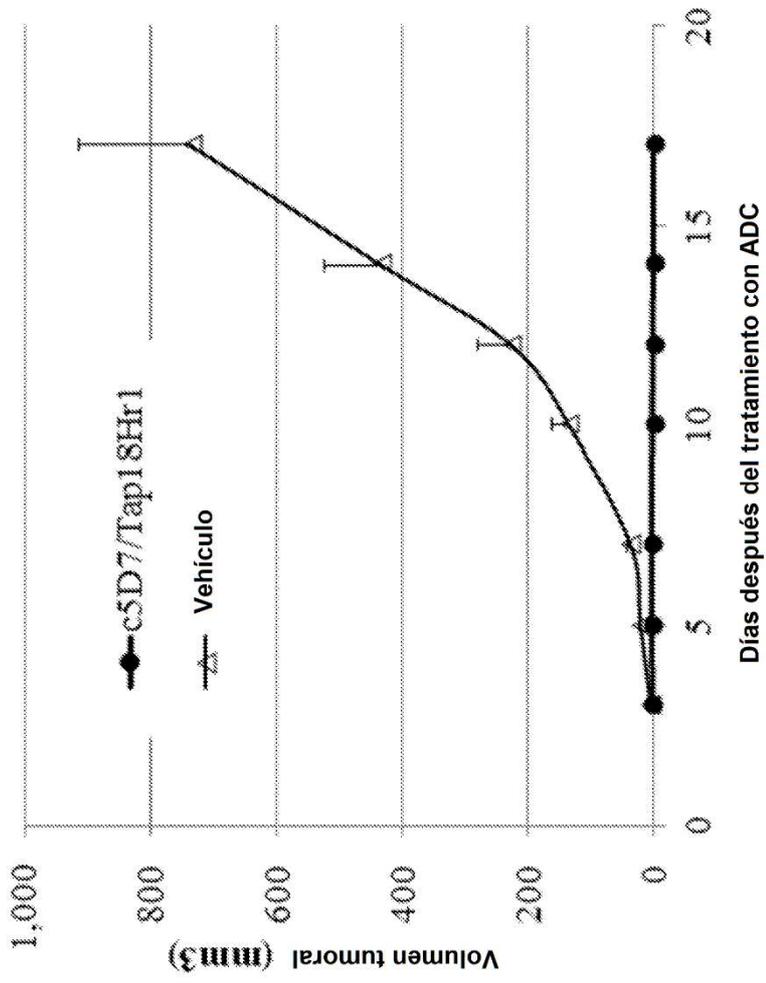


Figura 4

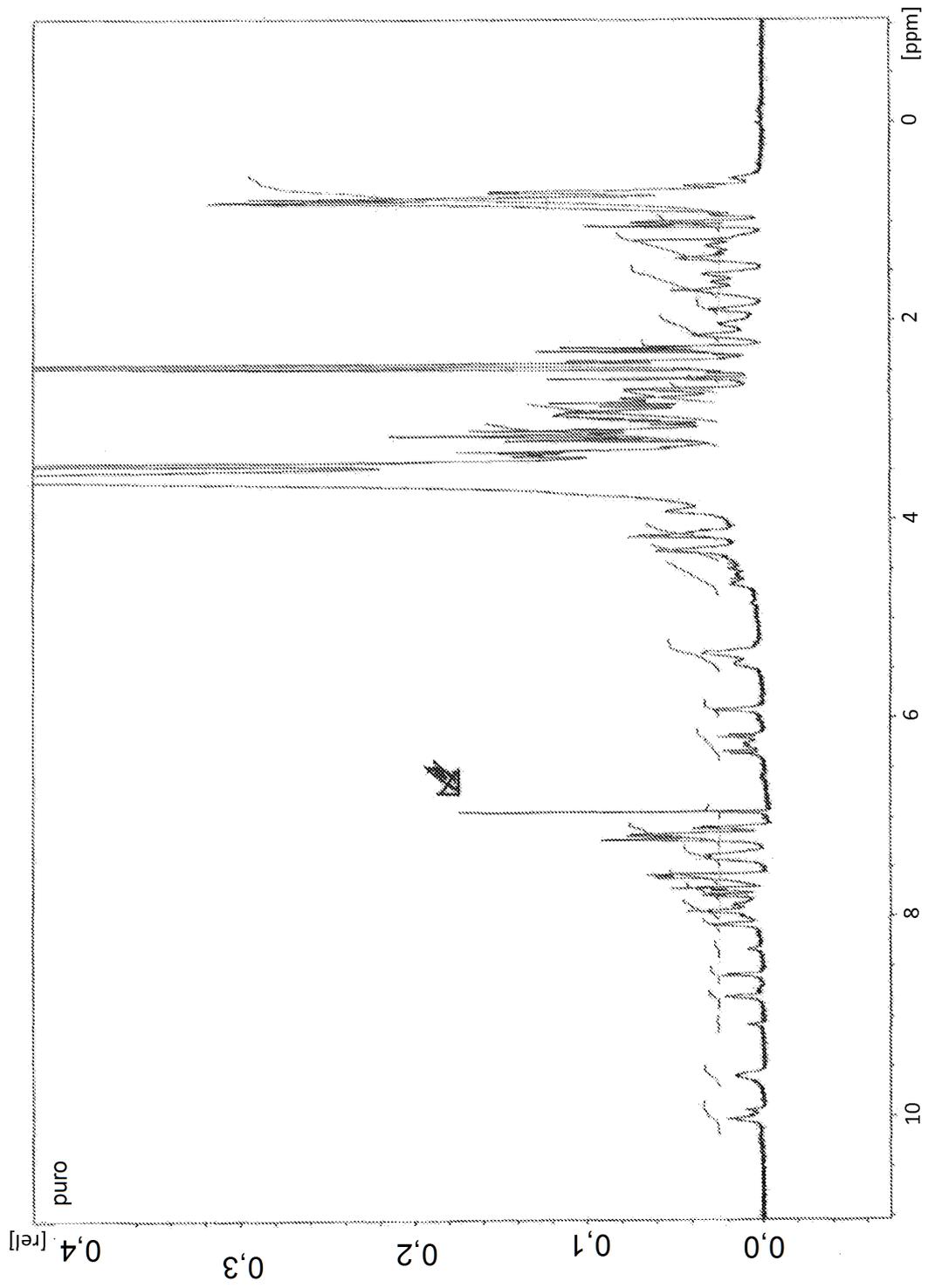


Figura 5

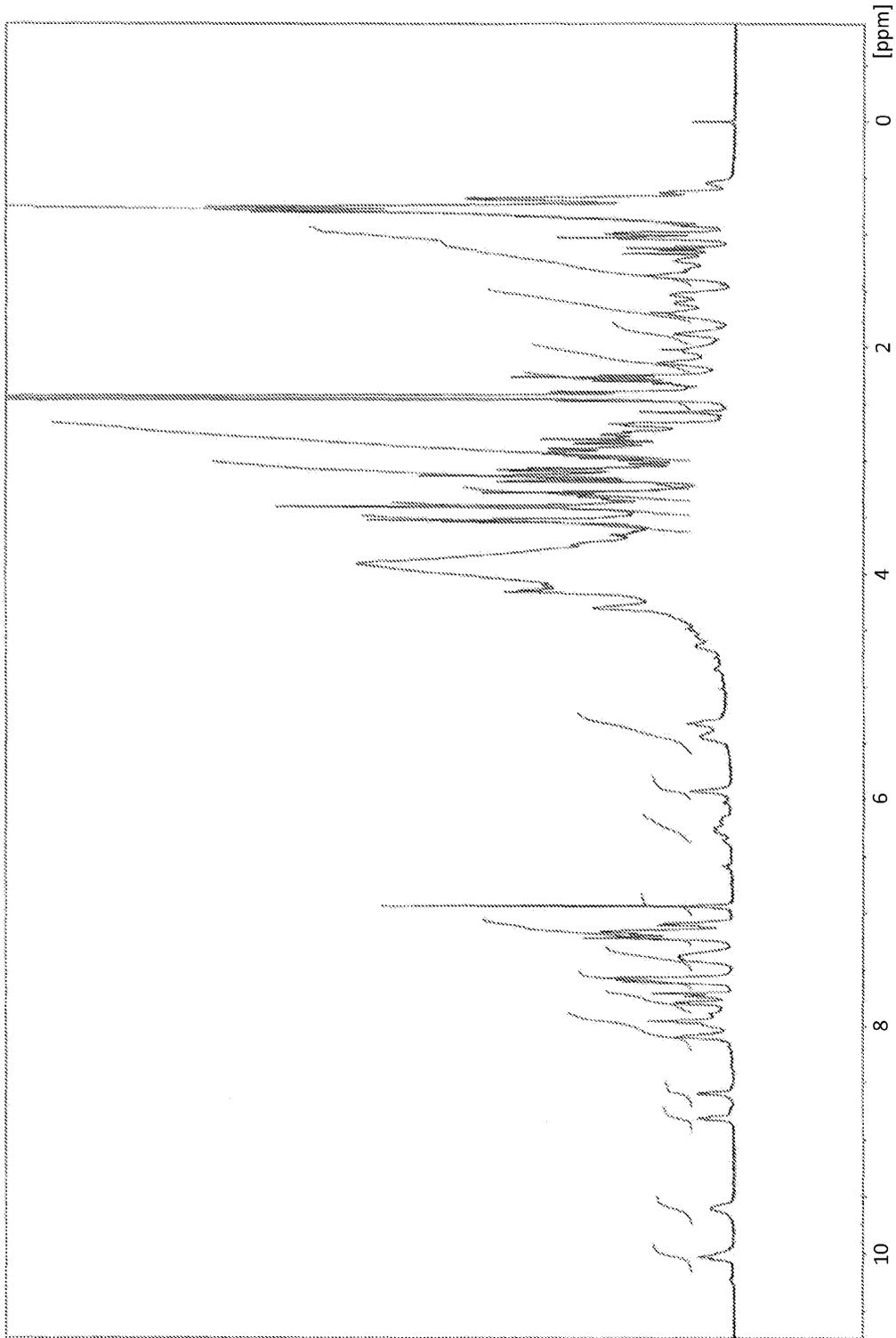


Figura 6

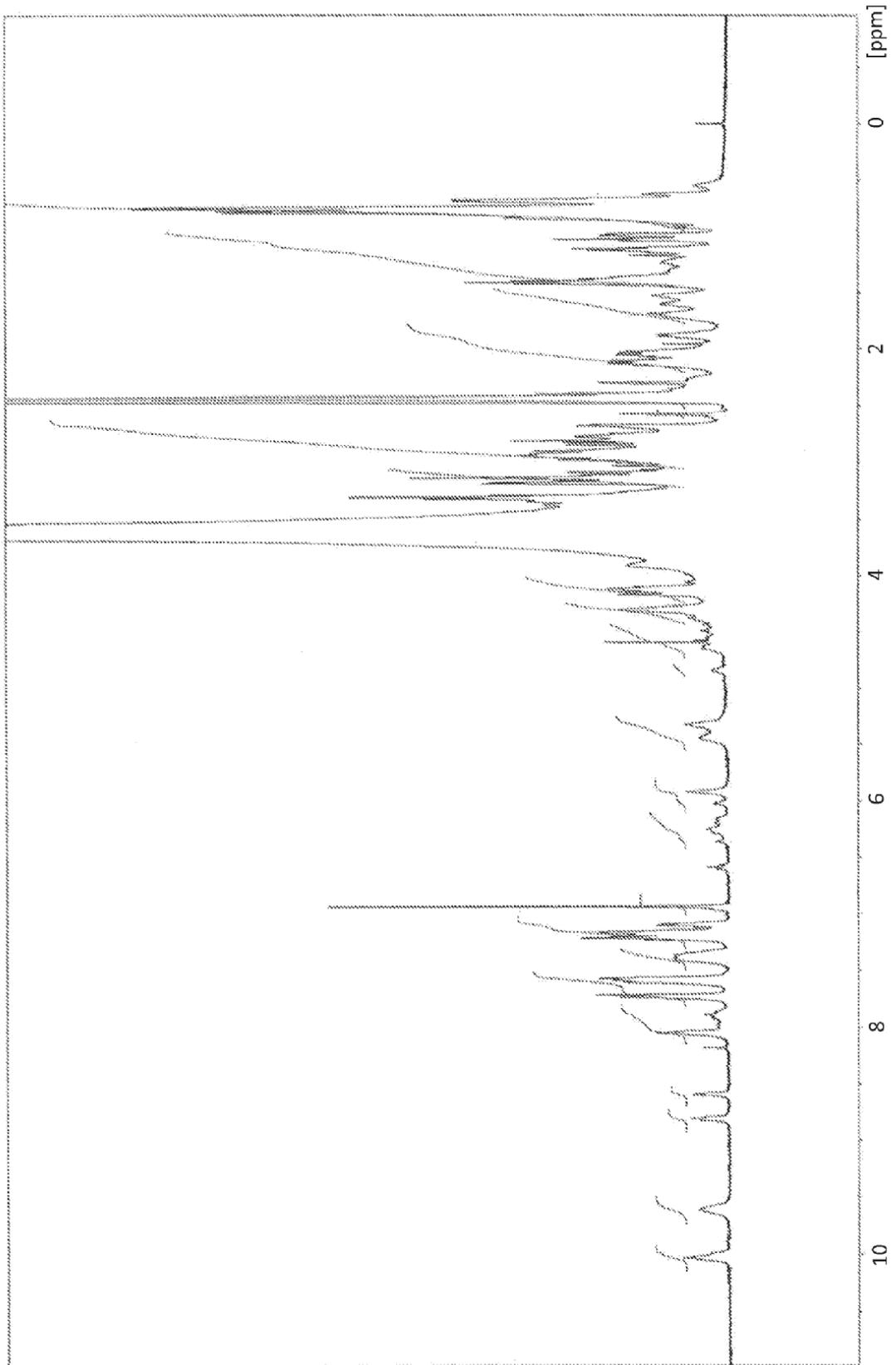


Figura 7