

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 310**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61K 47/65 (2007.01)
A61P 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07D 519/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2013 E 14191079 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2839860**

54 Título: **Pirrolobenzodiazepinas y conjugados de las mismas**

30 Prioridad:

12.10.2012 US 201261712928 P

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

21.01.2020

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park Cambridge
CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

HOWARD, PHILIP WILSON

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 738 310 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

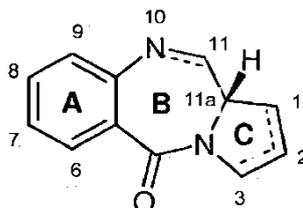
Pirrolobenzodiazepinas y conjugados de las mismas

- 5 La presente invención se refiere a pirrolobenzodiazepinas (PBD), en particular a pirrolobenzodiazepinas que tienen un grupo protector N10 lábil, en forma de un conector a un agente de unión a célula.

Antecedentes a la invención

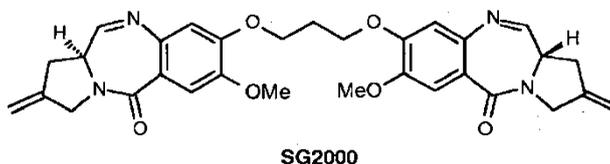
10 *Pirrolobenzodiazepinas*

Algunas pirrolobenzodiazepinas (PBD) tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferida es PuGPu. El primer antibiótico antitumoral de PBD, la antramicina, se descubrió en 1965 (Leimgruber y col., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber y col., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965)). Desde entonces, se ha informado de varias PBD que se producen naturalmente, y se han desarrollado más de 10 rutas de síntesis para varios análogos (Thurston y col., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994); Antonow, D. y Thurston, D.E., Chem. Rev. 2011 111 (4), 2815-2864). Miembros de la familia incluyen abeimicina (Hochlowski y col., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), chicamicina (Konishi y col., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (patente japonesa 58-180 487; Thurston y col., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose y col., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), mazetramicina (Kuminoto y col., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi y col., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa y col., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu y col., J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley y Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara y col., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh y col., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber y col., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima y col., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). Las PBD son de la estructura general:



Se diferencian en el número, tipo y posición de sustituyentes, en tanto sus anillos A aromáticos como anillos C de pirrolo, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay tanto una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) como un éter metílico de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11 que es el centro electrófilo responsable de alquilar ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición C11 quiral que les proporciona un giro hacia la derecha cuando se miran desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional apropiada para isohelicidad con el surco menor del ADN de forma B, conduciendo a un encaje ajustado en el sitio de unión (Kohn, en Antibiotics III. Springer-Verlag, Nueva York, pág. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Su capacidad para formar un aducto en el surco menor les permite interferir con el procesamiento de ADN, de ahí su uso como agentes antitumorales.

Un compuesto de pirrolobenzodiazepina particularmente ventajoso se describe por Gregson y col. (Chem. Commun. 1999, 797-798) como el compuesto **1**, y por Gregson y col. (J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174) como el compuesto **4a**. Este compuesto, también conocido como SG2000, se muestra a continuación:



45 El documento WO 2007/085930 describe la preparación de compuestos de PBD diméricos que tienen grupos conectores para la conexión a un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo. El conector está presente en el puente que une las unidades de PBD monoméricas del dímero.

Los presentes inventores han descrito compuestos de PBD diméricos que tienen grupos conectores para la conexión a un agente de unión a célula, tal como un anticuerpo, en el documento WO 2011/130598. El conector en estos compuestos está unido a una de las posiciones N10 disponibles, y se escinden generalmente por la acción de una enzima sobre el grupo conector.

Conjugados de anticuerpo-fármaco

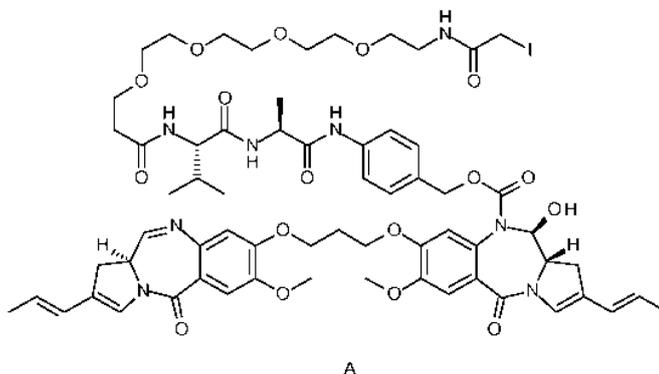
Se ha establecido la terapia con anticuerpos para el tratamiento dirigido de pacientes con cáncer, trastornos inmunológicos y angiogénicos (Carter, P. (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357). El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer, se dirige a la administración de los restos de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en su interior, mientras que la administración sistémica de estos agentes de fármaco no conjugados puede producir niveles inaceptables de toxicidad a células normales (Xie y col. (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun y col. (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121; Law y col. (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337; Wu y col. (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trail y col. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614).

Así se busca máxima eficacia con la mínima toxicidad. Los esfuerzos para diseñar y refinar ADC se han basado en la selectividad de anticuerpos monoclonales (mAb), además del mecanismo de acción del fármaco, enlace del fármaco, relación de fármaco/anticuerpo (carga) y propiedades de liberación de fármaco (Junutula y col., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Dornan y col. (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; documentos US 7521541; US 7723485; WO2009/052249; McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.* 19(7): 299-307; Doronina y col. (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124; Erickson y col. (2006) *Cancer Res.* 66(8):1-8; Sanderson y col. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843-852; Jeffrey y col. (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358; Hamblett y col. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070). Los restos de fármaco pueden conferir sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN, inhibición de proteasoma y/o topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos de receptores de proteína.

Los presentes inventores han desarrollado dímeros de PBD particulares con grupos de enlace para la formación de conjugados de PBD con agentes de unión a célula, y en particular conjugados de PBD de anticuerpo.

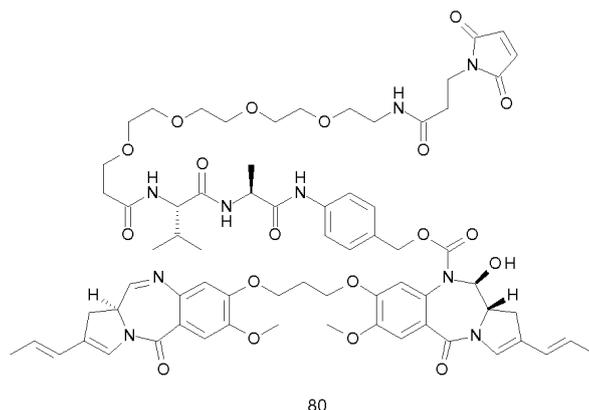
Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona el compuesto A:



y sales o solvatos del mismo.

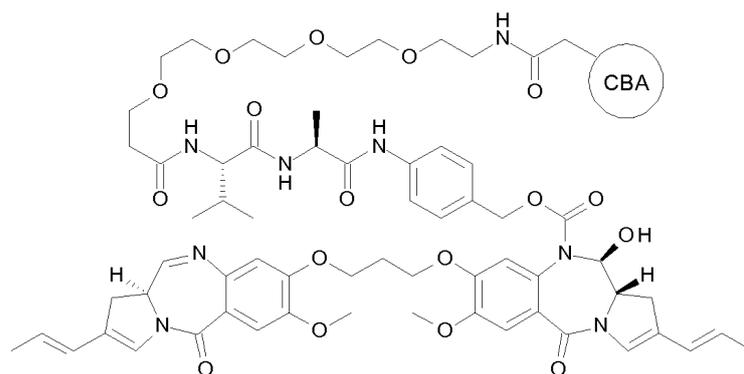
El documento WO2011/130598 divulga el compuesto 80:



El compuesto A se diferencia de este por que comprende un grupo yodoacetamida para unirse al agente de unión a células. Este grupo puede ofrecer ventajas frente al compuesto 80 respecto de su estabilidad cuando está unido a un agente de unión a células (véase más adelante). El grupo maleimida en el compuesto 80 puede sufrir una reacción de retro-Michael, desconjugándose del agente de unión a células y por lo tanto, volviéndose vulnerable a la depuración por otras moléculas biológicas que contienen tiol, tales como albúmina y glutatión. Dicha desconjugación no puede producirse con el compuesto A. Asimismo, el grupo yodoacetamida puede evitar otras reacciones secundarias no deseadas.

El compuesto A tiene dos centros sp^2 en cada anillo C, que pueden permitir unión más fuerte en el surco menor del ADN, que para compuestos con solo un centro sp^2 en cada anillo C.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un conjugado de fórmula ConjA:



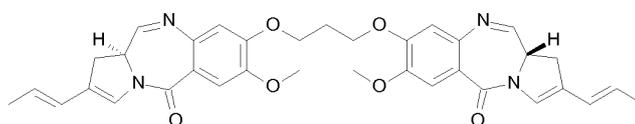
ConjA

en la que CBA representa una agente de unión a célula. El enlace al resto mostrado es mediante un S libre (tiol activo) sobre el agente de unión a célula.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un dímero de PBD con un conector conectado mediante la posición N10 sobre uno de los restos de PBD adecuados para formar un dímero de PBD conjugado mediante el conector a un agente de unión a célula.

La presente invención es adecuada para su uso en proporcionar un compuesto de PBD a un sitio preferido en un sujeto. El conjugado permite la liberación de un compuesto de PBD activo que no retiene ninguna parte del conector. No hay ninguna punta presente que pudiera afectar la reactividad del compuesto de PBD. Así, ConjA liberaría el compuesto RelB:



RelA

El enlace especificado entre el dímero de PBD y el agente de unión a célula, por ejemplo, anticuerpo, en la presente invención es preferentemente estable extracelularmente. Antes del transporte o administración en una célula, el conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) es preferentemente estable y sigue intacto, es decir, el anticuerpo sigue ligado al resto de fármaco. Los conectores son estables fuera de la célula diana y pueden escindirse a alguna tasa eficaz dentro de la célula. Un conector eficaz: (i) mantendrá las propiedades de unión específica del anticuerpo; (ii) permitirá la administración intracelular del conjugado o resto de fármaco; (iii) seguirá siendo estable e intacto, es decir, no se escindirá, hasta que el conjugado se haya administrado o transportado a su sitio elegido como diana; y (iv) mantendrá un efecto citotóxico destructor de células o un efecto citostático del resto de fármaco de PBD. La estabilidad del ADC puede medirse por técnicas analíticas convencionales tales como espectroscopía de masas, HPLC y la técnica de separación/análisis EM/CL.

La administración de los compuestos de las fórmulas RelA se logra en el sitio de activación deseado de los conjugados de las fórmulas ConjA por la acción de una enzima, tal como catepsina, en el grupo de enlace, y en particular en el resto de dipéptido de valina-alanina.

Agente de unión a célula

Una agente de unión a célula puede ser de cualquier tipo e incluir péptidos y no péptidos. Éstos pueden incluir anticuerpos o un fragmento de un anticuerpo que contiene al menos un sitio de unión, linfocinas, hormonas, miméticos de hormonas, vitaminas, factores de crecimiento, moléculas de transporte de nutrientes, o cualquier otra molécula de unión a célula o sustancia.

Péptidos

En una realización, el agente de unión a célula es un péptido lineal o cíclico que comprende 4-30, preferentemente 6-20, restos de aminoácidos contiguos. En esta realización, se prefiere que un agente de unión a célula esté ligado a un compuesto de pirrolobenzodiazepina monomérico o dimérico.

En una realización, el agente de unión a célula comprende un péptido que se une a integrina $\alpha_v\beta_6$. El péptido puede ser selectivo para $\alpha_v\beta_6$ con respecto a $\alpha_X\beta_Y$.

En una realización, el agente de unión a célula comprende el polipéptido A20FMDV-Cys. A20FMDV-Cys tiene la secuencia: NAVPNLRGDLQVLAQKVARTC. Alternativamente, puede usarse una variante de la secuencia de A20FMDV-Cys en la que uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez restos de aminoácidos están sustituidos con otro resto de aminoácido. Además, el polipéptido puede tener la secuencia NAVXXXXXXXXXXXXXXXXXRTC.

Anticuerpos

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (Miller y col. (2003) *Jour. of Immunology* 170:4854-4861). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos, o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que puede reconocer y unirse a un antígeno específico (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5ª ed., Garland Publishing, New York). Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también denominados epítopes, reconocidos por CDR sobre múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítope diferente tiene una estructura diferente. Así, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión al antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte del mismo, incluyendo tales dianas, pero no se limitan a, célula cancerosa o células que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados a una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden derivarse de cualquier especie, que incluye origen humano, murino o de conejo.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y scFv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión al epítope de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse sin contaminar por otros anticuerpos. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) *Nature* 256:495, o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase el documento US 4816567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson y col. (1991) *Nature*, 352:624-628; Marks y col. (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, o de ratones transgénicos que llevan un sistema de inmunoglobulina completamente humana (Lonberg (2008) *Curr. Opinion*

20(4):450-459).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada (documento US 4816567; y Morrison y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión al antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo o simio superior) y secuencias de la región constante humanas.

Un “anticuerpo intacto” en el presente documento es uno que comprende un dominio VL y VH, además de un dominio constante de la cadena ligera (CL) y dominios constantes de la cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de la secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de la secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos de la misma. El anticuerpo intacto puede tener una o más “funciones efectoras”, que se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia nativa o región Fc variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; y regulación por disminución de receptores de la superficie celular tales como receptor de linfocitos B y BCR.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, pueden asignarse anticuerpos intactos a diferentes “clases”. Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en “subclases” (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que se corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas.

Humanización

Las técnicas para reducir la inmunogenicidad *in vivo* de un anticuerpo no humano o fragmento de anticuerpo incluyen las denominadas “humanización”.

Un “anticuerpo humanizado” se refiere a un polipéptido que comprende al menos una porción de una región variable modificada de un anticuerpo humano en el que una porción de la región variable, preferentemente una porción sustancialmente inferior al dominio variable humano intacto, se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana y en la que la región variable modificada está unida a al menos otra parte de otra proteína, preferentemente la región constante de un anticuerpo humano. La expresión “anticuerpos humanizados” incluye anticuerpos humanos en los que uno o más restos de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (“CDR”) y/o uno o más restos de aminoácidos de la región estructural (“FW” o “FR”) están sustituidos por restos de aminoácidos de sitios análogos en roedores u otros anticuerpos no humanos. La expresión “anticuerpo humanizado” también incluye una variante de la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende una FR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana.

Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. O, visto de otra forma, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo humano que también contiene secuencias seleccionadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) en lugar de las secuencias humanas. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones de aminoácidos conservativas o restos no naturales de las mismas especies o de especies diferentes que no alteran significativamente su unión y/o actividad biológica. Tales anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas.

Hay varias técnicas de humanización, que incluyen 'injerto de CD', 'selección guiada', 'desinmunización', 'acondicionamiento superficial' (también conocida como 'inactivación'), 'anticuerpos compuestos', 'optimización de contenidos de la cadena humana' y barajado de regiones estructurales.

Injerto de CDR

En esta técnica, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo del receptor están sustituidos por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo del donante) tal como ratón, rata, camello, bovino, cabra o conejo que tiene las propiedades deseadas (de hecho, las CDR no humanas están 'inertadas' sobre la región estructural humana). En algunos casos, los restos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana

están sustituidos por restos no humanos correspondientes (esto puede ocurrir cuando, por ejemplo, un resto de FR particular tiene efecto significativo sobre la unión al antígeno).

5 Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que ni se encuentran en el anticuerpo del receptor ni en las CDR importadas o secuencias de la región estructural. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente y maximizar el rendimiento del anticuerpo. Así, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá todos de al menos uno, y en un aspecto dos, dominios variables, en los que todos o todos los bucles hipervariables se corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá
10 opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), o aquella de una inmunoglobulina humana.

Selección guiada

15 El procedimiento consiste en combinar el dominio V_H o V_L de un anticuerpo no humano dado específico para un epítipo particular con una biblioteca de V_H o V_L humana y los dominios V humanos específicos se seleccionan contra el antígeno de interés. Este V_H humano seleccionado se combina entonces con una biblioteca de V_L para generar una combinación de $V_H \times V_L$ completamente humana. El procedimiento se describe en Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899-903.

20 Anticuerpos compuestos

En este procedimiento, dos o más segmentos de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano se combinan dentro de la molécula de anticuerpo final. Se construyen combinando múltiples segmentos de la secuencia de V_H y V_L humana en combinaciones que limitan o evitan los epítopes de linfocitos T humanos en las regiones V de anticuerpos compuestos finales. Si se requiere, los epítopes de linfocitos T se limitan o evitan intercambiando segmentos de las regiones V que contribuyen a o que codifican un epítipo de linfocitos T con segmentos alternativos que evitan epítopes de linfocitos T. Este procedimiento se describe en el documento US 2008/0206239 A1.

30 Desinmunización

Este procedimiento implica la eliminación de epítopes de linfocitos T humanos (u otra segunda especie) de las regiones V del anticuerpo terapéutico (u otra molécula). La secuencia de las regiones V de anticuerpos terapéuticos se analiza para la presencia de motivos de unión al MHC de clase II por, por ejemplo, comparación con bases de datos de motivos de unión al MHC (tales como la base de datos de "motivos" alojada en www.wehi.edu.au). Alternativamente, los motivos de unión al MHC de clase II pueden identificarse usando procedimientos de plegamiento computacional tales como aquellos ideados por Altuvia y col. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); en estos procedimientos, péptidos de solapamiento consecutivos de las secuencias de las regiones V están probándose para sus energías de unión a proteínas del MHC de clase II. Estos datos pueden entonces combinarse con información sobre otras características de secuencias que se refieren a péptidos satisfactoriamente presentados, tales como anfipaticidad, motivos de Rothbard y sitios de escisión para cathepsina B y otras enzimas de procesamiento.

45 Una vez se han identificado posibles epítopes de linfocitos T de segundas especies (por ejemplo, humana), se eliminan por la alteración de uno o más aminoácidos. Los aminoácidos modificados están normalmente dentro del propio epítipo del linfocito T, pero también pueden estar adyacentes al epítipo en términos de la estructura primaria o secundaria de la proteína (y, por tanto, pueden no estar adyacentes en la estructura primaria). Lo más normalmente, la alteración es a modo de sustitución pero, en algunas circunstancias, será más apropiada la adición o delección de aminoácidos.

50 Todas las alteraciones pueden llevarse a cabo por tecnología de ADN recombinante, de manera que la molécula final pueda prepararse por expresión de un huésped recombinante usando procedimientos bien establecidos tales como mutagénesis dirigida al sitio. Sin embargo, también es posible el uso de química de proteínas o cualquier otro medio de alteración molecular.

Acondicionamiento superficial

60 Este procedimiento implica:

(a) determinar la estructura conformacional de la región variable del anticuerpo no humano (por ejemplo, roedor) (o fragmento del mismo) construyendo un modelo tridimensional de la región variable del anticuerpo no humano;

(b) generar alineamientos de secuencias usando distribuciones de relativa accesibilidad a partir de estructuras cristalográficas de rayos X de un número suficiente de cadenas pesadas y ligeras de las regiones variables de anticuerpos no humanos y humanos para dar un conjunto de posiciones de las regiones estructurales de las cadenas pesadas y ligeras en las que las posiciones de alineamiento son idénticas en el 98 % del número

suficiente de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos no humanos;

(c) definir para el anticuerpo no humano que va a humanizarse un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las cadenas pesadas y ligeras usando el conjunto de posiciones de la región estructural generadas en la etapa (b);

5 (d) identificar a partir de las secuencias de aminoácidos de anticuerpo humano un conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las cadenas pesadas y ligeras que es lo más estrechamente idéntico al conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie definidos en la etapa (c), en el que la cadena pesada y ligera del anticuerpo humano están o no están naturalmente apareadas;

10 (e) sustituir, en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo no humano que va a humanizarse, el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las cadenas pesadas y ligeras definido en la etapa (c) con el conjunto de restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las cadenas pesadas y ligeras identificado en la etapa (d);

(f) construir un modelo tridimensional de la región variable del anticuerpo no humano resultante de la sustitución especificada en la etapa (e);

15 (g) identificar, comparando los modelos tridimensionales construidos en las etapas (a) y (f), cualquier resto de aminoácido de los conjuntos identificados en las etapas (c) o (d), que están dentro de 5 Angstroms de cualquier átomo de cualquier resto de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo no humano que va a humanizarse; y

20 (h) cambiar cualquier resto identificado en la etapa (g) del resto de aminoácido no humano original para así definir un conjunto humanizante de anticuerpos no humanos de restos de aminoácidos expuestos en la superficie; con la condición de que la etapa (a) no necesita realizarse primero, pero debe realizarse antes de etapa (g).

Superhumanización

25 El procedimiento compara la secuencia no humana con el repertorio de genes de la línea germinal humana funcional. Se seleccionan aquellos genes humanos que codifican estructuras canónicas idénticas o estrechamente relacionadas con las secuencias no humanas. Se eligen aquellos genes humanos seleccionados con la mayor homología dentro de las CDR como donantes de FR. Finalmente, las CDR no humanas se injertan sobre estas FR humanas. Este procedimiento se describe en la patente WO 2005/079479 A2.

Optimización de contenidos de la cadena humana

35 Este procedimiento compara la secuencia no humana (por ejemplo, de ratón) con el repertorio de genes de la línea germinal humana y las diferencias se puntúan como contenido de la cadena humana (HSC) que cuantifica una secuencia al nivel de posibles epítopes de MHC/linfocitos T. A continuación, la secuencia diana se humaniza maximizando su HSC en vez de usando una medida de identidad global para generar múltiples variantes humanizadas diversas (descritas en Molecular Immunology, 44, (2007) 1986-1998).

Barajado de regiones estructurales

40 Las CDR del anticuerpo no humano están fusionadas en marco con conjuntos de ADNc que engloban todas las regiones estructurales de genes de la línea germinal humana de cadenas pesadas y ligeras conocidas. A continuación, los anticuerpos humanizados se seleccionan, por ejemplo, por inmunopurificación de la biblioteca de anticuerpos expresados en fago. Esto se describe en Methods 36, 43-60 (2005).

Ejemplos de agentes de unión a célula incluyen aquellos agentes descritos para su uso en el documento WO 2007/085930.

50 A continuación se enumeran antígenos asociados a tumor y anticuerpos relacionados para su uso en realizaciones de la presente invención.

ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMOR Y ANTICUERPOS RELACIONADOS

55 **(1) *BMPR1B* (receptor de la proteína morfogenética ósea tipo 1B)**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_001203

60 Versión de Genbank nº NM_001203.2 GI:169790809

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:06 PM

Polipéptido

65 Nº de acceso de GenBank NP_001194

Versión de Genbank nº NP_001194.1 GI:4502431

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:06 PM

Referencias cruzadas

- 5 Ten Dijke, P. y col., Science 264 (5155): 101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997); documentos WO2004/063362 (reivindicación 2); WO2003/042661 (reivindicación 12); US2003/134790-A1 (página 38-39); WO2002/102235 (reivindicación 13; página 296); WO2003/055443 (página 91-92); WO2002/99122 (Ejemplo 2; página 528-530); WO2003/029421 (reivindicación 6); WO2003/024392 (reivindicación 2; Fig. 112); WO2002/98358 (reivindicación 1; página 183); WO2002/54940 (página 100-101); WO2002/59377 (página 349-350); WO2002/30268 (reivindicación 27; página 376); WO2001/48204 (Ejemplo; Fig. 4); NP_001194 receptor de la proteína morfogenética ósea, tipo 1B /pid=NP_001194.1.; MIM:603248; AY065994

(2) E16 (LAT1, SLC7A5)

15 Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_003486
 Versión de Genbank nº NM_003486.5 GI:71979931
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:06 PM

20

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_003477
 Versión de Genbank nº NP_003477.4 GI:71979932
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:06 PM

25

Referencias cruzadas

- 30 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255 (2), 283-288 (1999), *Nature* 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W. y col (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (16):11267-11273; documentos WO2004/048938 (Ejemplo 2); WO2004/032842 (Ejemplo IV); WO2003/042661 (reivindicación 12); WO2003/016475 (reivindicación 1); WO2002/78524 (Ejemplo 2); WO2002/99074 (reivindicación 19; página 127-129); WO2002/86443 (reivindicación 27; páginas 222, 393); WO2003/003906 (reivindicación 10; página 293); WO2002/64798 (reivindicación 33; página 93-95); WO2000/14228 (reivindicación 5; página 133-136); US2003/224454 (Fig. 3); WO2003/025138 (reivindicación 12; página 150); NP_003477 familia 7 de transportadores de solutos (transportador de aminoácidos catiónicos, y+system), miembro 5 /pid=NP_003477.3 - Homo sapiens; MIM:600182; NM_015923.

35

(3) STEAP1 (antígeno epitelial de seis transmembrana de la próstata)

40 Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_012449
 Versión de Genbank nº NM_012449.2 GI:22027487
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 9 de septiembre de 2012 02:57 PM

45

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_036581
 Versión de Genbank nº NP_036581.1 GI:9558759
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 9 de septiembre de 2012 02:57 PM

50

Referencias cruzadas

- 55 *Cancer Res.* 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S. y col. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (25):14523-14528; documentos WO2004/065577 (reivindicación 6); WO2004/027049 (Fig. 11); EP1394274 (Ejemplo 11); WO2004/016225 (reivindicación 2); WO2003/042661 (reivindicación 12); US2003/157089 (Ejemplo 5); US2003/185830 (Ejemplo 5); US2003/064397 (Fig. 2); WO2002/89747 (Ejemplo 5; página 618-619); WO2003/022995 (Ejemplo 9; Fig. 13A, Ejemplo 53; página 173, Ejemplo 2; Fig. 2A); antígeno epitelial de seis transmembrana de la próstata; MIM:604415.

60

(4) 0772P (CA125, MUC16)

Nucleótido

65 Nº de acceso de GenBank AF361486
 Versión de Genbank nº AF361486.3 GI:34501466

Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 07:56 AM

Polipéptido

5 N° de acceso de GenBank AAK74120
Versión de Genbank n° AAK74120.3 GI:34501467
Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 07:56 AM

Referencias cruzadas

10 J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); documentos WO2004/045553 (reivindicación 14); WO2002/92836 (reivindicación 6; Fig. 12); WO2002/83866 (reivindicación 15; página 116-121); US2003/124140 (Ejemplo 16); GI:34501467;

15 **(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina)**

Nucleótido

N° de acceso de GenBank NM_005823
20 Versión de Genbank n° NM_005823.5 GI:293651528
Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:47 PM

Polipéptido

25 N° de acceso de GenBank NP_005814 4
Versión de Genbank n° NP_005814.2 GI:53988378
Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:47 PM

Referencias cruzadas

30 Yamaguchi, N. y col., Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995); documentos WO2003/101283 (reivindicación 14); WO2002/102235 (reivindicación 13; página 287-288); WO2002/101075 (reivindicación 4; página 308-309); WO2002/71928 (página 320-321); WO94/10312 (página 52-57); IM:601051.

35 **(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIB, SLC34A2, familia 34 de transportadores de solutos (fosfato de sodio), miembro 2, transportador 3b de fosfato dependiente de sodio tipo II)**

40 Nucleótido

N° de acceso de GenBank NM_006424
Versión de Genbank n° NM_006424.2 GI:110611905
Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 03:39 PM

45 Polipéptido

N° de acceso de GenBank NP_006415
Versión de Genbank n° NP_006415.2 GI:110611906

50 Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 03:39 PM

Referencias cruzadas

55 J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A. y col. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582); documentos WO2004/022778 (reivindicación 2); EP1394274 (Ejemplo 11); WO2002/102235 (reivindicación 13; página 326); EP0875569 (reivindicación 1; página 17-19); WO2001/57188 (reivindicación 20; página 329); WO2004/032842 (Ejemplo IV); WO2001/75177 (reivindicación 24; página 139-140); MIM:604217.

60 **(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, semaforina 5b Hlog, dominio sema, siete repeticiones de trombospondina (tipo 1 y similares a tipo 1), dominio transmembrana (TM) y dominio citoplásmico corto, (semaforina) 5B)**

Nucleótido

65 N° de acceso de GenBank AB040878

Versión de Genbank nº AB040878.1 GI:7959148
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de agosto de 2006 05:40 PM

Polipéptido

5 N° de acceso de GenBank BAA95969
 Versión de Genbank nº BAA95969.1 GI:7959149
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de agosto de 2006 05:40 PM

10 Referencias cruzadas

15 Nagase T. y col. (2000) DNA Res. 7 (2):143-150; documentos WO2004/000997 (reivindicación 1); WO2003/003984 (reivindicación 1); WO2002/06339 (reivindicación 1; página 50); WO2001/88133 (reivindicación 1; página 41-43, 48-58); WO2003/054152 (reivindicación 20); WO2003/101400 (reivindicación 11); acceso: 30 Q9P283; Genew; HGNC:10737

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, ADNc de RIKEN 2700050C12, ADNc de RIKEN gen 2700050C12)

Nucleótido

20 N° de acceso de GenBank AY358628
 Versión de Genbank nº AY358628.1 GI:37182377
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de diciembre de 2009 04:15 AM

25 Polipéptido

N° de acceso de GenBank AAQ88991
 Versión de Genbank nº AAQ88991.1 GI:37182378
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de diciembre de 2009 04:15 AM

30 Referencias cruzadas

35 Ross y col. (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; documentos US2003/129192 (reivindicación 2); US2004/044180 (reivindicación 12); US2004/044179 35 (reivindicación 11); US2003/096961 (reivindicación 11); US2003/232056 (Ejemplo 5); WO2003/105758 16 (reivindicación 12); US2003/206918 (Ejemplo 5); EP1347046 (reivindicación 1); WO2003/025148 (reivindicación 20); GI:37182378.

(9) ETBR (*receptor tipo B de endotelina*)

40 Nucleótido

N° de acceso de GenBank AY275463
 Versión de Genbank nº AY275463.1 GI:30526094
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 02:26 AM

45 Polipéptido

50 N° de acceso de GenBank AAP32295
 Versión de Genbank nº AAP32295.1 GI:30526095
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 02:26 AM

Referencias cruzadas

55 Nakamuta M. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H. y col., Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H. y col., J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshorabagy N.A. y col., J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B. y col., J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M. y col., Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C. y col., J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y. y col., Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B. y col., Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W. y col., Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G. y col., Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T. y col., Hum. Mol. Genet. 4, 2407-15 2409, 1995; Auricchio A. y col., Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J. y col., Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W. y col., Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J. y col., Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S. y col., Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V. y col. (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; documentos WO2004/045516 (reivindicación 1); WO2004/048938 (Ejemplo 2); WO2004/040000 (reivindicación 151); WO2003/087768 (reivindicación 1); WO2003/016475

(reivindicación 1); WO2003/016475 (reivindicación 1); WO2002/61087 (Fig. 1); WO2003/016494 (Fig. 6); WO2003/025138 (reivindicación 12; página 144); WO2001/98351 (reivindicación 1; página 124-125); EP0522868 (reivindicación 8; Fig. 2); WO2001/77172 (reivindicación 1; página 297-299); US2003/109676; US6518404 (Fig. 3); US5773223 (reivindicación 1a; Col 31-34); WO2004/001004.

5
(10) MSG783 (RNF124, proteína hipotética FLJ20315)

Nucleótido

10 N° de acceso de GenBank NM_017763
 Versión de Genbank nº NM_017763.4 GI:167830482
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 12:34 AM

Polipéptido

15 N° de acceso de GenBank NP_060233
 Versión de Genbank nº NP_060233.3 GI:56711322
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 12:34 AM

20 Referencias cruzadas

Documentos WO2003/104275 (reivindicación 1); WO2004/046342 (Ejemplo 2); WO2003/042661 (reivindicación 12); WO2003/083074 (reivindicación 14; página 61); WO2003/018621 (reivindicación 1); WO2003/024392 (reivindicación 2; Fig. 93); WO2001/66689 (Ejemplo 6); ID de locus: 54894.

25
(11) *STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, gen 1 asociado al cáncer de próstata, proteína 1 asociada al cáncer de próstata, antígeno epitelial de seis transmembrana de próstata 2, proteína de próstata de seis transmembrana)*

30 Nucleótido

N° de acceso de GenBank AF455138
 Versión de Genbank nº AF455138.1 GI:22655487
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:54 AM

35 Polipéptido

N° de acceso de GenBank AAN04080
 Versión de Genbank nº AAN04080.1 GI:22655488
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:54 AM

Referencias cruzadas

45 Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002); documentos WO2003/087306; US2003/064397 (reivindicación 1; Fig. 1); WO2002/72596 (reivindicación 13; página 54-55); WO2001/72962 (reivindicación 1; Fig. 4B); WO2003/104270 (reivindicación 11); WO2003/104270 (reivindicación 16); US2004/005598 (reivindicación 22); WO2003/042661 (reivindicación 12); US2003/060612 (reivindicación 12; Fig. 10); WO2002/26822 (reivindicación 23; Fig. 2); WO2002/16429 (reivindicación 12; Fig. 10); GI:22655488.

50 **(12)** *TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, canales catiónicos de potencial de receptores transitorios, subfamilia M, miembro 4)*

Nucleótido

55 N° de acceso de GenBank NM_017636
 Versión de Genbank nº NM_017636.3 GI:304766649
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de junio de 2012 11:27 AM

Polipéptido

60 N° de acceso de GenBank NP_060106
 Versión de Genbank nº NP_060106.2 GI:21314671
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de junio de 2012 11:27 AM

65

Referencias cruzadas

Xu, X.Z. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003); documentos US2003/143557 (reivindicación 4); WO2000/40614 (reivindicación 14; página 100-103); WO2002/10382 (reivindicación 1; Fig. 9A); WO2003/042661 (reivindicación 12); WO2002/30268 (reivindicación 27; página 391); US2003/219806 (reivindicación 4); WO2001/62794 (reivindicación 10 14; Fig. 1A-D); MIM:606936.

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma)

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_003212

Versión de Genbank nº NM_003212.3 GI:292494881

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:27 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_003203

Versión de Genbank nº NP_003203.1 GI:4507425

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:27 PM

Referencias cruzadas

Ciccodicola, A. y col., EMBO J. 8 (7):1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991); documentos US2003/224411 (reivindicación 1); WO2003/083041 (Ejemplo 1); WO2003/034984 (reivindicación 12); WO2002/88170 (reivindicación 2; página 52-53); WO2003/024392 (reivindicación 2; Fig. 58); WO2002/16413 (reivindicación 1; página 94-95, 105); WO2002/22808 (reivindicación 2; Fig. 1); US5854399 (Ejemplo 2; Col 17-18); US5792616 (Fig. 2); MIM:187395.

(14) CD21 (CR2 (receptor del complemento 2) o C3DR (C3d/receptor de virus de Epstein Barr) o Hs. 73792)

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank M26004

Versión de Genbank nº M26004.1 GI:181939

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAA35786

Versión de Genbank nº AAA35786.1 GI:181940

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Referencias cruzadas

Fujisaku y col. (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125; Weis J.J. y col., J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 9194-9198, 1987; Barel M. y col., Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K. y col. (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; documentos WO2004/045520 (Ejemplo 4); US2004/005538 (Ejemplo 1); WO2003/062401 (reivindicación 9); WO2004/045520 (Ejemplo 4); WO91/02536 (Fig. 9.1-9.9); WO2004/020595 (reivindicación 1); acceso: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

(15) CD79b (CD79B, CD79 β , Igb (beta asociada a inmunoglobulina), B29)

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank NM_000626

Versión de Genbank nº NM_000626.2 GI:90193589

Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:53 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_000617

Versión de Genbank nº NP_000617.1 GI:11038674

Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:53 PM

Referencias cruzadas

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller y col. (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625; documentos WO2004/016225 (reivindicación 2, Fig. 140); WO2003/087768, 5 US2004/101874 (reivindicación 1, página 102); WO2003/062401 (reivindicación 9); WO2002/78524 (Ejemplo 2); US2002/150573 (reivindicación 5, página 15); US5644033; WO2003/048202 (reivindicación 1, páginas 306 y 309); documento WO 99/58658, US6534482 (reivindicación 13, Fig. 17A/B); WO2000/55351 (reivindicación 11, páginas 1145-1146); MIM:147245
- 10 **(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (dominio SH2 que contiene proteína de anclaje a fosfatasa 1a), SPAP1B, SPAP1C)**

Nucleótido

- 15 N° de acceso de Genbank NM_030764
Versión de Genbank nº NM_030764.3 GI:227430280
Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de junio de 2012 12:30 AM

Polipéptido

- 20 N° de acceso de GenBank NP_110391
Versión de Genbank nº NP_110391.2 GI:19923629
Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de junio de 2012 12:30 AM

Referencias cruzadas

- AY358130); Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J. y col. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; WO2004/016225 (reivindicación 2); WO2003/077836; WO2001/38490 (reivindicación 5; 30 Fig. 18D-1-18D-2); WO2003/097803 (reivindicación 12); WO2003/089624 (reivindicación 25); MIM:606509.

(17) HER2 (ErbB2)Nucleótido

- 35 N° de acceso de Genbank M11730
Versión de Genbank nº M11730.1 GI:183986
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Polipéptido

- 40 N° de acceso de GenBank AAA75493
Versión de Genbank nº AAA75493.1 GI:306840
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Referencias cruzadas

- Coussens L. y col., Science (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T. y col., Nature 319, 230-234, 1986; Semba K. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M. y col., J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; 50 Kuhns J.J. y col., J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S. y col., Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A. y col. (1993) Genomics 15, 426-429; documentos WO2004/048938 (Ejemplo 2); WO2004/027049 (Fig. 1I); WO2004/009622; WO2003/081210; WO2003/089904 (reivindicación 9); WO2003/016475 (reivindicación 1); US2003/118592; WO2003/008537 (reivindicación 1); WO2003/055439 (reivindicación 29; Fig. 1A-B); WO2003/025228 (reivindicación 37; Fig. 5C); WO2002/22636 (Ejemplo 13; página 95-107); WO2002/12341 (reivindicación 68; Fig. 7); WO2002/13847 (página 71-74); WO2002/14503 (página 114-117); WO2001/53463 (reivindicación 2; página 41-46); WO2001/41787 (página 15); WO2000/44899 (reivindicación 52; Fig. 7); WO2000/20579 (reivindicación 3; Fig. 2); US5869445 (reivindicación 3; Col 31-38); WO9630514 (reivindicación 2; página 56-61); EP1439393 (reivindicación 7); WO2004/043361 (reivindicación 7); WO2004/022709; WO2001/00244 (Ejemplo 3; Fig. 4); acceso: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1

ANTICUERPOS

Abbott: Documento US20110177095

- 65 Por ejemplo, un anticuerpo que comprende CDR que tienen en general al menos el 80 % de identidad de secuencias con CDR que tienen secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (CDR-H1), SEQ ID NO: 4 (CDR-H2), SEQ ID NO:

5 (CDR-H3), SEQ ID NO: 104 y/o SEQ ID NO: 6 (CDR-L1), SEQ ID NO: 7 (CDR-L2) y SEQ ID NO: 8 (CDR-L3), en el que el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de unión anti-HER2 tiene inmunogenicidad reducida en comparación con un anticuerpo que tiene una VH de SEQ ID NO: 1 y una VL de SEQ ID NO: 2.

5 Biogen: Documento US20100119511

Por ejemplo, números de acceso de ATCC: PTA-10355, PTA-10356, PTA-10357, PTA-10358

10 Por ejemplo, una molécula de anticuerpo purificada que se une a HER2 que comprende las seis CDR de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en BIIB71F10 (SEQ ID NO: 11, 13), BIIB69A09 (SEQ ID NO: 15, 17); BIIB67F10 (SEQ ID NO: 19, 21); BIIB67F11 (SEQ ID NO: 23, 25), BIIB66A12 (SEQ ID NO: 27, 29), BIIB66C01 (SEQ ID NO: 31, 33), BIIB65C10 (SEQ ID NO: 35, 37), BIIB65H09 (SEQ ID NO: 39, 41) y BIIB65B03 (SEQ ID NO: 43, 45), o CDR que son idénticas o que tienen no más de dos alteraciones de dichas CDR.

15 Herceptin (Genentech) – Documento US6.054.297; nº de acceso de ATCC CRL-10463 (Genentech)

Pertuzumab (Genentech)

Documento US20110117097

20 por ejemplo, véase SEQ ID N° 15 y 16, SEQ ID N° 17 y 18, SEQ ID N° 23 y 24 y los números de acceso de ATCC HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12697.

Documento US20090285837

Documento US20090202546

por ejemplo, números de acceso de ATCC: HB-12215, HB-12216, CRL 10463, HB-12698.

Documento US20060088523

25 - por ejemplo, números de acceso de ATCC: HB-12215, HB-12216
 - por ejemplo, un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos ligeras variables y pesadas variables en SEQ ID N° 3 y 4, respectivamente.
 30 - por ejemplo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera seleccionada de SEQ ID N° 15 y 23 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada seleccionada de SEQ ID N° 16 y 24

el documento US20060018899

35 - por ejemplo, números de acceso de ATCC: (7C2) HB-12215, (7F3) HB-12216, (4D5) CRL-10463, (2C4) HB-12697.
 - por ejemplo, un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos en SEQ ID N° 23, o una variante desamidada y/u oxidada del mismo.

40 Documento US2011/0159014

- por ejemplo, un anticuerpo que tiene un dominio variable de la cadena ligera que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO: 1.
 45 - Por ejemplo, un anticuerpo que tiene un dominio variable de la cadena pesada que comprende las regiones hipervariables de SEQ ID NO: 2.

Documento US20090187007

Glycotope: anticuerpo TrasGEX <http://www.glycotope.com/pipeline>

50 Por ejemplo, véase International Joint Cancer Institute and Changhai Hospital Cancer Cent: HMTI-Fc Ab - Gao J. y col., BMB Rep. 2009 Oct 31;42(10):636-41.

Symphogen: Documento US20110217305

55 Union Stem Cell & Gene Engineering, China - Liu HQ. y col., Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 2010 May;26(5):456-8.

(18) NCA (CEACAM6)

60 Nucleótido

Nº de acceso de Genbank M18728

Versión de Genbank nº M18728.1 GI:189084

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

65

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAA59907

Versión de Genbank nº AAA59907.1 GI:189085

5 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Referencias cruzadas

10 Barnett T. y col., Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:16899-16903, 2002; documentos WO2004/063709; EP1439393 (reivindicación 7); WO2004/044178 (Ejemplo 4); WO2004/031238; WO2003/042661 (reivindicación 12); WO2002/78524 (Ejemplo 2); WO2002/86443 (reivindicación 27; página 427); WO2002/60317 (reivindicación 2); acceso: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728.

15 **(19) MDP (DPEP1)**

Nucleótido

20 Nº de acceso de Genbank BC017023

Versión de Genbank nº BC017023.1 GI:16877538

Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 01:00 PM

Polipéptido

25 Nº de acceso de GenBank AAH17023

Versión de Genbank nº AAH17023.1 GI:16877539

Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 01:00 PM

30 Referencias cruzadas

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26):16899-16903 (2002); documentos WO2003/016475 (reivindicación 1); WO2002/64798 (reivindicación 33; página 85-87); JP05003790 (Fig. 6-8); WO99/46284 (Fig. 9); MIM:179780.

35 **(20) IL20R-alfa (IL20Ra, ZCYTOR7)**

Nucleótido

40 Nº de acceso de Genbank AF184971

Versión de Genbank nº AF184971.1 GI:6013324

Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 10:00 PM

Polipéptido

45 Nº de acceso de GenBank AAF01320

Versión de Genbank nº AAF01320.1 GI:6013325

Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 10:00 PM

Referencias cruzadas

50 Clark H.F. y col., Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J. y col., Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H. y col., Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L. y col., J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J. y col., J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S. y col. (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F. y col. (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; documentos EP1394274 (Ejemplo 11); US2004/005320 (Ejemplo 5); WO2003/029262 (página 74-75); WO2003/002717 (reivindicación 2; página 63); WO2002/22153 (página 45-47); US2002/042366 (página 20-21); WO2001/46261 (página 57-59); WO2001/46232 (página 63-65); WO98/37193 (reivindicación 1; página 55-59); acceso: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

60 **(21) Brevicano (BCAN, BEHAB)**

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank AF229053

Versión de Genbank nº AF229053.1 GI:10798902

65 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 12:58 AM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAG23135

Versión de Genbank nº AAG23135.1 GI:10798903

5 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 12:58 AM

Referencias cruzadas

10 Gary S.C. y col., Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F. y col., Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; documentos US2003/186372 (reivindicación 11); US2003/186373 (reivindicación 11); US2003/119131 (reivindicación 1; Fig. 52); US2003/119122 (reivindicación 1; Fig. 52); US2003/119126 (reivindicación 1); US2003/119121 (reivindicación 1; Fig. 52); US2003/119129 (reivindicación 1); US2003/119130 (reivindicación 1); US2003/119128 (reivindicación 1; Fig. 52); US2003/119125 (reivindicación 1); WO2003/016475 (reivindicación 1); WO2002/02634 (reivindicación 1)

15

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5)

Nucleótido

20 Nº de acceso de Genbank NM_004442

Versión de Genbank nº NM_004442.6 GI:111118979

Fecha de actualización del registro de GenBank: 8 de septiembre de 2012 04:43 PM

Polipéptido

25

Nº de acceso de GenBank NP_004433

Versión de Genbank nº NP_004433.2 GI:21396504

Fecha de actualización del registro de GenBank: 8 de septiembre de 2012 04:43 PM

30 Referencias cruzadas

Chan, J. y Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000); documentos WO2003042661 (reivindicación 12); WO200053216 (reivindicación 1; página 41); WO2004065576 (reivindicación 1); WO2004020583 (reivindicación 9); WO2003004529 (página 128-132); WO200053216 (reivindicación 1; página 42); MIM:600997.

35

(23) ASLG659 (B7h)

Nucleótido

40

Nº de acceso de GenBank AX092328

Versión de Genbank nº AX092328.1 GI:13444478

Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de enero de 2011 07:37 AM

45 Referencias cruzadas

Documentos US2004/0101899 (reivindicación 2); WO2003104399 (reivindicación 11); WO2004000221 (Fig. 3); US2003/165504 (reivindicación 1); US2003/124140 (Ejemplo 2); US2003/065143 (Fig. 60); WO2002/102235 (reivindicación 13; página 299); US2003/091580 (Ejemplo 2); WO2002/10187 (reivindicación 6; Fig. 10); WO2001/94641 (reivindicación 12; Fig. 7b); WO2002/02624 (reivindicación 13; Fig. 1A-1B); US2002/034749 (reivindicación 54; página 45-46); WO2002/06317 (Ejemplo 2; página 320-321, reivindicación 34; página 321-322); WO2002/71928 (página 468-469); WO2002/02587 (Ejemplo 1; Fig. 1); WO2001/40269 (Ejemplo 3; páginas 190-192); WO2000/36107 (Ejemplo 2; página 205-207); WO2004/053079 (reivindicación 12); WO2003/004989 (reivindicación 1); WO2002/71928 (página 233-234, 452-453); documento WO 01/16318.

55

(24) PSCA (precursor de antígenos citoplásmicos de la próstata)

Nucleótido

60 Nº de acceso de Genbank AJ297436

Versión de Genbank nº AJ297436.1 GI:9367211

Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 11:25 AM

Polipéptido

65

Nº de acceso de GenBank CAB97347

Versión de Genbank nº CAB97347.1 GI:9367212

Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 11:25 AM

Referencias cruzadas

5 Reiter R.E. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 1735-1740, 1998; Gu Z. y col., Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; documentos WO2004/022709; EP1394274 (Ejemplo 11); US2004/018553 (reivindicación 17); WO2003/008537 (reivindicación 1); WO2002/81646 (reivindicación 1; página 164); WO2003/003906 (reivindicación 10; página 288); WO2001/40309 (Ejemplo 1; Fig. 17); US2001/055751 (Ejemplo 1; Fig. 1b); WO2000/32752 (reivindicación 18; Fig. 1); WO98/51805 (reivindicación 17; página 97); WO98/51824 (reivindicación 10; página 94); WO98/40403 (reivindicación 2; Fig. 1 B); acceso: 043653; EMBL; AF043498; AAC39607.1

(25) GEDA

15 Nucleótido

Nº de acceso de Genbank AY260763

Versión de Genbank nº AY260763.1 GI:30102448

20 Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 02:24 AM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAP14954

25 Versión de Genbank nº AAP14954.1 GI:30102449

Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 02:24 AM

Referencias cruzadas

30 Proteína similar al componente de fusión del lipoma HMGIC AP14954 /pid=AAP14954.1 - Homo sapiens (humano); documentos WO2003/054152 (reivindicación 20); WO2003/000842 (reivindicación 1); WO2003/023013 (Ejemplo 3, reivindicación 20); US2003/194704 (reivindicación 45); GI:30102449;

(26) BAFF-R (receptor del factor activante de linfocitos B, receptor 3 de BLyS, BR3)

35 Nucleótido

Nº de acceso de Genbank AF116456

Versión de Genbank nº AF116456.1 GI:4585274

40 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 09:44 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAD25356

45 Versión de Genbank nº AAD25356.1 GI:4585275

Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 09:44 PM

Referencias cruzadas

50 Receptor de BAFF /pid=NP_443177.1 - Homo sapiens: Thompson, J.S. y col., Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); documentos WO2004/058309; WO2004/011611; WO2003/045422 (Ejemplo; página 32-33); WO2003/014294 (reivindicación 35; Fig. 6B); WO2003/035846 (reivindicación 70; página 615-616); WO2002/94852 (Col 136-137); WO2002/38766 25 (reivindicación 3; página 133); WO2002/24909 (Ejemplo 3; Fig. 3); MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600

(27) CD22 (isoforma del receptor CD22-B de linfocitos B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814)

Nucleótido

60 Nº de acceso de Genbank AK026467

Versión de Genbank nº AK026467.1 GI:10439337

Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de septiembre de 2006 11:24 PM

Polipéptido

65 Nº de acceso de GenBank BAB15489

Versión de Genbank nº BAB15489.1 GI:10439338

Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de septiembre de 2006 11:24 PM

Referencias cruzadas

5 Wilson y col. (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; documento WO2003/072036 (reivindicación 1; Fig. 1); IM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1.

(27a) CD22 (molécula CD22)

10 Nucleótido

Nº de acceso de Genbank X52785

Versión de Genbank nº X52785.1 GI:29778

15 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:09 AM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank CAA36988

20 Versión de Genbank nº CAA36988.1 GI:29779

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:09 AM

Referencias cruzadas

25 Stamenkovic I. y col., Nature 345 (6270), 74-77 (1990)??

Otra información

Símbolo oficial: CD22

30 Otros pseudónimos: SIGLEC-2, SIGLEC2

Otras designaciones: receptor CD22 de linfocitos B; molécula de adhesión a células de linfocitos B; BL-CAM; antígeno CD22; antígeno de superficie de linfocitos T Leu-14; lectina 2 similar a Ig de unión a ácido siálico; lectina 2 similar a Ig de unión a ácido siálico

35 **ANTICUERPOS**

G5/44 (Inotuzumab): DiJoseph JF. y col., Cancer Immunol Immunother. 2005 Jan;54(1):11-24.

Epratuzumab - Goldenberg DM. y col., Expert Rev Anticancer Ther. 6(10): 1341-53, 2006.

40 **(28) CD79a (CD79A, CD79alfa), alfa asociada a inmunoglobulina, una proteína específica de linfocitos B que interacciona covalentemente con Ig beta (CD79B) y forma un complejo sobre la superficie con 35 moléculas de IgM, traduce una señal que participa en la diferenciación de linfocitos B), pl: 4,84, MW: 25028 TM: 2. Cromosoma del gen [P]: 19q13.2).**

45 Nucleótido

Nº de acceso de Genbank NM_001783

Versión de Genbank nº NM_001783.3 GI:90193587

50 Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:48 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_001774

55 Versión de Genbank nº NP_001774.1 GI:4502685

Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:48 PM

Referencias cruzadas

60 Documentos WO2003/088808, US2003/0228319; WO2003/062401 (reivindicación 9); US2002/150573 (reivindicación 4, páginas 13-14); WO99/58658 (reivindicación 13, Fig. 16); WO92/07574 (Fig. 1); US5644033; Ha y col. (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Müller y col. (1992) Eur. J. Immunol. 22:1621-1625; Hashimoto y col. (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme y col. (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu y col. (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi y col. (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464

65

(29) CXCR5 (receptor 1 del linfoma de Burkitt, un receptor acoplado a la proteína G que se activa por la quimiocina CXCL13, funciona en la migración de linfocitos y defensa humoral, desempeña una función en la infección por el VIH-2 y quizás desarrollo de SIDA, linfoma, mieloma y leucemia); 372 aa, pl: 8,54 MW: 41959 TM: 7. Cromosoma del gen [P]: 11q23.3

5

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank NM_001716

Versión de Genbank nº NM_001716.4 GI:342307092

10 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:49 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_001707

15 Versión de Genbank nº NP_001707.1 GI:4502415

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:49 PM

Referencias cruzadas

20 Documentos WO2004/040000; WO2004/015426; US2003/105292 (Ejemplo 2); US6555339 (Ejemplo 2); WO2002/61087 (Fig. 1); WO2001/57188 (reivindicación 20, página 269); WO2001/72830 (páginas 12-13); WO2000/22129 (Ejemplo 1, páginas 152-153, Ejemplo 2, páginas 254-256); WO99/28468 (reivindicación 1, página 38); US5440021 (Ejemplo 2, col 49-52); WO94/28931 (páginas 56-58); WO92/17497 (reivindicación 7, Fig. 5); Dobner y col. (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella y col. (1995) Biochem. J. 309:773-779

25

(30) HLA-DOB (subunidad beta de la molécula de MHC de clase II (antígeno Ia) que se une a péptidos y los presenta a linfocitos T CD4+); 273 aa, pl: 6,56, MW: 30820.TM: 1. Cromosoma del gen [P]: 6p21.3)

Nucleótido

30

Nº de acceso de Genbank NM_002120

Versión de Genbank nº NM_002120.3 GI:118402587

Fecha de actualización del registro de GenBank: 8 de septiembre de 2012 04:46 PM

Polipéptido

35

Nº de acceso de GenBank NP_002111

Versión de Genbank nº NP_002111.1 GI:4504403

Fecha de actualización del registro de GenBank: 8 de septiembre de 2012 04:46 PM

40

Referencias cruzadas

45 Tonnelle y col. (1985) EMBO J. 4(11):2839-2847; Jonsson y col. (1989) Immunogenetics 29(6):411-413; Beck y col. (1992) J. Mol. Biol. 228:433-441; Strausberg y col. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903; Servenius y col. (1987) J. Biol. Chem. 262:8759-8766; Beck y col. (1996) J. Mol. Biol. 25 255:1-13; Naruse y col. (2002) Tissue Antigens 59:512-519; documentos WO99/58658 (reivindicación 13, Fig. 15); US6153408 (Col 35-38); US5976551 (col 168-170); US6011146 (col 145-146); Kasahara y col. (1989) Immunogenetics 30(1):66-68; Larhammar y col. (1985) J. Biol. Chem. 260(26):14111-14119

50

(31) P2X5 (canal 5 de iones regulado por el ligando de los receptores purinérgicos P2X, un canal de iones regulado por ATP extracelular, puede participar en la transmisión sináptica y neurogénesis, la deficiencia puede contribuir a la patofisiología de la inestabilidad del detrusor idiopático); 422 aa, pl: 7,63, MW: 47206, TM: 1 Cromosoma del gen [P]: 17p13.3).

55

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank NM_002561

Versión de Genbank nº NM_002561.3 GI:325197202

Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:41 AM

60

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_002552

Versión de Genbank nº NP_002552.2 GI:28416933

65 Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:41 AM

Referencias cruzadas

Le y col. (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; documentos WO2004/047749; WO2003/072035 (reivindicación 10); Touchman y col. (2000) Genome Res. 10:165-173; WO2002/22660 (reivindicación 20); WO2003/093444 (reivindicación 1); WO2003/087768 (reivindicación 1); WO2003/029277 (página 82)

(32) CD72 (antígeno de diferenciación de linfocitos B CD72, Lyb-2); 359 aa, pl: 8,66, MW: 40225, TM: 1 Cromosoma del gen [P]: 9p13.3).

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank NM_001782
Versión de Genbank nº NM_001782.2 GI:194018444
Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:43 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_001773
Versión de Genbank nº NP_001773.1 GI:4502683
Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 01:43 PM

Referencias cruzadas

Documentos WO2004042346 (reivindicación 65); WO2003/026493 (páginas 51-52, 57-58); WO2000/75655 (páginas 105-106); Von Hoegen y col. (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg y col. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903.

(33) LY64 (antígeno 64 de linfocitos (RP105), proteína de membrana de tipo I de la familia de repeticiones ricas en leucina (LRR), regula la activación de linfocitos B y la apoptosis, la pérdida de función está asociada a la elevada actividad de la enfermedad en pacientes con lupus eritematosos sistémico); 661 aa, pl: 6,20, MW: 74147, TM: 1 Cromosoma del gen [P]: 5q12).

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank NM_005582
Versión de Genbank nº NM_005582.2 GI:167555126
Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:50 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_005573
Versión de Genbank nº NP_005573.2 GI:167555127
Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:50 PM

Referencias cruzadas

Documentos US2002/193567; WO97/07198 (reivindicación 11, páginas 39-42); Miura y col. (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura y col. (1998) Blood 92:2815-2822; documentos WO2003/083047; WO97/44452 (reivindicación 8, páginas 57-61); WO2000/12130 (páginas 24-26).

(34) FcRH1 (proteína 1 similar al receptor de Fc, un receptor putativo para el dominio Fc de inmunoglobulina que contiene dominios similares a Ig tipo C2 e ITAM, puede tener una función en la diferenciación de linfocitos B); 429 aa, pl: 5,28, MW: 46925, TM: 1 Cromosoma del gen [P]: 1q21-1q22)

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank NM_052938
Versión de Genbank nº NM_052938.4 GI:226958543
Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:43 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_443170
Versión de Genbank nº NP_443170.1 GI:16418419
Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:43 PM

Referencias cruzadas

Documentos WO2003/077836; WO2001/38490 (reivindicación 6, Fig. 18E-1-18-E-2); Davis y col. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; WO2003/089624 (reivindicación 8); EP1347046 (reivindicación 1);
5 WO2003/089624 (reivindicación 7).

(35) IRTA2 (2 asociado a la translocalización de receptores de la superfamilia de inmunoglobulina, un inmunoreceptor putativo con posibles funciones en el desarrollo de linfocitos B y linfomagénesis; la desregulación del gen por translocalización se produce en algunos tumores malignos de linfocitos B); 977 aa, pl: 6,88, MW: 106468, TM: 1 Cromosoma del gen [P]: 1q21)
10

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank AF343662
15 Versión de Genbank nº AF343662.1 GI:13591709
Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:16 AM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAK31325
20 Versión de Genbank nº AAK31325.1 GI:13591710
Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:16 AM

Referencias cruzadas

25 AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Ratón: AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1; documento WO2003/024392 (reivindicación 2, Fig. 97); Nakayama y col. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; documentos WO2003/077836; WO2001/38490 (reivindicación 3, Fig. 18B-1-18B-2).
30

(36) TENB2 (TMEFF2, tomoregulina, TPEF, HPP1, TR, proteoglicano de transmembrana putativo, relacionado con la familia de EGF/heredulina de factores de crecimiento y folistatina); 374 aa)

Nucleótido

35 Nº de acceso de Genbank AF179274
Versión de Genbank nº AF179274.2 GI:12280939
Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:05 AM

Polipéptido

40 Nº de acceso de GenBank AAD55776
Versión de Genbank nº AAD55776.2 GI:12280940
Fecha de actualización del registro de GenBank: 11 de marzo de 2010 01:05 AM

Referencias cruzadas

45 Acceso NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMIM: 605734; SwissProt Q9UIK5; AY358907, CAF85723, CQ782436; documentos WO2004/074320; JP2004113151; WO2003/042661; WO2003/009814; EP1295944 (páginas 69-70); WO2002/30268 (página 329); WO2001/90304; US2004/249130; US2004/022727; WO2004/063355; US2004/197325; US2003/232350; US2004/005563; US2003/124579; Horie y col. (2000) Genomics 67:146-152; Uchida y col. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang y col. (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynne-Jones y col. (2001) Int J Cancer. Oct 15; 94(2):178-84.
55

(37) PSMA - FOLH1 (folato hidrolasa (antígeno de membrana específico de la próstata) 1)

Nucleótido

60 Nº de acceso de Genbank M99487
Versión de Genbank nº M99487.1 GI:190663
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Polipéptido

65 Nº de acceso de GenBank AAA60209

Versión de Genbank nº AAA60209.1 GI:190664

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Referencias cruzadas

5 Israeli R.S. y col., Cancer Res. 53 (2), 227-230 (1993)

Otra información

10 Símbolo oficial: FOLH1
 Otros pseudónimos: GIG27, FGCP, FOLH, GCP2, GCP11, NAALAD1, NAALAdasa, PSM, PSMA, mGCP
 Otras designaciones: ácido dipeptidasa 1 ligada a alfa N-acetilado; ácido dipeptidasa I ligada a alfa N-acetilado; NAALADasa I; proteína del gen 27 inhibidor del crecimiento celular; folilpoli-gamma-glutamato carboxipeptidasa; glutamato carboxilasa II; glutamato carboxipeptidasa 2; glutamato carboxipeptidasa II; glutamato carboxipeptidasa de membrana; variante F del antígeno de membrana específico de la próstata; pteroilpoli-gamma-glutamato carboxipeptidasa

ANTICUERPOS

20 Documento US 7.666.425:
 Anticuerpos producidos por hibridomas que tienen las siguientes referencias de ATCC: nº de acceso de ATCC HB-12101, nº de acceso de ATCC HB-12109, nº de acceso de ATCC HB-12127 y nº de acceso de ATCC HB-12126.

25 Proscan: un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 8H12, 3E11, 17G1, 29B4, 30C1 y 20F2 (documento US 7.811.564; Moffett S. y col., Hybridoma (Larchmt). 2007 Dec;26(6):363-72).

30 Cytogen: anticuerpos monoclonales 7E11-C5 (nº de acceso de ATCC HB 10494) y 9H10-A4 (nº de acceso de ATCC HB11430) - documento US 5.763.202

GlycoMimetics: NUH2 - nº de acceso de ATCC HB 9762 (documento US 7.135.301)

35 Human Genome Science: HPRAJ70 - nº de acceso de ATCC 97131 (documento US 6.824.993); secuencia de aminoácidos codificada por el clon de ADNc (HPRAJ70) depositado como el depósito nº 97131 de la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC").

Medarex: anticuerpos anti-PSMA que carecen de restos de fucosilo - documento US 7.875.278

40 Los anticuerpos anti-PSMA de ratón incluyen los anticuerpos 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6, 4C8B9, y monoclonales. Los hibridomas que secretan 3F5.4G6, 3D7.1.1, 4E10-1.14, 3E11, 4D8, 3E6, 3C9, 2C7, 1G3, 3C4, 3C6, 4D4, 1G9, 5C8B9, 3G6 o 4C8B9 se han depositado públicamente y se describen en la patente de EE.UU. nº 6.159.508. Los hibridomas relevantes se han depositado públicamente y se describen en la patente de EE.UU. nº 6.107.090. Además, los anticuerpos anti-PSMA humanizados, que incluyen una versión humanizada de J591, se describen en más detalle en la publicación PCT WO 02/098897.

Otros anticuerpos anti-PSMA humana de ratón se han descrito en la materia, tales como mAb 107-1A4 (Wang, S. y col. (2001) Int. J. Cancer 92:871-876) y mAb 2C9 (Kato, K. y col. (2003) Int. J. Urol. 10:439-444).

50 Ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-PSMA humana incluyen los anticuerpos 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3, aislados y caracterizados estructuralmente como se ha descrito originalmente en las publicaciones PCT WO 01/09192 y el documento WO 03/064606 y en la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/654.125, titulada "Human Monoclonal Antibodies to Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA)", presentada el 18 de febrero de 2005. Las secuencias de aminoácidos de V_H de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEQ ID NO: 1-9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V_L de 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 y 1C3 se muestran en SEQ ID NO: 10-18, respectivamente.

60 Otros anticuerpos anti-PSMA humanos incluyen los anticuerpos desvelados en la publicación PCT WO 03/034903 y la solicitud de EE.UU. nº 2004/0033229.

65 NW Biotherapeutics: Una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo que consiste en 3F5.4G6 que tiene número de acceso de ATCC HB12060, 3D7-1.1. que tiene número de acceso de ATCC HB12309, 4E10-1.14 que tiene número de acceso de ATCC HB12310.3E11 (ATCC HB12488), 4D8 (ATCC HB12487), 3E6 (ATCC HB12486), 3C9 (ATCC HB12484), 2C7 (ATCC HB12490), 1G3 (ATCC HB12489), 3C4 (ATCC HB12494), 3C6 (ATCC HB12491), 4D4 (ATCC HB12493), 1G9 (ATCC HB12495), 5C8B9 (ATCC HB12492) y 3G6 (ATCC HB12485) - véase

el documento US 6.150.508

5 PSMA Development Company / Progenics / Cytogen - Seattle Genetics: mAb 3.9, producido por el hibridoma depositado bajo el nº de acceso de ATCC PTA-3258 o mAb 10.3, producido por el hibridoma depositado bajo el nº de acceso de ATCC PTA-3347 - documento US 7.850.971

PSMA Development Company - Composiciones de anticuerpos para PSMA (documento US 20080286284, Tabla 1)

10 La presente solicitud es una divisionaria de la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 10/395.894, presentada el 21 de marzo de 2003 (documento US 7.850.971)
Hospital universitario de Friburgo, Alemania - mAbs 3/A12, 3/E7 y 3/F11 (Wolf P. y col., Prostate. 2010 Apr 1;70(5):562-9).

15 **(38) SST (receptor de somatostatina; obsérvese que hay 5 subtipos)**

(38.1) SSTR2 (receptor 2 de somatostatina)

Nucleótido

20 Nº de acceso de Genbank NM_001050
Versión de Genbank nº NM_001050.2 GI:44890054
Fecha de actualización del registro de GenBank: 19 de agosto de 2012 01:37 PM

Polipéptido

25 Nº de acceso de GenBank NP_001041
Versión de Genbank nº NP_001041.1 GI:4557859
Fecha de actualización del registro de GenBank: 19 de agosto de 2012 01:37 PM

30 Referencias cruzadas

Yamada Y. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89 (1), 251-255 (1992); Susini C. y col., Ann Oncol. 2006 Dec;17(12):1733-42

35 Otra información

Símbolo oficial: SSTR2
Otras designaciones: SRIF-1; SS2R; receptor de somatostatina tipo 2

40 (38.2) SSTR5 (receptor 5 de somatostatina)

Nucleótido

45 Nº de acceso de Genbank D16827
Versión de Genbank nº D16827.1 GI:487683
Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de agosto de 2006 12:45 PM

Polipéptido

50 Nº de acceso de GenBank BAA04107
Versión de Genbank nº BAA04107.1 GI:487684
Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de agosto de 2006 12:45 PM

Referencias cruzadas

55 Yamada, Y. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 195 (2), 844-852 (1993)

Otra información

60 Símbolo oficial: SSTR5
Otros pseudónimos: SS-5-R
Otras designaciones: receptor de somatostatina subtipo 5; receptor de somatostatina tipo 5

65 (38.3) SSTR1
(38.4) SSTR3
(38.5) SSTR4

AvB6 - Ambas subunidades (39+40)

(39) ITGAV (integrina, alfa V;

5 Nucleótido

Nº de acceso de Genbank M14648 J02826 M18365
Versión de Genbank nº M14648.1 GI:340306
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:56 AM

10

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAA36808
Versión de Genbank nº AAA36808.1 GI:340307
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:56 AM

15

Referencias cruzadas

Suzuki S. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 (22), 8614-8618 (1986)

20

Otra información

Símbolo oficial: ITGAV
Otros pseudónimos: CD51, MSK8, VNRA, VTNR
Otras designaciones: antígeno identificado por el anticuerpo monoclonal L230; integrina alfa-V; integrina alfa-V-beta-3; integrina, alfa V (receptor de vitronectina, polipéptido alfa, antígeno CD51); subunidad alfa del receptor de vitronectina

25

(40) ITGB6 (integrina, beta 6)

30

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank NM_000888
Versión de Genbank nº NM_000888.3 GI:9966771
Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:46 AM

35

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_000879
Versión de Genbank nº NP_000879.2 GI:9625002
Fecha de actualización del registro de GenBank: 27 de junio de 2012 12:46 AM

40

Referencias cruzadas

Sheppard D.J. y col., Biol. Chem. 265 (20), 11502-11507 (1990)

45

Otra información

Símbolo oficial: ITGB6
Otras designaciones: integrina beta-6

50

ANTICUERPOS

Biogen: Documento US 7.943.742 - Los clones de hibridoma 6.3G9 y 6.8G6 se depositaron en la ATCC, números de acceso ATCC PTA-3649 y -3645, respectivamente.

55

Biogen: Documento US7.465.449 - En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las mismas secuencias de polipéptidos de las cadenas pesadas y ligeras que un anticuerpo producido por el hibridoma 6.1A8, 6.3G9, 6.8G6, 6.2B1, 6.2B10, 6.2A1, 6.2E5, 7.1G10, 7.7G5 o 7.1C5.

60

Centocor (J&J): Documentos US7.550.142; US7.163.681
Por ejemplo, en el documento US 7.550.142 - un anticuerpo que tiene regiones variables de las cadenas pesadas humanas y de las cadenas ligeras humanas que comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

65

Seattle Genetics: 15H3 (Ryan MC. y col., Cancer Res April 15, 2012; 72(8 Supplement): 4630)

(41) CEACAM5 (molécula 5 de adhesión a células relacionada con el antígeno carcinoembrionario)

Nucleótido

5 N° de acceso de Genbank M17303
Versión de Genbank nº M17303.1 GI:178676
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Polipéptido

10 N° de acceso de GenBank AAB59513
Versión de Genbank nº AAB59513.1 GI:178677
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

15 Referencias cruzadas

Beauchemin N. y col., Mol. Cell. Biol. 7 (9), 3221-3230 (1987)

Otra información

20 Símbolo oficial: CEACAM5
Otros pseudónimos: CD66e, CEA
Otras designaciones: antígeno 100 de meconio

25 **ANTICUERPOS**

AstraZeneca-MedImmune: Documentos US 20100330103; US20080057063; US20020142359

30 - por ejemplo, un anticuerpo que tiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con las siguientes secuencias: cadena pesada; CDR1 - DNYMH, CDR2 - WIDPENGDT E YAPKFRG, CDR3 - LIYAGYLAMD Y; y cadena ligera CDR1 - SASSSVTYMH, CDR2 - STSNLAS, CDR3 - QQRSTYPLT.
- Hibridoma 806.077 depositado como el depósito nº 96022936 de la Colección Europea de Cultivos celulares (ECACC).

35 Research Corporation Technologies, Inc.: Documento US5.047.507
Bayer Corporation: Documento US6.013.772
BioAlliance: Documentos US7.982.017; US7.674.605

• Documento US 7.674.605

40 - un anticuerpo que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
45 - un anticuerpo que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Celltech Therapeutics Limited: Documento US5.877.293

50 The Dow Chemical Company: Documentos US5.472.693; US6.417.337; US6.333.405

Documento US5.472.693 - por ejemplo, ATCC No. CRL-11215
Documento US6.417.337 - por ejemplo, ATCC CRL-12208
Documento US6.333.405 - por ejemplo, ATCC CRL-12208

55 Immunomedics, Inc: Documentos US7.534.431; US7.230.084; US7.300.644; US6.730.300;

US20110189085

60 - un anticuerpo que tiene CDR de la región variable de la cadena ligera comprende:

CDR1 comprende KASQDVGTSVA (SEQ ID NO: 20); CDR2 comprende WTSTRHT (SEQ ID NO: 21); y CDR3 comprende QQYSLYRS (SEQ ID NO: 22);
y las CDR de la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo anti-CEA comprenden: CDR1 comprende TYWEM (SEQ ID NO: 23); CDR2 comprende EIHPDSSTINYAPSLKD (SEQ ID NO: 24); y CDR3 comprende LYFGFPWFAY (SEQ ID NO: 25).

65

Documentos US20100221175; US20090092598; US20070202044; US20110064653; US20090185974; US20080069775.

(42) *MET (proto-oncogén met; receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)*

5

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank M35073

Versión de Genbank nº M35073.1 GI:187553

10 Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 11:12 AM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAA59589

15 Versión de Genbank nº AAA59589.1 GI:553531

Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 11:12 AM

Referencias cruzadas

20 Dean M. y col., Nature 318 (6044), 385-388 (1985)

Otra información

Símbolo oficial: MET

25 Otros pseudónimos: AUTS9, HGFR, RCCP2, c-Met

Otras designaciones: receptor de HGF; receptor de HGF/SF; receptor de SF; receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; tirosina cinasa del proto-oncogén met; proto-oncogén c-Met; factor de dispersión del receptor; proteína tirosina-cinasa Met

30 *ANTICUERPOS*

Abgenix/Pfizer: Documento US20100040629

35 por ejemplo, el anticuerpo producido por el hibridoma 13.3.2 que tiene el número de acceso de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) PTA-5026; el anticuerpo producido por el hibridoma 9.1.2 que tiene el número de acceso de ATCC PTA-5027; el anticuerpo producido por el hibridoma 8.70.2 que tiene número de acceso de ATCC PTA-5028; o el anticuerpo producido por el hibridoma 6.90.3 que tiene el número de acceso de ATCC PTA-5029.

Amgen/Pfizer: Documento US20050054019

40 por ejemplo, un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 2 en la que X2 es glutamato y X4 es serina y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 en la que X8 es alanina, sin las secuencias señal; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 6 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, sin las secuencias señal; un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 10 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12, sin las secuencias señal; o un anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 14 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16, sin las secuencias señal.

50

Agouron Pharmaceuticals (ahora Pfizer): Documento US20060035907

Eli Lilly: Documento US20100129369

55 Genentech: Documentos US5.686.292; US20100028337; US20100016241; US20070129301; US20070098707; US20070092520, US20060270594; US20060134104; US20060035278; US20050233960; US20050037431

US 5.686.292 - por ejemplo, ATCC HB-11894 y ATCC HB-11895

US 20100016241 - por ejemplo, ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6)

60 Centro Médico de la Defensa Nacional, Taiwán: Lu RM. y col., Biomaterials. 2011 Apr;32(12):3265-74.

Novartis: Documento US20090175860

65 - por ejemplo, un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada 4687, en el que las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada 4687 son los restos 26-35, 50-65 y 98-102, respectivamente, de SEQ ID NO: 58; y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera 5097,

en el que las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera 5097 son los restos 24-39, 55-61 y 94-100 de SEQ ID NO: 37.

Pharmacia Corporation: Documento US20040166544

5 Pierre Fabre: Documentos US20110239316, US20110097262, US20100115639

Samsung: Documento US 20110129481 - por ejemplo, un anticuerpo monoclonal producido a partir de una célula de hibridoma que tiene el número de acceso KCLRF-BP-00219 o el número de acceso de KCLRF-BP-00223.

10 Samsung: Documento US 20110104176 - por ejemplo, un anticuerpo producido por una célula de hibridoma que tiene el número de acceso: KCLRF-BP-00220.

Escuela médica de la Universidad de Turín: DN-30 Pacchiana G. y col., J Biol Chem. 2010 Nov 12;285(46):36149-57
Van Andel Research Institute: Jiao Y. y col., Mol Biotechnol. 2005 Sep;31(1):41-54.

15 **(43) MUC1** (*mucina 1, asociada a la superficie celular*)

Nucleótido

Nº de acceso de Genbank J05581

20 Versión de Genbank nº J05581.1 GI:188869

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Polipéptido

25 Nº de acceso de GenBank AAA59876

Versión de Genbank nº AAA59876.1 GI:188870

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:48 AM

Referencias cruzadas

30 Gendler S.J. y col., J. Biol. Chem. 265 (25), 15286-15293 (1990)

Otra información

35 Símbolo oficial: MUC1

Otros pseudónimos: RP11-263K19.2, CD227, EMA, H23AG, KL-6, MAM6, MUC-1, MUC-1/SEC, MUC-1/X, MUC1/ZD, PEM, PEMT, PUM

40 Otras designaciones: antígeno DF3; antígeno H23; antígeno DF3 asociado a carcinoma de mama; mucina asociada a carcinoma; episialina; krebs von den Lungen-6; mucina 1, transmembrana; mucina-1; mucina urinaria reactiva con cacahuete; mucina epitelial polimórfica; mucina epitelial asociada a tumor; antígeno de la membrana epitelial asociado a tumor; mucina asociada a tumor

ANTICUERPOS

45 AltaRex- Quest Pharma Tech: Documento US 6.716.966 - por ejemplo, un anticuerpo para Alt-1 producido por el hibridoma ATCC nº PTA-975.

AltaRex- Quest Pharma Tech: Documento US7.147.850

50 CRT: 5E5 - Sorensen AL. y col., Glycobiology vol. 16 nº 2 pág. 96-107, 2006; HMFG2 - Burchell J. y col., Cancer Res., 47, 5476-5482 (1987)

Glycotope GT-MAB: GT-MAB 2.5-GEX (sitio web: <http://www.glycotope.com/pipeline/pankomab-gex>)

Immunogen: Documento US7.202.346

55 - por ejemplo, anticuerpo MJ-170: línea celular de hibridoma MJ-170 nº de acceso de ATCC PTA-5286; anticuerpo monoclonal MJ-171: línea celular de hibridoma MJ-171 nº de acceso de ATCC PTA-5287; anticuerpo monoclonal MJ-172:

60 línea celular de hibridoma MJ-172 nº de acceso de ATCC PTA-5288; o anticuerpo monoclonal MJ-173: línea celular de hibridoma MJ-173 nº de acceso de ATCC PTA-5302

Immunomedics: Documento US 6.653.104

Ramot Tel Aviv Uni: Documento US7.897.351

65 Regents Uni. CA: Documentos US 7.183.388; US20040005647; US20030077676.

Roche GlycArt: Documento US8.021.856

Centro Nacional Ruso de Investigaciones Oncológicas: Imuteran-Ivanov PK. y col., *Biotechnol J.* 2007 Jul;2(7):863-70

5 Universidad Técnica de Braunschweig: (IIB6, HT186-B7, HT186-D11, HT186-G2, HT200-3A-C1, HT220-M-D1, HT220-M-G8) - Thie H. y col., *PLoS One.* 2011 Jan 14;6(1):e15921

(44) CA9 (anhidrasa carbónica IX)

Nucleótido

10

Nº de acceso de Genbank . X66839

Versión de Genbank nº X66839.1 GI:1000701

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:15 AM

15 Polipéptido

Nº de acceso de GenBank CAA47315

Versión de Genbank nº CAA47315.1 GI:1000702

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:15 AM

20

Referencias cruzadas

Pastorek J. y col., *Oncogene* 9 (10), 2877-2888 (1994)

25 Otra información

Símbolo oficial: CA9

Otros pseudónimos: CAIX, MN

30 Otras designaciones: CA-IX; P54/58N; antígeno G250 asociado a RCC; proteína G250 asociada a RCC; carbonato deshidratasa IX; anhidrasa carbónica 9; deshidratasa carbónica; antígeno MN de membrana; pMW1; antígeno G250 asociado a carcinoma de células renales

ANTICUERPOS

35 Abgenix/Amgen: Documento US20040018198

Affibody: moléculas de Affibody anti-CAIX
(<http://www.affibody.com/en/Product-Portfolio/Pipeline/>)

40 Bayer: Documento US7.462.696

Bayer/Morfosys: mAb 3ee9 - Petrul HM. y col., *Mol Cancer Ther.* 2012 Feb;11 (2):340-9

45 Escuela Médica de Harvard: Anticuerpos G10, G36, G37, G39, G45, G57, G106, G119, G6, G27, G40 y G125. Xu C. y col., *PLoS One.* 2010 Mar 10;5(3):e9625

Instituto de Virología, Academia Eslovaca de Ciencias (Bayer) - Documento US5.955.075

50 - por ejemplo, M75 - acceso ATCC nº HB 11128 o MN12 - acceso ATCC nº HB 11647

Instituto de Virología, Academia Eslovaca de Ciencias: Documento US7.816.493

55 - por ejemplo, el anticuerpo monoclonal M75 que es secretado del hibridoma VU-M75, que se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo bajo ATCC nº HB 11128; o el anticuerpo monoclonal V/10 secretado del hibridoma V/10-VU, que se depositó en la Autoridad Depositaria Internacional de la Colección Coordinada Belga de Microorganismos (BCCM) en el Laboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie (LMBP) en la Universeit Gent en Gante, Bélgica, bajo el acceso nº LMBP 6009CB.

60 Instituto de Virología, Academia Eslovaca de Ciencias - Documentos US20080177046; US20080176310; US20080176258; US20050031623

Novartis: Documento US20090252738

Wilex: Documento US7.691.375 - por ejemplo, el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma DSM ASC 2526.

65 Wilex: Documento US20110123537; Rencarex: Kennett RH. y col., *Curr Opin Mol Ther.* 2003 Feb;5(1):70-5

Xencor: Documento US20090162382

(45) *EGFRvIII (receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), variante de transcrito 3,*

Nucleótido

5 N° de acceso de GenBank NM_201283
 Versión de Genbank n° NM_201283.1 GI:41327733
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

Polipéptido

10 N° de acceso de GenBank NP_958440
 Versión de Genbank n° NP_958440.1 GI:41327734
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

15 Referencias cruzadas

Batra SK. y col., *Cell Growth Differ* 1995;6:1251-1259.

ANTICUERPOS:

20 Documentos US7.628.986 y US7.736.644 (Amgen)

Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 142 y variantes y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 144 y variantes.

Documento US20100111979 (Amgen)

30 Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada que comprende:

CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos para la región CDR1 de anticuerpos 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17);

35 CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos para la región CDR2 de anticuerpos 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17); y CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos para la región CDR3 de anticuerpos 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17).

Documento US20090240038 (Amgen)

45 Por ejemplo, un anticuerpo que tiene al menos uno de los polipéptidos de la cadena pesada o ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, y cualquier combinación de los mismos.

50 Documento US20090175887 (Amgen)

Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17).

Documento US20090156790 (Amgen)

60 Por ejemplo, un anticuerpo que tiene el polipéptido de la cadena pesada y una polipéptido de la cadena ligera, en el que al menos uno de los polipéptidos de la cadena pesada o ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, y cualquier combinación de los mismos.

65

Documentos US20090155282, US20050059087 y US20050053608 (Amgen)

5 Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de anticuerpo 13.1.2 (SEQ ID NO: 138), 131 (SEQ ID NO: 2), 170 (SEQ ID NO: 4), 150 (SEQ ID NO: 5), 095 (SEQ ID NO: 7), 250 (SEQ ID NO: 9), 139 (SEQ ID NO: 10), 211 (SEQ ID NO: 12), 124 (SEQ ID NO: 13), 318 (SEQ ID NO: 15), 342 (SEQ ID NO: 16) y 333 (SEQ ID NO: 17).

MR1-1 (documento US7.129.332; Duke)

10 Por ejemplo, un anticuerpo de variante que tiene la secuencia de SEQ ID N° 18 con las sustituciones S98P-T99Y en CDR3 VH y F92W en CDR3 VL.

L8A4, H10, Y10 (Wikstrand C.J. y col., Cancer Res. 1995 Jul 15;55(14):3140-8; Duke)

15 US20090311803 (Universidad de Harvard)

Por ejemplo, SEQ ID NO: 9 para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo y SEQ ID NO: 3 para las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera

20 Documento US20070274991 (EMD72000, también conocido como matuzumab; Universidad de Harvard)

Por ejemplo, SEQ ID NO: 3 y 9 para la cadena ligera y cadena pesada, respectivamente

Documento US6.129.915 (Schering)

25

Por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

mAb CH12 - Wang H. y col., FASEB J. 2012 Jan;26(1):73-80 (Instituto del Cáncer de Shanghai).

30 RABDMVIII - Gupta P. y col., BMC Biotechnol. 2010 Oct 7;10:72 (Centro Médico de la Universidad de Stanford).

mAb Ua30 - Ohman L. y col., Tumour Biol. 2002 Mar-Apr;23(2):61-9 (Universidad de Uppsala).

35 Han DG. y col., Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2010 Jan;30(1):25-9 (Universidad de Xi'an Jiaotong).

(46) CD33 (molécula de CD33)

Nucleótido

40 N° de acceso de GenBank M_23197
Versión de Genbank n° NM_23197.1 GI:180097
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Polipéptido

45 N° de acceso de GenBank AAA51948
Versión de Genbank n° AAA51948.1 GI:188098
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

50 Referencias cruzadas

Simmons D. y col., J. Immunol. 141 (8), 2797-2800 (1988)

Otra información

55 Símbolo oficial: CD33
Otros pseudónimos: SIGLEC-3, SIGLEC3, p67
Otras designaciones: antígeno CD33 (gp67); gp67; antígeno de superficie CD33 de células mieloides; lectina 3 similar a Ig de unión al ácido siálico; lectina similar a Ig de unión al ácido siálico

60

ANTICUERPOS

H195 (lintuzumab) - Raza A. y col., Leuk Lymphoma. 2009 Aug;50(8):1336-44; documento US6.759.045 (Seattle Genetics/Immunomedics)

65

mAb OKT9: Sutherland, D.R. y col., Proc Natl Acad Sci USA 78(7): 4515-4519 1981, Schneider, C. y col., J Biol

Chem 257, 8516-8522 (1982)

mAb E6: Hoogenboom, H.R. y col., J Immunol 144, 3211-3217 (1990)

5 Documento US6.590.088 (Human Genome Sciences)

Por ejemplo, SEQ ID NO: 1 y 2 y nº de acceso de ATCC 97521

Documento US7.557.189 (Immunogen)

10 Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-3 y una región variable de la cadena ligera que comprende tres CDR que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4-6.

15 **(47) CD19 (molécula CD19)**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_001178098

20 Versión de Genbank nº NM_001178098.1 GI:296010920

Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de septiembre de 2012 12:43 AM

Polipéptido

25 Nº de acceso de GenBank NP_001171569

Versión de Genbank nº NP_001171569.1 GI:296010921

Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de septiembre de 2012 12:43 AM

Referencias cruzadas

30 Tedder TF. y col., J. Immunol. 143 (2): 712-7 (1989)

Otra información

35 Símbolo oficial: CD19

Otros pseudónimos: B4, CVID3

Otras designaciones: antígeno CD19 de linfocitos B; antígeno de superficie B4 de linfocitos B; antígeno de superficie Leu-12 de linfocitos T; antígeno CD19 de diferenciación

40 **ANTICUERPOS**

Immunogen: HuB4 - Al-Katib AM. y col., Clin Cancer Res. 2009 Jun 15;15(12):4038-45.

4G7: Kügler M. y col., Protein Eng Des Sel. 2009 Mar;22(3):135-47

45 Por ejemplo, secuencias en la Fig. 3 de Knappik, A. y col., J Mol Biol 2000 Feb;296(1):57-86

AstraZeneca /MedImmune: MEDI-551 - Herbst R. y col., J Pharmacol Exp Ther. 2010 Oct;335(1):213-22

50 Glenmark Pharmaceuticals: GBR-401 - Hou S. y col., Mol Cancer Ther November 2011 10 (suplemento de resúmenes de la reunión) C164

Documento US7.109.304 (Immunomedics)

55 Por ejemplo, un anticuerpo que comprende la secuencia de hA19Vk (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de hA19VH (SEQ ID NO: 10)

Documento US7.902.338 (Immunomedics)

60 Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende las secuencias de CDR de la región determinante de la complementariedad de la cadena ligera CDR1 de SEQ ID NO: 16 (KASQSVYDGDGSDYLN); CDR2 de SEQ ID NO: 17 (DASNLVS); y CDR3 de SEQ ID NO: 18 (QQSTEDPWT) y las secuencias de CDR de la cadena pesada CDR1 de SEQ ID NO: 19 (SYWMN); CDR2 de SEQ ID NO: 20 (QIWPGDGDTNYNGKFKG) y CDR3 de SEQ ID NO: 21 (RETTTVGRRYYAMDY) y también comprende secuencias de la región estructural (FR) y región constante de anticuerpo humano con uno o más restos de aminoácidos de la región estructural sustituidos de las secuencias de la región estructural correspondientes del anticuerpo murino

65

parental, y en el que dichos restos de FR sustituidos comprenden la sustitución de serina por fenilalanina en el resto de Kabat 91 de la región variable de la cadena pesada.

Medarex: MDX-1342 - Cardarelli PM. y col., Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb;59(2):257-65.

5 MorphoSys/Xencor: MOR-208/XmAb-5574 - Zalevsky J. y col., Blood. 2009 Apr 16;113(16):3735-43

Documento US7.968.687 (Seattle Genetics)

10 Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

4G7 chim - Lang P. y col., Blood. 15 de mayo de 2004;103(10):3982-5 (Universidad de Tubingen)

15 Por ejemplo, la Fig. 6 y SEQ ID NO: 80 del documento US20120082664

Escuela de Medicina de la Universidad de Zhejiang: 2E8 - Zhang J. y col., J Drug Target. 2010 Nov;18(9):675-8

20 **(48) IL2RA (receptor de interleucina 2, alfa); secuencia de referencia de NCBI: NM_000417.2);**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_000417

25 Versión de Genbank nº NM_000417.2 GI:269973860

Fecha de actualización del registro de GenBank: 9 de septiembre de 2012 04:59 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_000408

30 Versión de Genbank nº NP_000408.1 GI:4557667

Fecha de actualización del registro de GenBank: 9 de septiembre de 2012 04:59 PM

Referencias cruzadas

35 Kuziel W.A. y col., J. Invest. Dermatol. 94 (6 SUPPL), 27S-32S (1990)

Otra información

40 Símbolo oficial: IL2RA

Otros pseudónimos: RP11-536K7.1, CD25, IDDM10, IL2R, TCGFR

Otras designaciones: subunidad alfa del receptor de FIL-2; IL-2-RA; subunidad alfa de IL-2R; IL2-RA; antígeno TAC; subunidad alfa del receptor de interleucina-2; p55

45 **ANTICUERPOS**

Documento US6.383.487 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect])

Documento US6.521.230 (Novartis/UCL: Baxilisimab [Simulect])

50 Por ejemplo, un anticuerpo que tiene un sitio de unión al antígeno comprende al menos un dominio que comprende CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 7, CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 8 y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 9; o dichos CDR1, CDR2 y CDR3 tomados en secuencia en conjunto comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 7, 8 y 9 tomados en secuencia en conjunto.

Daclizumab - Rech AJ. y col., Ann N Y Acad Sci. 2009 Sep;1174:99-106 (Roche)

60 **(49) AXL (tirosina cinasa de receptor de AXL)**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank M76125

65 Versión de Genbank nº M76125.1 GI:292869

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:53 AM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAA61243

Versión de Genbank nº AAA61243.1 GI:29870

5 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:53 AM

Referencias cruzadas

10 O'Bryan J.P. y col., Mol. Cell. Biol. 11 (10), 5016-5031 (1991); Bergsagel P.L. y col., J. Immunol. 148 (2), 590-596 (1992)

Otra información

Símbolo oficial: AXL

15 Otros pseudónimos: JTK11, UFO

Otras designaciones: oncogén AXL; secuencia/gen transformante de AXL; oncogén AXL; receptor UFO de proteína tirosina-cinasa

ANTICUERPOS

20 YW327.6S2 - Ye X. y col., Oncogene. 2010 Sep 23;29(38):5254-64. (Genentech)

BergenBio: BGB324 (<http://www.bergenbio.com/BGB324>)

25 **(50) CD30 - TNFRSF8 (superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 8)**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank M83554

30 Versión de Genbank nº M83554.1 GI:180095

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:53 AM

Polipéptido

35 Nº de acceso de GenBank AAA51947

Versión de Genbank nº AAA51947.1 GI:180096

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:53 AM

Referencias cruzadas

40 Durkop H. y col., Cell 68 (3), 421-427 (1992)

Otra información

45 Símbolo oficial: TNFRSF8

Otros pseudónimos: CD30, D1S166E, Ki-1

Otras designaciones: receptor de CD30L; antígeno Ki-1; receptor de CD30 de citocina; antígeno CD30 de activación de linfocitos; superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, miembro 8

50 **(51) BCMA (antígeno de maduración de linfocitos B) - TNFRSF17 (superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral, miembro 17)**

Nucleótido

55 Nº de acceso de GenBank Z29574

Versión de Genbank nº Z29574.1 GI:471244

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:40 AM

Polipéptido

60

Nº de acceso de GenBank CAA82690

Versión de Genbank nº CAA82690.1 GI:471245

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:40 AM

65

Referencias cruzadas

Laabi Y. y col., Nucleic Acids Res. 22 (7), 1147-1154 (1994)

5 Otra información

Símbolo oficial: TNFRSF17

Otros pseudónimos: BCM, BCMA, CD269

10 Otras designaciones: antígeno de maduración de linfocitos B; factor de maduración de linfocitos B; proteína de maduración de linfocitos B; superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, miembro 17

(52) Ag de CT - CTA (antígenos testiculares de cáncer)

Referencias cruzadas

15

Fratta E. y col., Mol Oncol. 2011 Apr;5(2):164-82; Lim SH. y col., Am J Blood Res. 2012;2(1):29-35.

(53) CD 174 (Lewis Y) - FUT3 (fucosiltransferasa 3 (galactósido 3(4)-L-fucosiltransferasa, grupo sanguíneo de Lewis)

20

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM000149

Versión de Genbank nº NM000149.3 GI:148277008

25 Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 04:49 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_000140

30 Versión de Genbank nº NP_000140.1 GI:4503809

Fecha de actualización del registro de GenBank: 26 de junio de 2012 04:49 PM

Referencias cruzadas

35 Kukowska-Latallo, J.F. y col., Genes Dev. 4 (8), 1288-1303 (1990)

Otra información

Símbolo oficial: FUT3

40 Otros pseudónimos: CD174, FT3B, FucT-III, LE, Les

Otras designaciones: FT de Lewis; alfa-(1,3/1,4)-fucosiltransferasa; grupo sanguíneo Lewis alfa-4-fucosiltransferasa; fucosiltransferasa III; galactósido 3(4)-L-fucosiltransferasa

(54) CLEC14A (familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro A; nº de acceso de GenBank NM175060)

45

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM175060

Versión de Genbank nº NM175060.2 GI:371123930

50 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de abril de 2012 03:34 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_778230

55 Versión de Genbank nº NP_778230.1 GI:28269707

Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de abril de 2012 03:34 PM

Otra información

60 Símbolo oficial: CLEC14A

Otros pseudónimos: UNQ236/PRO269, C14orf27, CEG1, EGFR-5

Otras designaciones: familia 14 del dominio de lectina tipo C, miembro A; proteína que contiene dominio similar a CIECT y EGF; receptor 5 del factor de crecimiento epidérmico

65 **(55) GRP78 - HSPA5 (proteína 5 de 70 kDa de choque térmico (proteína regulada por glucosa, 78 kDa)**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM005347

Versión de Genbank nº NM005347.4 GI:305855105

5 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:42 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_005338

10 Versión de Genbank nº NP_005338.1 GI:16507237

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:42 PM

Referencias cruzadas

15 Ting J. y col., DNA 7 (4), 275-286 (1988)

Otra información

Símbolo oficial: HSPA5

20 Otros pseudónimos: BIP, GRP78, MIF2

Otras designaciones: proteína de 78 kDa regulada por glucosa; proteína de unión grp78 al Ca(2+) de la luz del retículo endoplásmico; proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina

(56) CD70 (molécula CD70) L08096

25

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank L08096

Versión de Genbank nº L08096.1 GI:307127

30 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2012 08:54 AM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAA36175

35 Versión de Genbank nº AAA36175.1 GI:307128

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2012 08:54 AM

Referencias cruzadas

40 Goodwin R.G. y col., Cell 73 (3), 447-456 (1993)

Otra información

Símbolo oficial: CD70

45 Otros pseudónimos: CD27L, CD27LG, TNFSF7

Otras designaciones: ligando CD27; CD27-L; antígeno CD70; antígeno Ki-24; antígeno de superficie CD70; superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 7; superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral, miembro 7

50 **ANTICUERPOS**

MDX-1411 contra CD70 (Medarex)

h1 F6 (Ofazoglu, E. y col., Clin Cancer Res. 2008 Oct 1;14(19):6171-80; Seattle Genetics)

55

Por ejemplo, véase el documento US20060083736 SEQ ID NO: 1, 2, 11 y 12 y la Fig. 1.

(57) *Antígenos específicos de células madre. Por ejemplo:*

- 60
- 5T4 (véase la entrada (63) más adelante)
 - CD25 (véase la entrada (48) anteriormente)
 - CD32
 - Polipéptido

65

- Nº de acceso de GenBank ABK42161

ES 2 738 310 T3

- Versión de Genbank nº ABK42161.1 GI:117616286
- Fecha de actualización del registro de GenBank: 25 de julio de 2007 03:00 PM

- LGR5/GPR49

5

- Nucleótido

- Nº de acceso de GenBank NM_003667
- Versión de Genbank nº NM_003667.2 GI:24475886
- Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 03:38 PM

10

- Polipéptido

- Nº de acceso de GenBank NP_003658
- Versión de Genbank nº NP_003658.1 GI:4504379
- Fecha de actualización del registro de GenBank: 22 de julio de 2012 03:38 PM

15

- Prominina/CD133

20

- Nucleótido

- Nº de acceso de GenBank NM_006017
- Versión de Genbank nº NM_006017.2 GI:224994187
- Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

25

- Polipéptido

- Nº de acceso de GenBank NP_006008
- Versión de Genbank nº NP_006008.1 GI:5174387
- Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

30

(58) ASG-5

Referencias cruzadas

35

(Smith L.M. y col., *AACR 2010 Annual Meeting* (resumen nº 2590); Gudas J.M. y col., *AACR 2010 Annual Meeting* (resumen nº 4393))

ANTICUERPOS

40

Anticuerpo anti-AGS-5: M6.131 (Smith, L.M. y col., *AACR 2010 Annual Meeting* (resumen nº 2590))

(59) ENPP3 (pirofosfatasa/ fosfodiesterasa 3 de ectonucleótido)

45

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank AF005632
Versión de Genbank nº AF005632.2 GI:4432589
Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 09:41 PM

50

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAC51813
Versión de Genbank nº AAC51813.1 GI:2465540
Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 09:41 PM

55

Referencias cruzadas

Jin-Hua P. y col., *Genomics* 45 (2), 412-415 (1997)

60

Otra información

Símbolo oficial: ENPP3
Otros pseudónimos: RP5-988G15.3, B10, CD203c, NPP3, PD-IBETA, PDNP3
Otras designaciones: E-NPP 3; dJ1005H11.3 (fosfodiesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 3); dJ914N13.3

65

(fosfodiesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 3); miembro 3 de la familia de ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; gp130RB13-6; fosfodiesterasa I beta; fosfodiesterasa I/nucleótido pirofosfatasa 3; fosfodiesterasa-I beta

5 **(60) PRR4 (4 rica en prolina (lacrimal))**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_007244

10 Versión de Genbank nº NM_007244.2 GI:154448885

Fecha de actualización del registro de GenBank: 28 de junio de 2012 12:39 PM

Polipéptido

15 Nº de acceso de GenBank NP_009175

Versión de Genbank nº NP_009175.2 GI:154448886

Fecha de actualización del registro de GenBank: 28 de junio de 2012 12:39 PM

Referencias cruzadas

20

Dickinson D.P. y col., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36 (10), 2020-2031 (1995)

Otra información

25 Símbolo oficial: PRR4

Otros pseudónimos: LPRP, PROL4

Otras designaciones: proteína rica en prolina lacrimal; proteína 4 rica en prolina asociada a carcinoma nasofaríngeo; polipéptido 4 rico en prolina; proteína 4 rica en prolina

30 **(61) GCC - GUCY2C (guanilato ciclasa 2C (receptor de enterotoxina estable al calor))**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_004963

35 Versión de Genbank nº NM_004963.3 GI:222080082

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:50 PM

Polipéptido

40 Nº de acceso de GenBank NP_004954

Versión de Genbank nº NP_004954.2 GI:222080083

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de septiembre de 2012 01:50 PM

Referencias cruzadas

45

De Sauvage F.J. y col., J. Biol. Chem. 266 (27), 17912-17918 (1991); Singh S. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 179 (3), 1455-1463 (1991)

Otra información

50

Símbolo oficial: GUCY2C

Otros pseudónimos: DIAR6, GUC2C, MUCIL, STAR

Otras designaciones: GC-C; receptor de STA; guanilil ciclasa C; hSTAR; receptor de enterotoxina estable al calor; guanilato ciclasa intestinal

55

(62) Liv-1- SLC39A6 (familia 39 de transportadores de solutos (transportador de cinc), miembro 6)

Nucleótido

60 Nº de acceso de GenBank U41060

Versión de Genbank nº U41060.2 GI:12711792

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de noviembre de 2009 04:35 PM

Polipéptido

65

Nº de acceso de GenBank AAA96258

Versión de Genbank nº AAA96258.2 GI:12711793

Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de noviembre de 2009 04:35 PM

Referencias cruzadas

5 Taylor KM. y col., Biochim Biophys Acta. 2003 Apr 1;1611(1-2):16-30

Otra información

10 Símbolo oficial: SLC39A6

Otros pseudónimos: LIV-1

Otras designaciones: proteína LIV-1, regulada por estrógeno; ZIP-6; proteína LIV-1 regulada por estrógeno; familia 39 de transportadores de solutos (transportador de ión metálico), miembro 6; familia de transportadores de solutos 39 miembro 6; transportador de cinc ZIP6; proteína 6 similar a zrt- y lrt

15 **(63) 5T4, glucoproteína de trofoblastos, TPBG - TPBG (glucoproteína de trofoblastos)**

Nucleótido

20 Nº de acceso de GenBank AJ012159

Versión de Genbank nº AJ012159.1 GI:3805946

Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 10:27 AM

Polipéptido

25 Nº de acceso de GenBank CAA09930

Versión de Genbank nº CAA09930.1 GI:3805947

Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 10:27 AM

30 Referencias cruzadas

King K.W. y col., Biochim. Biophys. Acta 1445 (3), 257-270 (1999)

Otra información

35

- Símbolo oficial: TPBG
- Otros pseudónimos: 5T4, 5T4AG, M6P1
- Otras designaciones: antígeno oncofetal 5T4; glucoproteína de trofoblastos oncofetales 5T4; glucoproteína de oncotrofoblastos 5T4

40 **(64) CD56 - NCMA1 (molécula 1 de adhesión a células neurales)**

Nucleótido

45 Nº de acceso de GenBank NM_000615

Versión de Genbank nº NM_000615.6 GI:336285433

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:32 PM

Polipéptido

50 Nº de acceso de GenBank NP_000606

Versión de Genbank nº NP_000606.3 GI:94420689

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:32 PM

55 Referencias cruzadas

Dickson, G. y col., Cell 50 (7), 1119-1130 (1987)

Otra información

60 Símbolo oficial: NCAM1

Otros pseudónimos: CD56, MSK39, NCAM

Otras designaciones: antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 5.1H11; molécula de adhesión a células neurales, NCAM

65

ANTICUERPOS

Immunogen: HuN901 (Smith SV. y col., *Curr Opin Mol Ther.* 2005 Aug;7(4):394-401)

- 5 Por ejemplo, véase humanizado de anticuerpo N901 murino. Véase la Fig. 1b y 1e de Roguska, M.A. y col., *Proc Natl Acad Sci USA* Feb 1994;91:969-973.

(65) CanAg (antígeno asociado a tumor CA242)

10 Referencias cruzadas

Haglund C. y col., *Br J Cancer* 60:845-851, 1989; Baeckstrom D. y col., *J Biol Chem* 266:21537-21547, 1991

ANTICUERPOS

- 15 huC242 (Tolcher AW y col., *J Clin Oncol.* 2003 Jan 15;21(2):211-22; Immunogen)

Por ejemplo, véase el documento US20080138898A1 SEQ ID NO: 1 y 2

20 **(66) FOLR1 (receptor 1 de folato)**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank J05013

- 25 Versión de Genbank nº J05013.1 GI:182417

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Polipéptido

- 30 Nº de acceso de GenBank AAA35823

Versión de Genbank nº AAA35823.1 GI:182418

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 AM

Referencias cruzadas

- 35 Elwood P.C. y col., *J. Biol. Chem.* 264 (25), 14893-14901 (1989)

Otra información

- 40 Símbolo oficial: FOLR1

Otros pseudónimos: FBP, FOLR

Otras designaciones: FR-alfa; células KB FBP; proteína de unión a folato adulta; proteína de unión a folato; receptor alfa de folato; receptor de folato, adulto; antígeno MOV18 asociado a tumor de ovario

45 **ANTICUERPOS**

M9346A - Whiteman KR. y col., *Cancer Res* April 15, 2012; 72(8 Supplement): 4628 (Immunogen)

(67) GPNMB (glucoproteína (transmembrana) nmb)

- 50

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank X76534

Versión de Genbank nº X76534.1 GI:666042

- 55 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:10 AM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank CAA54044

- 60 Versión de Genbank nº CAA54044.1 GI:666043

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:10 AM

Referencias cruzadas

- 65 Weterman M.A. y col., *Int. J. Cancer* 60 (1), 73-81 (1995)

Otra información

Símbolo oficial: GPNMB

Otros pseudónimos: UNQ1725/PRO9925, HGFIN, NMB

- 5 Otras designaciones: glucoproteína NMB; proteína similar a nmb de glucoproteína; osteoactivina; HGFIN de transmembrana de glucoproteína; NMB de transmembrana de glucoproteína

ANTICUERPOS

- 10 Celldex Therapeutics: CR011 (Tse KF. y col., *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 15;12(4):1373-82)

Por ejemplo, véase el documento EP1827492B1 SEQ ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 y 35

(68) TIM-1 - HAVCR1 (receptor 1 celular del virus de la hepatitis A)

15

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank AF043724

Versión de Genbank nº AF043724.1 GI:2827453

- 20 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 06:24 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAC39862

Versión de Genbank nº AAC39862.1 GI:2827454

- 25 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 06:24 PM

Referencias cruzadas

- 30 Feiglstock D. y col., *J. Virol.* 72 (8), 6621-6628 (1998)

Otra información

Símbolo oficial: HAVCR1

- 35 Otros pseudónimos: HAVCR, HAVCR-1, KIM-1, KIM1, TIM, TIM-1, TIM1, TIMD-1, TIMD1

Otras designaciones: proteína 1 del dominio de inmunoglobulina y dominio de mucina de linfocitos T; proteína 1 de la membrana de linfocitos T; molécula 1 de lesión renal

(69) RG-1/Mindina diana de tumor de la próstata - Mindina/RG-1

40

Referencias cruzadas

Parry R. y col., *Cancer Res.* 2005 Sep 15;65(18):8397-405

- 45 **(70) B7-H4 - VTCN1 (inhibidor 1 de la activación de linfocitos T que contienen el dominio del conjunto V)**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank BX648021

Versión de Genbank nº BX648021.1 GI:34367180

- 50 Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 08:40 AM

Referencias cruzadas

- 55 Sica GL. y col., *Immunity.* 2003 Jun;18(6):849-61

Otra información

Símbolo oficial: VTCN1

- 60 Otros pseudónimos: RP11-229A19.4, B7-H4, B7H4, B7S1, B7X, B7h.5, PRO1291, VTCN1

Otras designaciones: miembro de la familia B7, H4; miembro 1 de la superfamilia B7; molécula coestimulante B7x de linfocitos T; molécula co-estimulante B7x de linfocitos T; inhibidor 1 de la activación de linfocitos T que contienen el dominio del conjunto V; proteína B7-H4 inmunocoestimulante

- 65 **(71) PTK7 (proteína tirosina cinasa 7 PTK7)**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank AF447176
 Versión de Genbank nº AF447176.1 GI:17432420
 5 Fecha de actualización del registro de GenBank: 28 de noviembre de 2008 01:51 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAL39062
 10 Versión de Genbank nº AAL39062.1 GI:17432421
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 28 de noviembre de 2008 01:51 PM

Referencias cruzadas

15 Park S.K. y col., J. Biochem. 119 (2), 235-239 (1996)

Otra información

Símbolo oficial: PTK7
 20 Otros pseudónimos: CCK-4, CCK4
 Otras designaciones: cinasa 4 de carcinoma de colon; proteína tirosina-cinasa 7 inactiva; receptor 7 de pseudo-tirosina cinasa; 7 similar a la proteína tirosina-cinasa

(72) CD37 (molécula CD37)

25

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_001040031
 Versión de Genbank nº NM_001040031.1 GI:91807109
 30 Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de julio de 2012 02:08 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_001035120
 35 Versión de Genbank nº NP_001035120.1 GI:91807110
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de julio de 2012 02:08 PM

Referencias cruzadas

40 Schwartz-Albiez R. y col., J. Immunol. 140 (3), 905-914 (1988)

Otra información

Símbolo oficial: CD37
 45 Otros pseudónimos: GP52-40, TSPAN26
 Otras designaciones: antígeno CD37; antígeno 37 de diferenciación celular; antígeno CD37 de leucocitos; antígeno CD37 de superficie de leucocitos; tetraspanina-26; tspan-26

ANTICUERPOS

50

Boehringer Ingelheim: mAb 37.1 (Heider KH. y col., Blood. 2011 Oct 13;118(15):4159-68)

Trubion: CD37-SMIP (G28-1 scFv-Ig) (Zhao X. y col., Blood. 2007;110: 2569-2577)
 Por ejemplo, véase el documento US20110171208A1 SEQ ID NO: 253

55

Immunogen: K7153A (Deckert J. y col., Cancer Res April 15, 2012; 72(8 Supplement): 4625)

(73) CD138 - SDC1 (sindecano 1)

60

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank AJ551176
 Versión de Genbank nº AJ551176.1 GI:29243141
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 12:09 PM

65

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank CAD80245

Versión de Genbank nº CAD80245.1 GI:29243142

5 Fecha de actualización del registro de GenBank: 1 de febrero de 2011 12:09 PM

Referencias cruzadas

O'Connell FP. y col., Am J Clin Pathol. 2004 Feb;121 (2):254-63

10

Otra información

Símbolo oficial: SDC1

Otros pseudónimos: CD138, SDC, SYND1, sindecano

15 Otras designaciones: antígeno CD138; receptor del factor de crecimiento de fibroblastos de proteoglicanos de sulfato de heparano; proteoglicano 1 de sindecano; sindecano-1

ANTICUERPOS

20 Biotest: MAb quimerizado (nBT062) - (Jagannath S. y col., Poster ASH #3060, 2010;

solicitud de patente WIPO WO/2010/128087)

Por ejemplo, véase el documento US20090232810 SEQ ID NO: 1 y 2

25

Immunogen: B-B4 (Tassone P. y col., Blood 104_3688-3696)

Por ejemplo, véase el documento US20090175863A1 SEQ ID NO: 1 y 2

30 **(74) CD74 (molécula CD74, complejo mayor de histocompatibilidad, cadena invariante de clase II)**

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_004355

35 Versión de Genbank nº NM_004355.1 GI:343403784

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:30 PM

Polipéptido

40 Nº de acceso de GenBank NP_004346

Versión de Genbank nº NP_004346.1 GI:10835071

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:30 PM

Referencias cruzadas

45

Kudo, J. y col., Nucleic Acids Res. 13 (24), 8827-8841 (1985)

Otra información

50 Símbolo oficial: CD74

Otros pseudónimos: DHLAG, HLADG, II, Ia-GAMMA

Otras designaciones: antígeno CD74 (polipéptido invariante del complejo mayor de histocompatibilidad, asociado al antígeno de clase II); cadena gamma del antígeno de histocompatibilidad de clase II de HLA; cadena invariante asociada a antígenos de HLA-DR; HLA-DR-gamma; cadena invariante asociada a Ia; cadena gamma de HLA-DR del MHC; cadena gamma de antígenos de clase II; p33

55

ANTICUERPOS

Immunomedics: hLL1 (Milatuzumab.) - Berkova Z. y col., Expert Opin Investig Drugs. 2010 Jan;19(1):141-9)

60

Por ejemplo, véase el documento US20040115193 SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23 y 24

Genmab: HuMax-CD74 (véase el sitio web)

65 **(75) Claudinas - CL (Claudinas)**

Referencias cruzadas

Offner S. y col., Cancer Immunol Immunother. 2005 May; 54(5):431-45, Suzuki H. y col., Ann N Y Acad Sci. 2012 Jul;1258:65-70)

5 En seres humanos, se han descrito 24 miembros de la familia - véase la referencia bibliográfica.

(76) EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico)

10 Nucleótido

Nº de acceso de GenBank NM_005228
 Versión de Genbank nº NM_005228.3 GI:41927737
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

15 Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_005219
 Versión de Genbank nº NP_005219.2 GI:29725609
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:47 PM

Referencias cruzadas

25 Dhomen NS. y col., Crit Rev Oncog. 2012;17(1):31-50

Otra información

Símbolo oficial: EGFR
 Otros pseudónimos: ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA
 30 Otras designaciones: homólogo del oncogén viral de la leucemia eritroblástica aviar (v-erb-b); proteína 40 inhibidora del crecimiento celular; proteína 61 inductora de proliferación celular; proto-oncogén c-ErbB-1; proteína tirosinasa de receptor erbB-1

ANTICUERPOS

35 BMS: Cetuximab (Erbix) - Broadbridge VT. y col., Expert Rev Anticancer Ther. 2012 May;12(5):555-65.
 Por ejemplo, véase el documento US6217866 - depósito ATTC nº 9764.

40 Amgen: Panitumumab (Vectibix) - Argiles G. y col., Future Oncol. 2012 Apr;8(4):373-89
 Por ejemplo, véase el documento US6235883 SEQ ID NO: 23-38.

Genmab: Zalutumumab - Rivera F. y col., Expert Opin Biol Ther. 2009 May;9(5):667-74.

45 YM Biosciences: Nimotuzumab - Ramakrishnan MS. y col., MAbs. 2009 Jan-Feb;1(1):41-8.
 Por ejemplo, véase el documento US5891996 SEQ ID NO: 27-34.

(77) Her3 (ErbB3) - ERBB3 (homólogo 3 (aviar) del oncogén viral de la leucemia eritroblástica v-erb-b2)

Nucleótido

50 Nº de acceso de GenBank M34309
 Versión de Genbank nº M34309.1 GI:183990
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 PM

55 Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAA35979
 Versión de Genbank nº AAA35979.1 GI:306841
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:47 PM

60 Referencias cruzadas

Plowman, G. D. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (13), 4905-4909 (1990)

65

Otra información

Símbolo oficial: ERBB3

Otros pseudónimos: ErbB-3, HER3, LCCS2, MDA-BF-1, c-erbB-3, c-erbB3, erbB3-S, p180-ErbB3, p45-sErbB3, p85-sErbB3

Otras designaciones: proteína c-ErbB-3 similar a proto-oncogén; proteína tirosina-cinasa erbB-3 de receptor; receptor HER3 de la superficie celular tipo tirosina cinasa

ANTICUERPOS

Merimack Pharma: MM-121 (Schoeberl B. y col., Cancer Res. 2010 Mar 15;70(6):2485-2494)
Por ejemplo, véase el documento US2011028129 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

(78) RON - MST1R (receptor 1 estimulante de macrófagos (tirosina cinasa relacionada con c-met))

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank X70040

Versión de Genbank nº X70040.1 GI:36109

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:17 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank CCA49634

Versión de Genbank nº CCA49634.1 GI:36110

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:17 PM

Referencias cruzadas

Ronsin C. y col., Oncogene 8 (5), 1195-1202 (1993)

Otra información

Símbolo oficial: MST1 R

Otros pseudónimos: CD136, CDw136, PTK8, RON

Otras designaciones: receptor de MSP; variante de MST1 R RON30; variante de MST1 R RON62; proteína tirosina cinasa 8 PTK8; variante de RON E2E3; tirosina cinasa relacionada con c-met; receptor de la proteína estimulante de macrófagos; p185-Ron; variante 1 de RON soluble; variante 2 de RON soluble; variante 3 de RON soluble; variante 4 de RON soluble

(79) EPHA2 (receptor A2 de EPH)

Nucleótido

Nº de acceso de GenBank BC037166

Versión de Genbank nº BC037166.2 GI:33879863

Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 01:59 PM

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAH37166

Versión de Genbank nº AAH37166.1 GI:22713539

Fecha de actualización del registro de GenBank: 6 de marzo de 2012 01:59 PM

Referencias cruzadas

Strausberg R.L. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 (26), 16899-16903 (2002)

Otra información

Símbolo oficial: EPHA2

Otros pseudónimos: ARCC2, CTPA, CTPP1, ECK

Otras designaciones: receptor 2 de efrina tipo A; proteína tirosina cinasa de receptor de células epiteliales; variante 1 de EPHA2 soluble; receptor ECK de la proteína tirosina-cinasa

ANTICUERPOS

Medimmune: 1C1 (Lee JW. y col., Clin Cancer Res. 2010 May 1;16(9):2562-2570)

5 Por ejemplo, véase el documento US20090304721A1 Fig. 7 y 8.

(80) CD20 - MS4A 1 (4 dominios que atraviesan la membrana, subfamilia A, miembro 1)

Nucleótido

10 N° de acceso de GenBank M27394
 Versión de Genbank n° M27394.1 GI:179307
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de noviembre de 2009 11:16 AM

15 Polipéptido

N° de acceso de GenBank AAA35581
 Versión de Genbank n° AAA35581.1 GI:179308
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de noviembre de 2009 11:16 AM

20 Referencias cruzadas

Tedder T.F. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1), 208-212 (1988)

25 Otra información

Símbolo oficial: MS4A1
 Otros pseudónimos: B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7
 Otras designaciones: antígeno CD20 de linfocitos B; antígeno B1 de la superficie celular de linfocitos B; antígeno
 30 CD20; receptor de CD20; antígeno Leu-16 de superficie de leucocitos

ANTICUERPOS

Genentech/Roche: Rituximab - Abdulla NE. y col., BioDrugs. 2012 Apr 1;26(2):71-82.
 35 Por ejemplo, véase el documento US5736137, n° de depósito ATCC HB-69119.

GSK/Genmab: Ofatumumab - Nightingale G. y col., Ann Pharmacother. 2011 Oct;45(10):1248-55.
 Por ejemplo, véase el documento US20090169550A1 SEQ ID NO: 2, 4 y 5.

40 Immunomedics: Veltuzumab - Goldenberg DM. y col., Leuk Lymphoma. 2010 May;51(5):747-55.
 Por ejemplo, véase el documento US7919273B2 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

(81) Tenascina C - TNC (tenascina C)

45 Nucleótido

N° de acceso de GenBank NM_002160
 Versión de Genbank n° NM_002160.3 GI:340745336
 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:33 PM

50 Polipéptido

N° de acceso de GenBank NP_002151
 Versión de Genbank n° NP_002151.2 GI:153946395
 55 Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de septiembre de 2012 02:33 PM

Referencias cruzadas

60 Nies D.E. y col., J. Biol. Chem. 266 (5), 2818-2823 (1991); Siri A. y col., Nucleic Acids Res. 19 (3), 525-531 (1991)

Otra información

Símbolo oficial: TNC
 Otros pseudónimos: 150-225, GMEM, GP, HXB, JI, TN, TN-C
 65 Otras designaciones: GP 150-225; citotactina; antígeno de la matriz extracelular asociado a glioma; hexabraquiona
 (tenascina); antígeno miotendinoso; neuronectina; tenascina; isoforma 14/AD1/16 de tenascina-C

ANTICUERPOS

Philogen: G11 (von Lukowicz T. y col., J Nucl Med. 2007 Apr;48(4):582-7) y F16 (Pedretti M. y col., Lung Cancer. 2009 Apr;64(1):28-33)

5 Por ejemplo, véase el documento US7968685 SEQ ID NO: 29, 35, 45 y 47.

(82) FAP (proteína de activación de fibroblastos, alfa)

Nucleótido

10

Nº de acceso de GenBank U09278
Versión de Genbank nº U09278.1 GI:1888315
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 09:22 AM

15 Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAB49652
Versión de Genbank nº AAB49652.1 GI:1888316
Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 09:22 AM

20

Referencias cruzadas

Scanlan, M.J. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (12), 5657-5661 (1994)

25 Otra información

Símbolo oficial: FAP
Otros pseudónimos: DPPIV, FAPA
Otras designaciones: gelatinasa de 170 kDa unida a membrana de melanoma; serina proteasa de membrana integral; seprasa

30

(83) DKK-1 (homólogo de Dickkopf 1 (*Xenopus laevis*))

Nucleótido

35

Nº de acceso de GenBank NM_012242
Versión de Genbank nº NM_012242.2 GI:61676924
Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:48 PM

40 Polipéptido

Nº de acceso de GenBank NP_036374
Versión de Genbank nº NP_036374.1 GI:7110719
Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:48 PM

45

Referencias cruzadas

Fedi P. y col., J. Biol. Chem. 274 (27), 19465-19472 (1999)

50 Otra información

Símbolo oficial: DKK1
Otros pseudónimos: UNQ492/PRO1008, DKK-1, SK
Otras designaciones: proteína 1 relacionada con dickkopf; similar a dickkopf-1; proteína 1 similar a dickkopf; proteína 1 relacionada con dickkopf; hDkk-1

55

ANTICUERPOS

Novartis: BHQ880 (Fulciniti M. y col., Blood. 2009 Jul 9;114(2):371-379)
Por ejemplo, véase el documento US20120052070A1 SEQ ID NO: 100 y 108.

60

(84) CD52 (molécula CD52)

Nucleótido

65

Nº de acceso de GenBank NM_001803

Versión de Genbank nº NM_001803.2 GI:68342029
Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:48 PM

Polipéptido

5 N° de acceso de GenBank NP_001794
Versión de Genbank nº NP_001794.2 GI:68342030
Fecha de actualización del registro de GenBank: 30 de septiembre de 2012 01:48 PM

10 Referencias cruzadas

Xia M.Q. y col., Eur. J. Immunol. 21 (7), 1677-1684 (1991)

Otra información

15 Símbolo oficial: CD52
Otros pseudónimos: CDW52
Otras designaciones: antígeno CAMPATH-1; antígeno CD52 (antígeno CAMPATH-1); antígeno CDW52 (antígeno CAMPATH-1); antígeno 1 de la patología de cambridge; proteína E5 secretora epididimal; he5; proteína 5 específica de epididimis humana

20

ANTICUERPOS

Alemtuzumab (Campath) - Skoetz N. y col., Cochrane Database Syst Rev. 2012 Feb 15;2:CD008078.
Por ejemplo, véase el nº de acceso a DrugBank DB00087 (BIOD00109, BTD00109)

25

(85) CS1 - SLAMF7 (miembro 7 de la familia de SLAM)

Nucleótido

30 N° de acceso de GenBank NM_021181
Versión de Genbank nº NM_021181.3 GI:1993571
Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de junio de 2012 11:24 AM

Polipéptido

35 N° de acceso de GenBank NP_067004
Versión de Genbank nº NP_067004.3 GI:19923572
Fecha de actualización del registro de GenBank: 29 de junio de 2012 11:24 AM

40 Referencias cruzadas

Boles K.S. y col., Immunogenetics 52 (3-4), 302-307 (2001)

45 Otra información

Símbolo oficial: SLAMF7
Otros pseudónimos: UNQ576/PRO1138, 19A, CD319, CRACC, CS1
Otras designaciones: proteína 19A24; subconjunto 1 de CD2; células citotóxicas activantes del receptor similar a CD2; células citotóxicas activantes del receptor similar a CD2; proteína FOAP-12 de la membrana; proteína similar a LY9 novedoso (antígeno 9 de linfocitos); proteína 19A

50

ANTICUERPOS

BMS: elotuzumab/HuLuc63 (Benson DM. y col., J Clin Oncol. 2012 Jun 1;30(16):2013-2015)
Por ejemplo, véase el documento US20110206701 SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16.

(86) Endoglina - ENG (endoglina)

Nucleótido

60 N° de acceso de GenBank AF035753
Versión de Genbank nº AF035753.1 GI:3452260
Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 06:36 PM

65

Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAC32802

Versión de Genbank nº AAC32802.1 GI:3452261

5 Fecha de actualización del registro de GenBank: 10 de marzo de 2010 06:36 PM

Referencias cruzadas

Rius C. y col., Blood 92 (12), 4677-4690 (1998)

10 Símbolo oficial: ENG

Otra información

Otros pseudónimos: RP11-228B15.2, CD105, END, HHT1, ORW, ORW1

15 Otras designaciones: antígeno CD105

(87) Anexina A1 - ANXA1 (anexina A1)

Nucleótido

20

Nº de acceso de GenBank X05908

Versión de Genbank nº X05908.1 GI:34387

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:02 AM

25 Polipéptido

Nº de acceso de GenBank CCA29338

Versión de Genbank nº CCA29338.1 GI:34388

Fecha de actualización del registro de GenBank: 2 de febrero de 2011 10:02 AM

30

Referencias cruzadas

Wallner B.P. y col., Nature 320 (6057), 77-81 (1986)

35 Otra información

Símbolo oficial: ANXA1

Otros pseudónimos: RP11-71A24,1, ANX1, LPC1

Otras designaciones: anexina I (lipocortina I); anexina-1; calpactina II; calpactina-2; cromobindina-9; lipocortina I; p35; proteína inhibidora de fosfolipasa A2

40

(88) V-CAM (CD106) - VCAM1 (molécula 1 de adhesión a células vasculares)

Nucleótido

45

Nº de acceso de GenBank M60335

Versión de Genbank nº M60335.1 GI:340193

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:56 AM

50 Polipéptido

Nº de acceso de GenBank AAA61269

Versión de Genbank nº AAA61269.1 GI:340194

Fecha de actualización del registro de GenBank: 23 de junio de 2010 08:56 AM

55

Referencias cruzadas

Hession C. y col., J. Biol. Chem. 266 (11), 6682-6685 (1991)

60 Otra información

Símbolo oficial VCAM1

Otros pseudónimos: CD106, INCAM-100

Otras designaciones: antígeno CD106; proteína 1 de adhesión a células vasculares

65

Secuencias de anticuerpos

Anti-Integrina $\alpha v \beta 6$

5 RHAB6.2

QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGFAFTDSYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENGDE
YAPKFQGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAG
PYPFDYWGQGLTVTVSS

RHCB6.2

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFIDSYMHWRQAPGQRLEWMGWIDPENGDE
YAPKFQGRVTITDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVAG
PYPFDYWGQGLTVTVSS

RHF

15 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNFIDSYMHWRQAPGQRLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCNEGTPTPYFDYWGQGLTVTV
SS

RHFB6

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFNFIDSYMHWRQAPGQRLEWMGWIDPENGDT
EYAPKFQGRVFTTDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCNEGTPTAVPNLRGDLQVLAQKVA
GPYYFDYWGQGLTVTVSS

RHAY100bP

25 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGFAFTDSYMHWRQAPGQGLEWMGWIDPENGDE
YAPKFQGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRGTPTGPYPFDYWGQGLTVTVSS

RKF

30 ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKFL36L50

ENVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWLQQKPGQAPRLLIYLTSNLASGIPDRF
SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

RKC

35 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSASSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPDRFS
GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIK

Anti-CD33

CD33 Hum195 VH

40 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYNMHWRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTG
YNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSED TAVYYCARGRPAMDYWGQGLTVTVSS

CD33 Hum195 VK

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASESVDNYGISFMNWFQKPKGKAPKLLIYAASNQGS
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK

5 *Anti-CD19*

VH acondicionada superficialmente de CD19 B4

QVQLVQPGAIEVVKPGASVKLSCKTSGYTFSTNWMHWKQRPQGGLWIGWIDPSDSYTN
YNQNFKGGKAKLTVDKSTSTAYMEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYAMDYWGQGTSTV
SS

10

VK acondicionada superficialmente de CD19 B4

EIVLTQSPAISASPGERVMTCSASSGVNYMHWYQQKPGTSPRRWIYDTSKLAGVPAR
FSGSGSGTSYSLTISSEMPEDAATYYCHQRGSYTFGGGTKLEIK

15 *Anti-Her2*

Cadena de VH de herceptina

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLWVARIYPTNGYTRY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTS
S

20

Cadena de VL de herceptina

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

25 *Anti-CD25*

Simulect VK (también conocido como Basiliximab)

QIVSTQSPAISASPGKVTMTCSASSRSYMQWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAGVPAR
FSGSGSGTSYSLTISSEMAEDAATYYCHQRSSYTFGGGTKLEIK

30

Simulect VH

QLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFTRYWMHWIKQRPQGGLWIGAIYPGNSDTSYN
QKFEGKAKLTVTSASTAYMELSSLTHEDSAVYYCSRDYGYFFDFWGQGTLLTVSS

35 *Anti-PSMA*

VH '1 desinmunizado

EVQLVQSGPEVKKPGATVKISCKTSGYTFTEYTIHWVKQAPGKGLWIGNINPNNGGTTYN
QKFEDKATLTVDKSTDAYMELSSLRSEDVAVYYCAAGWNFDYWGQGTLLTVSS

40

VK '1 desinmunizado

DIQMTQSPSSLSTSVGDRTLTCKASQDVGTAVDWYQQKPGSPKLLIYWASTRHTGIPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFADYYCQQYNSYPLTFGPGTKVDIK

45

VH1 '5 desinmunizado

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNF
ATHYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTGVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

5 VH2 '5 desinmunizado

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

10 VH3 '5 desinmunizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VH4 '5 desinmunizado

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNNLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

VK1 '5 desinmunizado

20 NIVMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTIVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFTGSGSATDFTLTISLQTEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEMK

VK2 '5 desinmunizado

25 NIVMTQFPSSMSASVGDRVTITCKASENVGTIVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK3 '5 desinmunizado

30 NIQMTQFPSAMSASVGDRVTITCKASENVGTIVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK4 '5 desinmunizado

35 NIQMTQFPSAMSASVGDRVTITCKASENVGTIVSWYQQKPDQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLADYYCGQSYTFPYTFGQGTKLEIK

VK DI '5 desinmunizado

40 NIVMTQFPKMSASAGERMTLTCKASENVGTIVSWYQQKPTQSPKMLIYGASNRFTGVDP
RFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLVDYYCGQSYTFPYTFGGGTKLEMK

VH DI '5 desinmunizado

45 EVKLEESGGGLVQPGGSMKISCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVIISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHA '5 humanizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNFA
THYAESVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

45

RHB '5 humanizado

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNSLRTEdTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

5 RHC '5 humanizado

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNSLRTEdTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHD '5 humanizado

10 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVGEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVIISRDDSKNTVYLQMNSLRTEdTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHE '5 humanizado

15 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLRTEdTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHF '5 humanizado

20 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNSLRTEdTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

RHG '5 humanizado

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSNYWMNWVRQASGKGLEWVAEIRSQSNNFA
THYAESVKGRVIISRDDSKNTAYLQMNSLRTEdTAVYYCTRRWNNFWGQGTTVTVSS

25 RKA '5 humanizado

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPSR
FSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKB '5 humanizado

30 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPSR
FSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKC '5 humanizado

35 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKD '5 humanizado

40 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPS
RFSGSGSATDFTLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKE '5 humanizado

45 NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKLLIYGASNRFTGVPSR
FTGSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGTKVEIK

RKF '5 humanizado

NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSR
 FSGSGSATDFILTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGGTKVEIK

5 RKG '5 humanizado

NIVMTQSPSSVSASVGDRTITCKASENVGTYVSWYQQKPGTAPKMLIYGASNRFTGVPSR
 FTGSGSATDFLTINNLQPEDFATYYCGQSYTFPYTFGQGGTKVEIK

10 El anticuerpo parental también puede ser una proteína de fusión que comprende una secuencia de péptidos de unión a albúmina (ABP) (Dennis y col. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; documento WO 01/45746). Los anticuerpos de la invención incluyen proteínas de fusión con secuencias de ABP enseñadas por: (i) Dennis y col. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 en las Tablas III y IV, página 35038; (ii) documento US 2004/0001827 en [0076]; y (iii) documento WO 01/45746 en las páginas 12-13.

15 En una realización, el anticuerpo se ha producido para dirigirse específicamente al antígeno relacionado con el tumor $\alpha_v\beta_6$.

20 El agente de unión a célula puede marcarse, por ejemplo, para ayudar en la detección o purificación del agente tanto antes de la incorporación como un conjugado, o como parte del conjugado. La marca puede ser una marca de biotina. En otra realización, el agente de unión a célula puede marcarse con un radioisótopo.

25 Las realizaciones de la presente invención incluyen ConjA en el que el agente de unión a célula está seleccionado de un anticuerpo para cualquiera de los antígenos tratados anteriormente.

Las realizaciones de la presente invención incluyen ConjA en el que el agente de unión a célula está seleccionado de cualquiera de los anticuerpos tratados anteriormente.

Carga de fármaco

30 La carga de fármaco es el número promedio de fármacos de PBD por agente de unión a célula, por ejemplo, anticuerpo. Si los compuestos de la invención están unidos a cisteínas, la carga de fármaco puede oscilar de 1 a 8 fármacos (D) por agente de unión a célula, es decir, en los que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 restos de fármaco están covalentemente unidos al agente de unión a célula. Las composiciones de conjugados incluyen colecciones de
 35 agentes de unión a célula, por ejemplo, anticuerpos, conjugados con un intervalo de fármacos, de 1 a 8. Si los compuestos de la invención están unidos a lisinas, la carga de fármaco puede oscilar de 1 a 80 fármacos (D) por agente de unión a célula, aunque puede preferirse un límite superior de 40, 20, 10 o 8. Las composiciones de conjugados incluyen colecciones de agentes de unión a célula, por ejemplo, anticuerpos, conjugados con un
 40 intervalo de fármacos, de 1 a 80, 1 a 40, 1 a 20, 1 a 10 o 1 a 8.

45 El número promedio de fármacos por anticuerpo en preparaciones de ADC de reacciones de conjugación puede caracterizarse mediante medios convencionales tales como UV, HPLC de fase inversa, HIC, espectroscopía de masas, ensayo de ELISA y electroforesis. También puede determinarse la distribución cuantitativa de ADC en términos de p. Por ELISA, puede determinarse el valor promediado de p en una preparación particular de ADC (Hamblett y col. (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson y col. (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Sin embargo, la distribución de valores de p (fármaco) no es discernible por la unión anticuerpo-antígeno y la limitación de la detección de ELISA. Por tanto, el ensayo de ELISA para la detección de conjugados de anticuerpo-fármaco no determina si los restos de fármaco están unidos al anticuerpo, tal como los fragmentos de la cadena pesada o
 50 cadena ligera, o los restos de aminoácidos particulares. En algunos casos, puede lograrse separación, purificación y caracterización de ADC homogéneos en los que p es un cierto valor de ADC con otras cargas de fármaco por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis. Tales técnicas también son aplicables a otros tipos de conjugados.

55 Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, p puede estar limitado por el número de sitios de unión sobre el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede tener solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos mediante los cuales puede unirse un conector. Mayor carga de fármaco, por ejemplo, p >5, puede producir agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de la permeabilidad celular de ciertos conjugados de anticuerpo-fármaco.

60 Normalmente, menos del máximo teórico de los restos de fármaco están conjugados con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, muchos restos de lisina que no reaccionan con el producto intermedio de fármaco-conector (D-L) o reactivo conector. Solo los grupos lisina más reactivos

pueden reaccionar con un reactivo de conector reactivo con amina. Por tanto, solo los grupos tiol de cisteína más reactivos pueden reaccionar con un reactivo de conector reactivo con tiol. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos, si alguno, grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan ligarse a un resto de fármaco. La mayoría de los restos de tiol de cisteína en los anticuerpos de los compuestos existen como puentes de disulfuro y deben reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP, bajo condiciones reductoras parciales o totales. La carga (relación de fármaco/anticuerpo) de un ADC puede controlarse de varias maneras diferentes, que incluyen: (i) limitando el exceso molar de producto intermedio de fármaco-conector (D-L) o reactivo de conector con respecto al anticuerpo, (ii) limitando el tiempo de reacción de la conjugación o temperatura, y (iii) condiciones reductoras parciales o reductoras limitantes para la modificación del tiol de cisteína.

Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de conector mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitolo). Cada puente de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleófilos adicionales en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol. Los grupos tiol reactivos pueden introducirse en el anticuerpo (o fragmento del mismo) manipulando uno, dos, tres, cuatro o más restos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos del aminoácido cisteína no nativos). El documento US 7521541 enseña a manipular anticuerpos por introducción de aminoácidos de cisteína reactivos.

Los aminoácidos de cisteína pueden manipularse en sitios reactivos en un anticuerpo y que no forman enlaces disulfuro entre cadenas o intermoleculares (Junutula y col., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan y col. (2009) Blood 114(13):2721-2729; documentos US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Los tioles de cisteína manipulados pueden reaccionar con reactivos de conector o los reactivos de fármaco-conector de la presente invención que tienen grupos electrófilos reactivos con tiol tales como maleimida o alfa-haloamidas para formar ADC con anticuerpos manipulados por cisteína y el resto de fármacos de PBD. Así, la localización del resto de fármaco puede diseñarse, controlarse y conocerse. La carga de fármaco puede controlarse, ya que los grupos tiol de cisteína manipulados normalmente reaccionan con reactivos de conector reactivos con tiol o reactivos de fármaco-conector en alto rendimiento. La manipulación de un anticuerpo IgG para introducir un aminoácido de cisteína por sustitución en un único sitio sobre la cadena pesada o ligera da dos nuevas cisteínas sobre el anticuerpo simétrico.

Una carga de fármaco próxima a 2 puede lograrse con casi homogeneidad del producto de conjugación ADC.

Si más de un grupo nucleófilo o electrófilo del anticuerpo reacciona con un producto intermedio de fármaco-conector, o reactivo de conector seguido de resto de fármaco reactivo, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de ADC con una distribución de restos de fármaco unidos a un anticuerpo, por ejemplo, 1, 2, 3, etc. Los procedimientos de cromatografía de líquidos tales como fase inversa polimérica (PLRP) e interacción hidrófoba (HIC) pueden separar compuestos en la mezcla por el valor de carga del fármaco. Las preparaciones de ADC con un único valor de carga de fármaco (p) pueden aislarse, sin embargo, estos ADC de valor de carga único pueden todavía ser mezclas heterogéneas debido a que los restos de fármaco pueden unirse, mediante el conector, en diferentes sitios sobre el anticuerpo.

Así, las composiciones de conjugado de anticuerpo-fármaco de la invención incluyen mezclas de compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco en las que el anticuerpo tiene uno o más restos de fármaco de PBD y en las que los restos de fármaco pueden unirse al anticuerpo en diversos restos de aminoácidos.

En una realización, el número promedio de grupos de pirrolobenzodiazepina diméricos por agente de unión a célula está en el intervalo 1 a 20. En algunas realizaciones, el intervalo está seleccionado de 1 a 8, 2 a 8, 2 a 6, 2 a 4, y 4 a 8.

En algunas realizaciones, hay un grupo de pirrolobenzodiazepina dimérico por agente de unión a célula.

Incluye otras formas

A menos que se especifique de otro modo, en lo anterior se incluyen las formas iónicas, de sal, solvato y protegidas muy conocidas de estos sustituyentes. Por ejemplo, una referencia a ácido carboxílico (-COOH) también incluye la forma aniónica (carboxilato) (-COO⁻), una sal o solvato de la misma, además de formas protegidas convencionales. Similarmente, una referencia a un grupo amino incluye la forma protonada (-N⁺HR¹R²), una sal o solvato del grupo amino, por ejemplo, una sal de clorhidrato, además de formas protegidas convencionales de un grupo amino. Similarmente, una referencia a un grupo hidroxilo también incluye la forma aniónica (-O⁻), una sal o solvato de la misma, además de formas protegidas convencionales.

Sales

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular una sal correspondiente del compuesto activo, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se tratan en

Berge y col., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Por ejemplo, si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, -COOH puede ser -COO⁻), entonces puede formarse una sal con un catión adecuado. Ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen iones de metales alcalinos tales como Na⁺ y K⁺, cationes alcalinotérreos tales como Ca²⁺ y Mg²⁺, y otros cationes tales como Al³⁺. Ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ión amonio (es decir, NH₄⁺) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH₃R⁺, NH₂R₂⁺, NHR₃⁺, NR₄⁺). Ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitohexilamina, trietilamina, butilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina y trometamina, además de aminoácidos, tales como lisina y arginina. Un ejemplo de un ión amonio cuaternario común es N(CH₃)₄⁺.

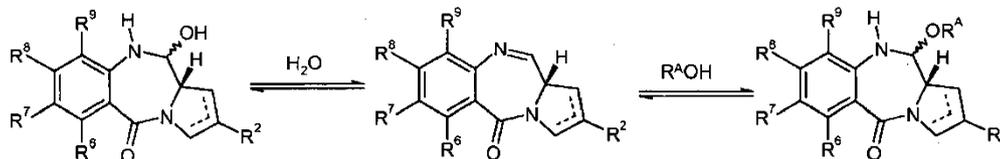
Si el compuesto es catiónico, o tiene un grupo funcional que pueda ser catiónico (por ejemplo, -NH₂ puede ser -NH₃⁺), entonces puede formarse una sal con un anión adecuado. Ejemplos de aniones inorgánicos adecuados incluyen aquellos derivados de los siguientes ácidos inorgánicos: clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, sulfuroso, nítrico, nitroso, fosfórico y fosforoso.

Ejemplos de aniones orgánicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de los siguientes ácidos orgánicos: ácido 2-acetoxibenzoico, acético, ascórbico, aspártico, benzoico, canforsulfónico, cinámico, cítrico, edético, etanodisulfónico, etanosulfónico, fumárico, gluceptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroximaleico, hidroxinaftalenocarboxílico, isetiónico, láctico, lactobiónico, láurico, maleico, málico, metanosulfónico, mícico, oleico, oxálico, palmítico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fenilsulfónico, propiónico, pirúvico, salicílico, estearico, succínico, sulfanílico, tartárico, toluenosulfónico, trifluoroacético y valérico. Ejemplos de aniones orgánicos poliméricos adecuados incluyen aquellos derivados de los siguientes ácidos poliméricos: ácido tánico, carboximetilcelulosa.

Solvatos

Puede ser conveniente o deseable preparar, purificar y/o manipular un solvato correspondiente del compuesto activo. El término "solvato" se usa en el presente documento en el sentido convencional para referirse a un complejo de soluto (por ejemplo, compuesto activo, sal de compuesto activo) y disolvente. Si el disolvente es agua, el solvato puede denominarse convenientemente un hidrato, por ejemplo, un mono-hidrato, un di-hidrato, un tri-hidrato, etc.

La invención incluye compuestos en los que un disolvente se añade a través del enlace imina del resto de PBD, que se ilustra a continuación, en el que el disolvente es agua o un alcohol (R^AOH en la que R^A es alquilo C₁₋₄):



Estas formas pueden denominarse formas carbinolamina y de éter de carbinolamina de PBD (como se describe en la sección referente a R¹⁰ anterior). El equilibrio de estos equilibrios depende de las condiciones a las que los compuestos se encuentran, además de la naturaleza del propio resto.

Estos compuestos particulares pueden aislarse en forma sólida, por ejemplo, por liofilización.

Isómeros

Ciertos compuestos de la invención pueden existir en una o más formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas, epiméricas, atrópicas, estereoisoméricas, tautómeras, conformacionales o anoméricas particulares, que incluyen, pero no se limitan a, formas cis y trans; formas E y Z; formas c, t y r; formas endo y exo; formas R, S y meso; formas D y L, formas d y l; formas (+) y (-); formas ceto, enol y enolato; formas sin y anti; formas sinclinales y anticlinales; formas α y β ; formas axiales y ecuatoriales; formas de barco, silla, giro, sobre y media silla; y combinaciones de las mismas, denominadas conjuntamente en lo sucesivo "isómeros" (o "formas isoméricas").

El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no superponibilidad del componente de la imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles sobre su componente de imagen especular.

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

“Diaestereómero” se refiere a un estereoisómero con dos o más centros que quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diaestereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diaestereómeros pueden separarse bajo procedimientos analíticos de alta resolución tales como electroforesis y cromatografía.

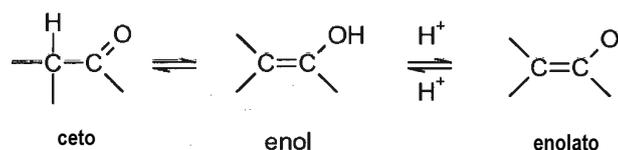
5 “Enantiómeros” se refiere a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

Las definiciones estereoquímicas y convenciones usadas en el presente documento generalmente siguen a S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; y Eliel, E. y Wilen, S., “Stereochemistry of Organic Compounds”, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la invención pueden contener centros asimétricos o quirales y, por tanto, existen en diferentes formas estereoisoméricas. Se pretende que todas las formas estereoisoméricas de los compuestos de la invención, que incluyen, pero no se limitan a, diaestereómeros, enantiómeros y atropisómeros, además de mezclas de los mismos, tales como mezclas racémicas, formen parte de la presente invención. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de girar el plano del plano-luz polarizada. En la descripción de un compuesto ópticamente activo, los prefijos D y L, o R y S, se usan para indicar la configuración absoluta de la molécula alrededor de su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación del plano-luz polarizada por el compuesto, significando (-) o l que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos, excepto en que son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también puede denominarse un enantiómero, y una mezcla de tales isómeros se denomina frecuentemente mezcla enantiomérica. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina una mezcla racémica o un racemato, que puede producirse si no ha habido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción química o procedimiento. Los términos “mezcla racémica” y “racemato” se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantioméricas, que carecen de la actividad óptica.

Obsérvese que, excepto como se trata más adelante para las formas tautómeras, específicamente excluidas del término “isómeros”, como se usa en el presente documento, son isómeros estructurales (o constitucionales) (es decir, isómeros que se diferencian en las conexiones entre átomos en vez de simplemente por la posición de átomos en el espacio). Por ejemplo, una referencia a un grupo metoxi, $-\text{OCH}_3$, no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, un grupo hidroximetilo, $-\text{CH}_2\text{OH}$. Similarmente, una referencia al orto-clorofenilo no debe interpretarse como una referencia a su isómero estructural, meta-clorofenilo. Sin embargo, una referencia a una clase de estructuras puede incluir bien formas estructuralmente isoméricas que se encuentran dentro de esa clase (por ejemplo, alquilo C_{1-7} incluye n-propilo e iso-propilo; butilo incluye n-, iso-, sec- y terc-butilo; metoxifenilo incluye orto-, meta- y para-metoxifenilo).

La exclusión anterior no se refiere a formas tautómeras, por ejemplo, formas ceto, enol y enolato, como en, por ejemplo, los siguientes pares tautómeros: ceto/enol (ilustrados más adelante), imina/enamina, amida/iminoalcohol, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiol, -nitroso/hidroxiazo y nitro/aci-nitro.

40



El término “tautómero” o “forma tautómera” se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles mediante una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros de protones (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones mediante la migración de un protón, tales como isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos de los electrones de enlace.

Obsérvese que específicamente incluidos en el término “isómero” están compuestos con una o más sustituciones isotópicas. Por ejemplo, H puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye ^1H , ^2H (D) y ^3H (T); C puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C ; O puede estar en cualquier forma isotópica, que incluye ^{16}O y ^{18}O ; y similares.

Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como, pero no se limitan a ^2H (deuterio, D), ^3H (tritio), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl y ^{125}I . Diversos compuestos isotópicamente marcados de la presente invención, por ejemplo, aquellos en los que los isótopos radiactivos tales como ^3H , ^{13}C y ^{14}C se incorporan. Tales compuestos isotópicamente marcados pueden ser útiles en estudios metabólicos, estudios de cinética de reacción, técnicas de detección u obtención de imágenes, tales como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT) que incluyen ensayos de distribución en tejido de fármaco o

60

5 sustrato, o en el tratamiento radiactivo de pacientes. Los compuestos terapéuticos marcados o sustituidos con deuterio de la invención pueden tener propiedades de DMPK mejoradas (metabolismo y farmacocinética del fármaco), referentes a la distribución, metabolismo y secreción (ADME). La sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, elevada semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos. Un compuesto marcado con ¹⁸F puede ser útil para estudios de PET o SPECT. Los compuestos isotópicamente marcados de la presente invención y profármacos de los mismos pueden prepararse generalmente llevando a cabo los procedimientos desvelados en los esquemas o en los ejemplos y preparaciones descritos más adelante sustituyendo un reactivo no isotópicamente marcado por un reactivo isotópicamente marcado fácilmente disponible. Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, ²H o D), puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, elevada semivida *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera un sustituyente. La concentración de un isótopo más pesado tal, específicamente deuterio, puede definirse por un factor de enriquecimiento isotópico. En los compuestos de la presente invención, cualquier átomo no específicamente designado como un isótopo particular se indica que representa cualquier isótopo estable de ese átomo.

10 A menos que se especifique de otro modo, una referencia a un compuesto particular incluye todas aquellas formas isoméricas, que incluyen mezclas (completa o parcialmente) racémicas y otras mezclas de las mismas. Los procedimientos para la preparación (por ejemplo, síntesis asimétrica) y separación (por ejemplo, cristalización fraccionada y medios cromatográficos) de tales formas isoméricas son tanto conocidos en la técnica como se obtienen fácilmente adaptando los procedimientos enseñados en el presente documento, o procedimientos conocidos, de una manera conocida.

25 **Actividad biológica**

25 Ensayos de proliferación celular *in vitro*

30 Generalmente, la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) se mide: exponiendo las células de mamífero que tienen proteínas receptoras, por ejemplo, HER2, al anticuerpo del ADC en un medio de cultivo celular; cultivar las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y medir la viabilidad celular. Los ensayos *in vitro* basados en células se usan para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad e inducción de apoptosis (activación por caspasas) de un ADC de la invención.

35 La potencia *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco puede medirse por un ensayo de proliferación celular. El ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo[®] es un procedimiento de ensayo homogéneo comercialmente disponible (Promega Corp., Madison, WI) basado en la expresión recombinante de luciferasa de coleópteros (patentes de EE.UU. n.º 5583024; 5674713 y 5700670). Este ensayo de proliferación celular determina el número de células viables en cultivo basándose en la cuantificación de ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (Crouch y col. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; documento US 6602677). El CellTiter-Glo[®] se realiza en formato de 96 pocillos, haciéndolo susceptible a cribado de alta resolución automatizado (HTS) (Cree y col. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica añadir el único reactivo (reactivo CellTiter-Glo[®]) directamente a las células cultivadas en medio complementado con suero. No se requieren el lavado de células, eliminación de medio y múltiples etapas de pipeteado. El sistema detecta tan solo 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de añadir reactivo y mezclar. Las células pueden tratarse continuamente con ADC, o pueden tratarse y separarse de ADC. Generalmente, las células tratadas brevemente, es decir, 3 horas, mostraron los mismos efectos de potencia que las células continuamente tratadas.

40 El formato "añadir-mezclar-medir" homogéneo produce la lisis celular y generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El ensayo CellTiter-Glo[®] genera una señal luminiscente "de tipo brillo", producida por la reacción de la luciferasa, que tiene una semivida generalmente superior a cinco horas, dependiendo del tipo de célula y del medio usado. Las células viables se reflejan en unidades relativas de luminiscencia (URL). El sustrato, luciferina de escarabajo, se descarboxila oxidativamente por luciferasa de luciérnaga recombinante, con la conversión concomitante de ATP en AMP y generación de fotones.

55 La potencia *in vitro* de conjugados de anticuerpo-fármaco también puede medirse por un ensayo de citotoxicidad. Se lavan células adherentes cultivadas con PBS, se desprenden con tripsina, se diluyen en medio completo, que contiene 10 % de SBF, se centrifugan, se resuspenden en medio fresco y se cuentan con un hemocitómetro. Los cultivos en suspensión se cuentan directamente. Suspensiones monodispersas de células adecuadas para el recuento pueden requerir la agitación de la suspensión por aspiración repetida para romper los grupos de células.

60 La suspensión de células se diluye a la densidad de siembra deseada y se dispensa (100 µl por pocillo) en placas de 96 pocillos negras. Se incuban placas de líneas de células adherentes durante la noche para permitir la adherencia. Pueden usarse cultivos celulares en suspensión el día de la siembra.

65 Se prepara una solución madre (1 ml) de ADC (20 µg/ml) en el medio de cultivo celular apropiado. Se preparan

diluciones de 10 veces en serie de ADC de solución madre en tubos de centrifuga de 15 ml transfiriendo en serie 100 µl a 900 µl de medio de cultivo celular.

5 Se dispensan cuatro pocillos por duplicado de cada dilución de ADC (100 µl) en placas de 96 pocillos negras, previamente sembradas con suspensión de células (100 µl), produciendo un volumen final de 200 µl. Los pocillos de control reciben medio de cultivo celular (100 µl).

10 Si el tiempo de duplicación de la línea celular es superior a 30 horas, la incubación de ADC es durante 5 días, si no se hace una incubación de cuatro días.

15 Al final del periodo de incubación, se evalúa la viabilidad celular con el ensayo de azul Alamar. Se dispensa azul Alamar (Invitrogen) sobre la placa completa (20 µl por pocillo) y se incuba durante 4 horas. Se mide la fluorescencia de azul Alamar a la excitación de 570 nm, emisión de 585 nm sobre el lector de placas Varioskan Flash. El porcentaje de supervivencia celular se calcula a partir de la fluorescencia media en los pocillos tratados con ADC en comparación con la fluorescencia media en los pocillos de control.

Eficacia *in vivo*

20 La eficacia *in vivo* de los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención puede medirse por estudios de xenoinjerto de tumor en ratones. Por ejemplo, la eficacia *in vivo* de un ADC anti-HER2 de la invención puede medirse por un modelo de ratón de explante transgénico de HER2 de alta expresión. Se propaga un aloinjerto del ratón transgénico Fo5 mmtv que no responde a, o responde poco a, terapia con HERCEPTIN®. Los sujetos se tratan una vez con ADC a ciertos niveles de dosis (mg/kg) y exposición al fármaco PBD (µg/m²); y control con tampón placebo (vehículo) y se monitorizan durante dos semanas o más para medir el tiempo hasta el duplicado del tumor, logaritmo de la destrucción celular y el encogimiento tumoral.

Uso

30 Los conjugados de la invención pueden usarse para proporcionar un compuesto de PBD en una localización diana.

La localización diana es preferentemente una población de células proliferativas. El anticuerpo es un anticuerpo para un antígeno presente sobre una población de células proliferativas.

35 En una realización, el antígeno está ausente o presente a un nivel reducido en una población de células no proliferativas en comparación con la cantidad de antígeno presente en la población de células proliferativas, por ejemplo, una población de células tumorales.

40 En la localización diana, el conector puede escindirse de manera que libere un compuesto ReIA o ReIB. Así, el conjugado puede usarse para proporcionar selectivamente un compuesto ReIA o ReIB a la localización diana.

El conector puede escindirse por una enzima presente en la localización diana.

La localización diana puede ser *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

45 Los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención incluyen aquellos con utilidad para actividad contra el cáncer. En particular, los compuestos incluyen un anticuerpo conjugado, es decir, covalentemente unido por un conector, a un resto de fármaco de PBD, es decir, toxina. Si el fármaco no está conjugado a un anticuerpo, el fármaco de PBD tiene un efecto citotóxico. La actividad biológica del resto de fármaco de PBD se modula así por conjugación con un anticuerpo. Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención administran selectivamente una dosis eficaz de un agente citotóxico a tejido tumoral, por lo que puede conseguirse mayor selectividad, es decir, una menor dosis eficaz.

50 Así, en un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de conjugado como se describe en el presente documento para su uso en terapia.

55 En otro aspecto también se proporciona un compuesto de conjugado como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa.

60 Un experto habitual en la materia puede determinar fácilmente si un conjugado candidato trata o no una afección proliferativa para cualquier tipo de célula particular. Por ejemplo, ensayos que pueden usarse convenientemente para evaluar la actividad ofrecida por un compuesto particular se describen en los siguientes ejemplos.

65 El término "enfermedad proliferativa" se refiere a una proliferación celular no deseada o no controlada de células excesivas o anormales que es no deseada, tal como crecimiento neoplásico o hiperplásico, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ejemplos de afecciones proliferativas incluyen proliferación celular benigna, pre-maligna y maligna, que incluyen

neoplasias y tumores (por ejemplo, histiocitoma, glioma, astrocitoma, osteoma), cánceres (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer del intestino, cáncer de colon, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer cerebral, sarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, melanoma),
 5 linfomas, leucemias, psoriasis, enfermedades de los huesos, trastornos fibroproliferativos (por ejemplo, de tejidos conjuntivos) y aterosclerosis. Cánceres de particular interés incluyen leucemias y cánceres de ovario.

Puede tratarse cualquier tipo de célula, que incluye, pero no se limita a, pulmón, gastrointestinal (que incluye, por ejemplo, intestino, colon), mama (mamario), de ovario, próstata, hígado (hepático), riñón (renal), vejiga, páncreas, cerebro y piel.

En una realización, el tratamiento es de un cáncer pancreático.

En una realización, el tratamiento es de un tumor que tiene integrina $\alpha_v\beta_6$ sobre la superficie de la célula.

Se contempla que los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la presente invención pueden usarse para tratar diversas enfermedades o trastornos, por ejemplo, caracterizados por la expresión en exceso de un antígeno de tumor. Afecciones o trastornos hiperproliferativos a modo de ejemplo incluyen tumores benignos o malignos; leucemia, tumores malignos hematológicos y linfoides. Otros incluyen trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos,
 20 hipotalámicos, glandulares, macrófagos, epiteliales, del estroma, blastocélicos, inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos, que incluyen autoinmunitarios.

Generalmente, la enfermedad o trastorno que va a tratarse es una enfermedad hiperproliferativa tal como cáncer. Ejemplos de cáncer que van a tratarse en el presente documento incluyen carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o del estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado,
 30 cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, además de cáncer de cabeza y cuello.

Enfermedades autoinmunitarias para las que los compuestos de ADC pueden usarse en el tratamiento incluyen trastornos reumatológicos (tales como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerodermia, lupus tales como LES y nefritis lúpica, polimiositis/dermatomiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y artritis psoriásica), osteoartritis, trastornos autoinmunitarios gastrointestinales y del hígado (tales como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmunitaria y anemia perniciosa, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y celiaquía), vasculitis (tal como, por ejemplo, vasculitis asociada a ANCA, que incluye vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliarteritis), trastornos neurológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome de opsoclonio-mioclono, miastenia grave, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunitarias), trastornos renales (tales como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, ronchas, pénfigo vulgar, pénfigoide buloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura post-transfusión y anemia hemolítica autoinmune), aterosclerosis, uveítis, enfermedades auditivas autoinmunitarias (tales como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y sordera parcial), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunitarios (tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias relacionadas con la diabetes tales como diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), enfermedad de Addison y enfermedad tiroidea autoinmunitaria (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis)). Tales enfermedades más preferidas incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, DMDI, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

Procedimientos de tratamiento

Los conjugados de la presente invención pueden usarse en un método de terapia. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Tal beneficio puede ser al menos mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la tasa y tiempo-ciclo de administración, dependerá de la naturaleza y gravedad de lo que esté tratándose. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, está dentro de la responsabilidad de médicos generales y otros doctores médicos.

Un compuesto de la invención puede administrarse solo o en combinación con otros tratamientos, tanto simultáneamente como secuencialmente dependiendo de la afección que vaya a tratarse. Ejemplos de tratamientos y terapias incluyen quimioterapia (la administración de agentes activos, que incluyen, por ejemplo, fármacos, tales

como quimioterapéuticos); cirugía; y radioterapia.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Clases de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de las plantas de venenos del huso, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores e inhibidores de cinasas. Los agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos usados en “terapia dirigida” y quimioterapia convencional.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (florouracilo, 5-fluorouracilo, CAS n° 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS n° 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), CAS n° 15663-27-1), carboplatino (CAS n° 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida, CAS n° 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) y doxorubicina (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD y rapamicina.

Más ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor Mek, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, AstraZeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semaphore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (sin Cremophor), formulaciones de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), cloramfucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); alquil sulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas del nitrógeno tales como cloramfucilo, clornafacina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gamma 1I, caliqueamicina omega 1I (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, nemorubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuaona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio, hidroxiaurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuaona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

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

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

Anticuerpos monoclonales humanizados con potencial terapéutico como agentes quimioterapéuticos en combinación con los conjugados de la invención incluyen: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatuzumab mertansine, cantuzumab mertansine, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pectusituzumab, pectuzumab, pertuzumab, pexelizumab, ralivizumab, ranibizumab, reslivizumab, reslizumab, resivizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibrotuzumab, siplizumab, sontuzumab, tacatuzumab tetraxetano, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, trastuzumab, tucotuzumab celmoleucina, tucusituzumab, umavizumab, urtoxazumab y visilizumab.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para su uso según la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, es decir, un compuesto de conjugado, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Tales materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, por ejemplo, cutánea, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para administración por vía oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Una cápsula puede comprender un vehículo sólido tal como una gelatina.

Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos expertos habituales en la materia son perfectamente capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera.

Formulaciones

Aunque es posible usar el compuesto de conjugado (por ejemplo, administrarse) solo, frecuentemente es preferible que esté presente como una composición o formulación.

En una realización, la composición es una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación, preparación, medicamento) que comprende un compuesto de conjugado, como se describe en el presente documento, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de conjugado, como se describe en el presente documento, junto con uno o varios de otros componentes farmacéuticamente aceptables muy conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, vehículos, diluyentes, excipientes, adyuvantes, cargas, tampones, conservantes, antioxidantes, lubricantes, estabilizadores, solubilizantes, tensioactivos (por ejemplo, agentes humectantes), agentes enmascaradores, agentes colorantes, aromatizantes y edulcorantes farmacéuticamente aceptables.

En una realización, la composición comprende además otros agentes activos, por ejemplo, otros agentes terapéuticos o profilácticos.

Vehículos, diluyentes, excipientes adecuados, etc., pueden encontrarse en textos farmacéuticos estándar. Véanse, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2ª edición (eds. M. Ash y I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, Nueva York, EE.UU.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª edición, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª edición, 1994.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a procedimientos de preparación de una composición farmacéutica que comprenden mezclar al menos un conjugado radiomarcado con [¹¹C] o compuesto similar a conjugado, como se define en el presente documento, junto con uno o varios de otros componentes farmacéuticamente aceptables muy conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, vehículos, diluyentes, excipientes, etc. Si se formulan como unidades discretas (por ejemplo, comprimidos, etc.), cada unidad contiene una cantidad predeterminada (dosificación) del compuesto activo.

El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, componentes, materiales, composiciones, formas de dosificación, etc., que son, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para su uso en contacto con los tejidos del sujeto en cuestión (por ejemplo, humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación de beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, diluyente, excipiente, etc., debe también ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación.

Las formulaciones pueden prepararse por cualquier procedimiento muy conocido en la técnica de la farmacia. Tales procedimientos incluyen la etapa de poner en asociación el compuesto activo con un vehículo que constituye uno o más componentes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación el compuesto activo con vehículos (por ejemplo, vehículos líquidos, vehículo sólido finamente dividido, etc.), y luego moldear el producto, si fuera necesario.

La formulación puede prepararse para proporcionar liberación rápida o lenta; inmediata, retardada, controlada o liberación sostenida; o una combinación de las mismas.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección) incluyen líquidos estériles, libres de pirógenos, isotónicos, acuosos o no acuosos (por ejemplo, soluciones, suspensiones), en los que el principio activo se disuelve, suspende o proporciona de otro modo (por ejemplo, en un liposoma u otra micropartícula). Tales líquidos pueden contener adicionalmente otros componentes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizadores, bacteriostáticos, agentes de suspensión, espesantes y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre (u otro fluido corporal relevante) del receptor previsto. Ejemplos de excipientes incluyen, por ejemplo, agua, alcoholes, polioles, glicerol, aceites vegetales y similares. Ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para su uso en tales formulaciones incluyen inyección de cloruro sódico, solución de Ringer o inyección de Ringer con lactato. Normalmente, la concentración del principio activo en el líquido es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes cerrados de dosis unitaria o multi-dosis, por ejemplo, ampollas y viales, y puede almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

Dosificación

Se apreciará por un experto en la materia que las dosificaciones apropiadas del compuesto de conjugado, y composiciones que comprenden el compuesto de conjugado, pueden variar de paciente a paciente. Determinar la dosificación óptima implicará generalmente equilibrar el nivel de beneficio terapéutico contra cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores que incluyen la actividad del compuesto particular, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de eliminación del compuesto, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación, la gravedad de la afección, y la especie, sexo, edad, peso, afección, salud general e historia médica previa del paciente. La cantidad de compuesto y la vía de administración serán por último lugar a criterio del médico, veterinario o profesional clínico, aunque generalmente la dosificación se seleccionará para lograr concentraciones

locales en el sitio de acción que consiguen el efecto deseado sin causar efectos secundarios nocivos o perjudiciales sustanciales.

La administración puede efectuarse en una dosis, continuamente o intermitentemente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos apropiados) durante el transcurso del tratamiento. Procedimientos de determinación de los medios más eficaces y de dosificación de la administración son muy conocidos para aquellos expertos en la materia y variarán con la formulación usada para la terapia, el fin de la terapia, la(s) célula(s) diana(s) que está(n) tratándose y el sujeto que está tratándose. Pueden llevarse a cabo administraciones individuales o múltiples con el nivel de dosis y patrón que se selecciona por el médico práctico, veterinario o profesional clínico.

En general, una dosis adecuada del compuesto activo está en el intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 25 mg (más normalmente aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 mg) por kilogramo de peso corporal del sujeto por día. Si el compuesto activo es una sal, un éster, una amida, un profármaco, la cantidad administrada se calcula basándose en el compuesto parental y así el peso real que va a usarse se aumenta proporcionalmente.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 100 mg, 3 veces al día.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 150 mg, 2 veces al día.

En una realización, el compuesto activo se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 200 mg, 2 veces al día.

Sin embargo en una realización, el compuesto de conjugado se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 50 o aproximadamente 75 mg, 3 o 4 veces al día.

En una realización, el compuesto de conjugado se administra a un paciente humano según la siguiente pauta de dosificación: aproximadamente 100 o aproximadamente 125 mg, 2 veces al día.

Las cantidades de dosificación descritas anteriormente pueden aplicarse al conjugado (incluyendo el resto de PBD y el conector al anticuerpo) o a la cantidad eficaz de compuesto de PBD proporcionada, por ejemplo, la cantidad de compuesto que es liberable después de la escisión del conector.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un ADC de la invención dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se ha definido anteriormente, la gravedad y transcurso de la enfermedad, si la molécula se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico adjunto. La molécula se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de molécula es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto, por ejemplo, por una como más administraciones separadas, o por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Una dosificación a modo de ejemplo de ADC que va a administrarse a un paciente está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso del paciente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento es sostenido hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una pauta de dosificación a modo de ejemplo comprende un ciclo de administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de dosis adicionales cada semana, dos semanas o tres semanas de un ADC. Pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Tratamiento

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento en el contexto de tratar una afección, se refiere generalmente a tratamiento y terapia, tanto de un ser humano como un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en el que se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición del progreso de la afección, e incluye una reducción en la tasa de progreso, una detención en la tasa de progreso, regresión de la afección, mejora de la afección y cura de la afección. También se incluye el tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis, prevención).

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, proporcional a una relación de beneficio/riesgo razonable, cuando se administra según una pauta de tratamiento deseada.

Similarmente, el término "cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la

cantidad de un compuesto activo, o un material, composición o dosificación que comprende un compuesto activo, que es eficaz para producir algún efecto profiláctico deseado, proporcional a una relación de beneficio/riesgo razonable, cuando se administra según una pauta de tratamiento deseada.

5 Preparación de conjugados de fármaco

Los conjugados de anticuerpo-fármaco, además de conjugados con otros agentes de unión a célula, pueden prepararse por varias vías, empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia, que incluyen reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo o agente de unión a célula con un fármaco-reactivo de conector. Este procedimiento puede emplearse con varios anticuerpos y agentes de unión a célula para preparar los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención.

Grupos nucleófilos sobre anticuerpos incluyen grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína. Los grupos tiol son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos sobre restos de conector tales como aquellos de la presente invención. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de conector mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (reactivo de Cleland, ditiotreitól) o TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina; Getz y col. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Cada puente de disulfuro de cisteína formará así, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), produciendo la conversión de una amina en un tiol.

El sujeto/paciente

El sujeto/paciente puede ser un animal, mamífero, un mamífero placentario, un marsupial (por ejemplo, canguro, tejón australiano), un monotremo (por ejemplo, ornitorrinco), un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), un lagomorfo (por ejemplo, un conejo), aviar (por ejemplo, un ave), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), porcino (por ejemplo, un cerdo), ovino (por ejemplo, una oveja), bovino (por ejemplo, una vaca), un primate, simio (por ejemplo, un simio inferior o simio superior), un simio inferior (por ejemplo, tití, babuino), un simio superior (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón), o un ser humano.

Además, el sujeto/paciente puede estar en cualquiera de sus formas de desarrollo, por ejemplo, un feto. En una realización preferida, el sujeto/paciente es un ser humano.

En una realización, el paciente es una población en la que cada paciente tiene un tumor que tiene integrina $\alpha_v\beta_6$ sobre la superficie de la célula.

Ejemplos

Procedimientos experimentales generales para el Ejemplo 1

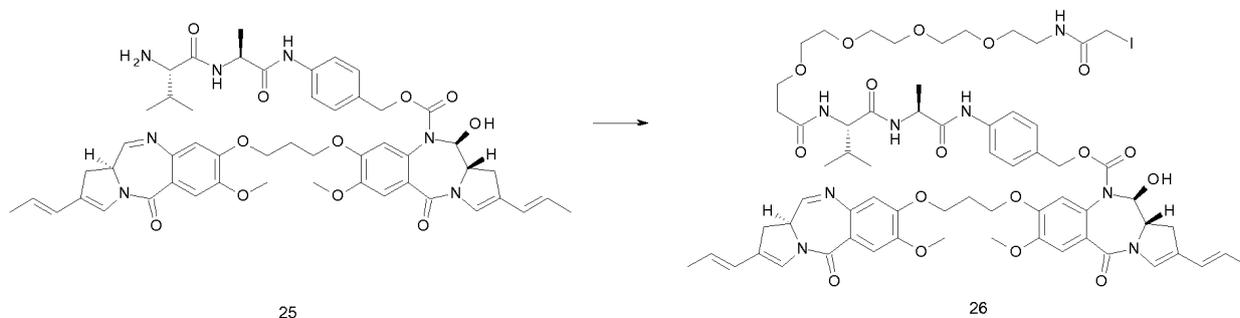
Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) y las concentraciones (c) se facilitan en g/100 ml. Los puntos de fusión se midieron usando un aparato de punto de fusión digital (electrotérmico). Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro de IR Spectrum 1000 FT de Perkin-Elmer. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se adquirieron a 300 K usando un espectrómetro de RMN de Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se informan con respecto a TEM ($\delta = 0,0$ ppm) y las señales se designan s (singlete), d (doblete), t (triplete), dt (triplete doble), dd (doblete de dobletes), ddd (doblete doble de dobletes) o m (multiplete), con las constantes de acoplamiento dadas en hercios (Hz). Se recogieron datos de espectroscopía de masas (EM) usando un instrumento Micromass ZQ de Waters acoplado a una HPLC 2695 de Waters con una PDA 2996 de Waters. Los parámetros de Micromass ZQ de Waters usados fueron: capilar (kV), 3,38; cono (V), 35; extractor (V), 3,0; temperatura de la fuente ($^{\circ}\text{C}$), 100; temperatura de desolvatación ($^{\circ}\text{C}$), 200; velocidad de flujo del cono (l/h), 50; velocidad de flujo de desolvatación (l/h), 250. Los datos de espectroscopía de masas de alta resolución (HR-EM) se registraron en un Micromass QTOF Global de Waters en modo W positivo usando puntas de vidrio de borosilicato recubiertas de metal para introducir las muestras en el instrumento. Se realizó cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas de aluminio de gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄), y la cromatografía ultrarrápida utilizó gel de sílice (Merck 60, 230-400 de malla ASTM). Excepto por el HOBt (NovaBiochem) y los reactivos soportados sobre sólido (Argonaut), todos los otros productos químicos y disolventes se compararon de Sigma-Aldrich y se usaron como se suministraron sin más purificación. Se prepararon disolventes anhidros mediante destilación bajo una atmósfera de nitrógeno seca en presencia de un agente secante apropiado, y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4A o alambre de sodio. Éter de petróleo se refiere a la fracción que hierve a 40-60 $^{\circ}\text{C}$.

Condiciones de EM/CL generales: La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó usando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico 0,1 %) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico 0,1 %). Gradiente: composición inicial 5 % de B durante 1,0 min, a continuación 5 % de B a 95 % de B durante 2,5 min. La composición se mantuvo durante 0,5 min al 95 % de

B, y a continuación volvió a 5 % de B en 0,1 minutos y se mantuvo allí durante 0,9 min. El tiempo de ejecución total del gradiente es igual a 5 min. Velocidad de flujo 3,0 ml/min, se fraccionaron 400 μ l mediante una pieza en T de volumen muerto cero que pasa al espectrómetro de masas. Intervalo de detección de longitud de onda: 220 a 400 nm. Tipo de función: matriz de diodos (535 barridos). Columna: Phenomenex® Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm

5

Ejemplo 1



10 El compuesto 25 es el compuesto 79 del documento WO 2011/130598

11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-((7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S)-4-(1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxa-6,9,12,15-tetraoxa-13,19,22-triazatetracosanamido)encilo (26)

15

Se añadió *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC, 4,71 μ l, 0,0304 mmol) a una solución de la amina 25 (0,0276 mmol) y yodo-(PEG)₄-ácido (13,1 mg, 0,0304 mmol) en diclorometano seco (0,8 ml). La reacción se agitó durante 3 horas y dejó de observarse presencia del material de partida mediante CL/EM. La mezcla de reacción se cargó directamente en una placa de cromatografía de capa fina (TLC) y se purificó mediante TLC preparativa (metanol al 10 % en cloroformo). Las bandas puras se rasparon de la placa de TLC, se recogieron en metanol al 10 % en cloroformo, se filtraron y se retiró el exceso de eluyente mediante evaporación rotatoria a presión reducida para dar **26 (A)** (20,9 mg, 56%). CL/EM, método 2, 3,08 min (ES⁺) *m/z* (intensidad relativa) 1361,16 ([M+H]⁺, 100).

20

25 Métodos experimentales generales para el ejemplo 2

Los datos de CLEM se obtuvieron usando un dispositivo de CL/EM Agilent 1200 Series con un EM cuadrupolar Agilent 6110, con ionización por electropulverización. Fase móvil A – ácido acético al 0,1 % en agua. Fase móvil B – 0,1 % en acetonitrilo. Caudal de 1,00 ml/min. Gradiente del 5% de B aumentando hasta un 95% de B a lo largo de 3 minutos, resto al 95% de B durante 1 minuto y después se vuelve a reducir hasta 5% de B a lo largo de 6 segundos. El tiempo de ejecución total es de 5 minutos. Columna: Phenomenex Gemini-NX 3 μ m C18, 30 x 2,00 mm. Cromatogramas basados en la detección UV a 254 nm. Los espectros de masas se adquirieron usando el EM en modo positivo. Los valores de cambio químico de RMN de protones se midieron en la escala delta a 400 MHz usando un dispositivo Bruker AV400. Se han usado las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, duplete; t, triplete; q, cuartete; m, multiplete; a, ancho. Las constantes de acoplamiento se comunican en Hz. A menos que se indique otra cosa, las cromatografías en columna (mediante el procedimiento ultrarrápido) se llevaron a cabo en sílice Kieselgel de Merck (Art. 9385). Los datos de espectroscopía de masas (EM) se recogieron usando un instrumento Waters Micromass LCT acoplado a un módulo de separación Waters 2795 HYPLC. La cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas de aluminio y gel de sílice (Merck 60, F254). Todos los demás productos químicos y disolventes se adquirieron de Sigma-Aldrich o de Fisher Scientific y se usaron tal cual sin purificación adicional.

30

35

40

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley Ltd.) y las concentraciones (*c*) se facilitan en g/100 ml. Los puntos de fusión se midieron usando un aparato de punto de fusión digital (electrotérmico). Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro de IR Spectrum 1000 FT de Perkin-Elmer. Los espectros de RMN ¹H y ¹³C se adquirieron a 300 K usando un espectrómetro de RMN de Bruker Avance a 400 y 100 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos se informan con respecto a TEM (δ = 0,0 ppm) y las señales se designan s (singlete), d (doblete), t (triplete), dt (triplete doble), dd (doblete de dobletes), ddd (doblete doble de dobletes) o m (multiplete), con las constantes de acoplamiento dadas en hercios (Hz). Se recogieron datos de espectroscopía de masas (EM) usando un instrumento Micromass ZQ de Waters acoplado a una HPLC 2695 de Waters con una PDA 2996 de Waters. Los parámetros de Micromass ZQ de Waters usados fueron: capilar (kV), 3,38; cono (V), 35; extractor (V), 3,0; temperatura de la fuente (°C), 100; temperatura de desolvatación (°C), 200; velocidad de flujo del cono (l/h), 50; velocidad de flujo de desolvatación (l/h), 250. Los datos de espectroscopía de masas de alta resolución (HR-EM) se registraron en un Micromass QTOF Global de Waters en modo W positivo usando puntas de vidrio de borosilicato recubiertas de metal para introducir las muestras en el instrumento. Se realizó cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas de aluminio de gel de sílice (Merck 60, F254), y la

50

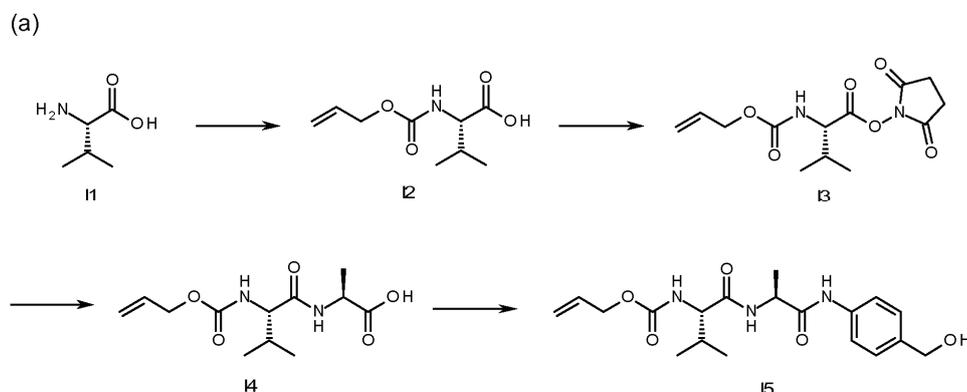
55

cromatografía ultrarrápida utilizó gel de sílice (Merck 60, 230-400 de malla ASTM). Excepto por el HOBt (NovaBiochem) y los reactivos soportados sobre sólido (Argonaut), todos los otros productos químicos y disolventes se compraron de Sigma-Aldrich y se usaron como se suministraron sin más purificación. Se prepararon disolventes anhidros mediante destilación bajo una atmósfera de nitrógeno seca en presencia de un agente secante apropiado, y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4A o alambre de sodio. Éter de petróleo se refiere a la fracción que hierve a 40-60 °C.

Condiciones de CL/EM generales: La HPLC (Waters Alliance 2695) se realizó usando una fase móvil de agua (A) (ácido fórmico 0,1 %) y acetonitrilo (B) (ácido fórmico 0,1 %). Gradiente: composición inicial 5 % de B durante 1,0 min, a continuación 5 % de B a 95 % de B durante 3 min. La composición se mantuvo durante 0,5 min al 95 % de B, y a continuación volvió a 5 % de B en 0,3 minutos. El tiempo de ejecución total del gradiente es igual a 5 min. Velocidad de flujo 3,0 ml/min, se fraccionaron 400 pl mediante una pieza en T de volumen muerto cero que pasa al espectrómetro de masas. Intervalo de detección de longitud de onda: 220 a 400 nm. Tipo de función: matriz de diodos (535 barridos). Columna: Phenomenex® Onyx Monolithic C18 50 x 4,60 mm

Ejemplo 2

(i) Intermedios clave



(a-i) Ácido (S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanoico (12)

Se añadió gota a gota clorofornato de alilo (36,2 ml, 340,59 mmol, 1,2 equiv.) a una solución en agitación de L-valina (11) (33,25 g, 283,82 mmol, 1,0 equiv.) y carbonato de potasio (59,27 g, 425,74 mmol, 1,5 equiv.) en agua (650 ml) y THF (650 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, después, el disolvente se concentró a presión reducida y el resto de la solución se extrajo con éter dietílico (3 x 100 ml). La porción acuosa se acidificó a pH 2 con HCl concentrado y se extrajo con DCM (3 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el producto en forma de un aceite incoloro (57,1 g, se asume un 100% de rendimiento). CL/EM (1,966 min (ES⁺)), m/z: 202,1 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,57 (s a, 1H), 7,43 (d, 1H, J = 8,6 Hz), 5,96 - 5,86 (m, 1H), 5,30 (ddd, 1H, J = 17,2, 3,4, 1,7 Hz), 5,18 (ddd, 1H, J = 10,4, 2,9, 1,6 Hz), 4,48 (dt, 2H, J = 5,3, 1,5 Hz), 3,85 (dd, 1H, J = 8,6, 6,0 Hz), 2,03 (oct, 1H, J = 6,6 Hz), 0,89 (d, 3H, J = 6,4 Hz), 0,87 (d, 3H, J = 6,5 Hz).

(a-ii) 2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanoato de (S)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (13)

A una solución en agitación del ácido protegido 12 (60,6 g, 301,16 mmol, 1,0 equiv.) y N-hidroxisuccinimida (34,66 g, 301,16 mmol, 1,0 equiv.) en THF seco (800 ml) se le añadió dicitclohexilcarbodiimida (62,14 g, 301,16 mmol, 1 equiv.). La reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se filtró, el sólido se lavó con THF y el filtrado combinado se concentró a presión reducida. El residuo se redisolvió en DCM y se dejó en reposo a 0°C durante 30 minutos. La suspensión se filtró y se lavó con DCM frío. La concentración del filtrado a presión reducida dio el producto en forma de un aceite viscoso incoloro (84,7 g, se asume un 100% de rendimiento) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. CL/EM (2,194 min (ES⁺)), m/z: 321,0 [M+Na]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,0 (d, 1H, J = 8,3 Hz), 5,97 - 5,87 (m, 1H), 5,30 (ddd, 1H, J = 17,2, 3,0, 1,7 Hz), 5,19 (ddd, 1H, J = 10,4, 2,7, 1,4 Hz), 4,52 (dt, 2H, J = 5,3, 1,4 Hz), 4,32 (dd, 1H, J = 8,3, 6,6 Hz), 2,81 (m, 4H), 2,18 (oct, 1H, J = 6,7 Hz), 1,00 (d, 6H, J = 6,8 Hz).

(a-iii) Ácido (S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanoico (14)

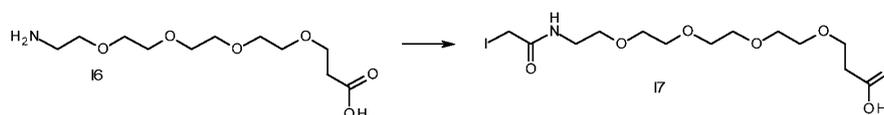
Se añadió una solución de éster de succinimida 13 (12,99 g, 43,55 mmol, 1,0 equiv.) en THF (50 ml) a una solución de L-alanina (4,07 g, 45,73 mmol, 1,05 equiv.) y NaHCO₃ (4,02 g, 47,90 mmol, 1,1 equiv.) en THF (100 ml) y H₂O (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas, cuando el THF se retiró a presión reducida. El pH se ajustó a 3-4 con ácido cítrico para precipitar una goma de color blanco. Tras la extracción con acetato de

etilo (6 x 150 ml), los extractos orgánicos combinados se lavaron con H₂O (200 ml), se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. La trituración con éter dietílico dio el producto en forma de un polvo de color blanco que se recogió por filtración y se lavó con éter dietílico (5,78 g, 49%). CL/EM (1,925 min (ES⁺)), *m/z*: 273,1 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12,47 (s a, 1H), 8,17 (d, 1H, *J* = 6,8 Hz), 7,16 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz), 5,95 - 5,85 (m, 1H), 5,29 (dd, 1H, *J* = 17,2, 1,7 Hz), 5,17 (dd, 1H, *J* = 10,4, 1,5 Hz), 4,46 (m, 2H), 4,18 (quin, 1H, *J* = 7,2 Hz), 3,87 (dd, 1H, *J* = 9,0, 7,1 Hz), 1,95 (oct, 1H, *J* = 6,8 Hz), 1,26 (d, 3H, *J* = 7,3 Hz), 0,88 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,83 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz).

(a-iv) (S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-3-metil-1-oxobutan-2-ilcarbamato de alilo (**15**)

Se añadió EEDQ (5,51 g, 22,29 mmol, 1,05 equiv.) a una solución de alcohol p-aminobencílico (2,74 g, 22,29 mmol, 1,05 equiv.) y ácido **14** (5,78 g, 21,23 mmol, 1 equiv.) en THF seco (100 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas. Después, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y el sólido de color pardo resultante se trituró con éter dietílico y se filtró con el lavado posterior con un exceso de éter dietílico para dar el producto en forma de un sólido de color blanquecino (7,1 g, 88 %). CL/EM (1,980 min (ES⁺)), *m/z*: 378,0 [M+H]⁺. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9,89 (s a, 1H), 8,13 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz), 7,52 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 7,26 (m, 1H), 7,23 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 5,91 (m, 1H), 5,30 (m, 1H), 5,17 (m, 1H), 4,46 (m, 2H), 5,09 (t, 1H, *J* = 5,6 Hz), 4,48 (m, 2H), 4,42 (m, 3H), 3,89 (dd, 1H, *J* = 8,6, 6,8 Hz), 1,97 (m, 1H), 1,30 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 0,88 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,83 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz).

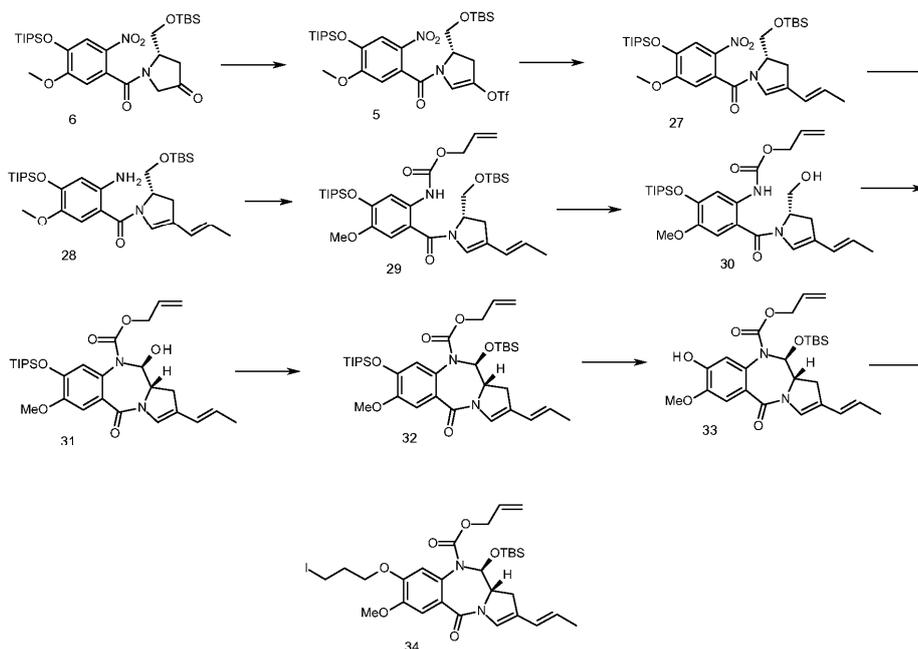
(b)



Ácido 1-yodo-2-oxo-6,9,12,15-tetraoxa-3-azaoctadecan-18-oico (**17**)

Se añadió una solución de anhídrido yodoacético (0,250 g, 0,706 mmol, 1,1 equiv.) en DCM seco (1 ml) a ácido amino-PEG₍₄₎ **16** (0,170 g, 0,642 mmol, 1,0 equiv.) en DCM (1 ml). La mezcla se agitó en la oscuridad a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se lavó con HCl 0,1 M, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, MeOH al 3% y ácido fórmico al 0,1% en cloroformo a MeOH al 10% y ácido fórmico al 0,1% en cloroformo) para dar el producto en forma de un aceite de color naranja (0,118 g, 42%). CL/EM (1,623 min (ES⁺)), *m/z*: 433,98 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,069 (s, 1H), 7,22 (s a, 1H), 3,79 (t, 2H, *J* = 5,8 Hz), 3,74 (s, 2H), 3,72 - 3,58 (m, 14H), 3,50 - 3,46 (m, 2H), 2,62 (t, 2H, *J* = 5,8 Hz).

(ii) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-(3-yodopropoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (**34**)



(a) *Trifluorometanosulfonato de (S)-5-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-1-(5-metoxi-2-nitro-4-(triosopropilsililoxi)benzoil)-4,5-dihidro-1H-pirrol-3-ilo (7)*

5 Se añadió gota a gota anhídrido triflico (28,4 g, 100,0 mmol, 3,0 equiv.), a lo largo de 25 min, a una solución en agitación vigorosa de la cetona **6** (19,5 g, 30,0 mmol, 1,0 equiv.) en DCM (550 ml) que contenía 2,6-lutidina (14,4 g, 130,0 mmol, 4,0 equiv.) a -50°C. La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 horas cuando la CL/EM indicó que la reacción se había completado. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (100 ml), bicarbonato de sodio saturado (150 ml), salmuera (50 ml) y la fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 90/10 v/v *n*-hexano/EtOAc) para dar el producto en forma de un aceite de color amarillo pálido (19,5 g, 82 %). CL/EM (4,391 min (ES⁺)), *m/z*: 713,25 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,68 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,02 (t, 1H, *J* = 1,9 Hz), 4,75 (m, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,15 (ddd, 1H, *J* = 16,2, 10,3, 2,3 Hz), 2,96 (ddd, 1H, *J* = 16,2, 4,0, 1,6 Hz), 1,28 - 1,21 (m, 3H), 1,07 (d, 18H, *J* = 7,2 Hz), 0,88 (s, 9H), 0,09 (s, 3H), 0,08 (s, 3H).

15 (b) *(S,E)-(2-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-(prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)(5-metoxi-2-nitro-4-(triosopropilsililoxi)fenil)metanona (27)*

20 Se añadió Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,41 g, 0,35 mmol, 0,03 equiv.) a una mezcla del triflato **7** (8,4 g, 11,8 mmol, 1,0 equiv.), ácido *E*-1-propeno-1-ilborónico (1,42 g, 16,5 mmol, 1,4 equiv.) y fosfato potásico (5,0 g, 23,6 mmol, 2,0 equiv.) en dioxano seco (60 ml) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 25°C durante 120 min cuando la CL/EM indicó que la reacción se había completado. Se añadieron acetato de etilo (120 ml) y agua (120 ml), se retiró la fase orgánica, se lavó con salmuera (20 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 95/5 v/v *n*-hexano/EtOAc a 90/10 v/v *n*-hexano/EtOAc) para dar el producto en forma de una espuma de color amarillo (4,96 g, 70 %). CL/EM (4,477 min (ES⁺)), *m/z*: 605,0 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,67 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 5,93 (d, 1H, *J* = 15,4 Hz), 5,67 (s, 1H), 4,65 (m, 1H), 4,04 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 2,85 (m, 1H), 2,71 (m, 1H), 1,72 (dd, 3H, *J* = 6,8, 1,0 Hz), 1,30 - 1,22 (m, 3H), 1,07 (d, 18H, *J* = 7,2 Hz), 0,87 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H).

30 (c) *(S,E)-(2-amino-5-metoxi-4-(triosopropilsililoxi)fenil)(2-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-(prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona (28)*

35 Se añadió polvo de cinc (22,0 g, 0,33 mol, 37 equiv.), en porciones a lo largo de 20 min, a una solución del intermedio de propenilo **27** (5,5 g, 9,1 mmol, 1,0 equiv.) en ácido fórmico/etanol al 5% v/v (55 ml), usando un baño de hielo para mantener la temperatura entre 25-30°C. Después de 30 min, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho corto de celite®. El celite® se lavó con acetato de etilo (65 ml) y los extractos orgánicos combinados se lavaron sucesivamente con agua (35 ml), bicarbonato de sodio saturado (35 ml) y salmuera (10 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 90/10 v/v *n*-hexano/EtOAc) para dar el producto en forma de un aceite de color amarillo pálido (3,6 g, 69,0 %). CL/EM (4,439 min (ES⁺)), *m/z*: 575,2 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6,75 (m, 1H), 6,40 (s a, 1H), 6,28 (m, 1H), 6,11 (d, 1H, *J* = 15,4 Hz), 5,53 (m, 1H), 4,67 (m, 1H), 4,36 (m, 2H), 3,93 (s a, 1H), 3,84 (s a, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,86 (dd, 1H, *J* = 15,7, 10,4 Hz), 2,73 (dd, 1H, *J* = 15,9, 4,5 Hz), 1,80 (dd, 3H, *J* = 6,8, 1,3 Hz), 1,35 - 1,23 (m, 3H), 1,12 (d, 18H, *J* = 7,3 Hz), 0,89 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), 0,07 (s, 3H).

45 (d) *2-(2-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-(prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(triosopropilsililoxi)fenilcarbamato de (S,E)-alilo (29)*

50 Se añadió cloroformato de alilo (0,83 g, 6,88 mmol, 1,1 equiv.) a una solución de la amina **28** (3,6 g, 6,26 mmol, 1,0 equiv.) en DCM seco (80 ml) que contenía piridina seca (1,09 g, 13,77 mmol, 2,2 equiv.) a -78°C. Se retiró la nieve carbónica y se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Tras agitar durante 15 minutos adicionales, la CL/EM indicó que la reacción se había completado. La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl 0,01 N (50 ml), bicarbonato de sodio saturado (50 ml), salmuera (10 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para dejar un aceite de color amarillo pálido que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (4,12 g, se asume un 100% de rendimiento). CL/EM (4,862 min (ES⁺)), *m/z*: 659,2 [M+H]⁺.

55 (e) *2-(2-(hidroximetil)-4-(prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-(triosopropilsililoxi)fenilcarbamato de (S,E)-alilo (30)*

60 El intermedio en bruto **29** (se asume un 100% de rendimiento, 4,12 g, 6,25 mmol, 1,0 equiv.) se disolvió en una mezcla de ácido acético (70 ml), metanol (10 ml), THF (10 ml) y agua (20 ml) y se dejó en agitación a temperatura ambiente. Después de 6 horas, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (500 ml) y se lavó sucesivamente con agua (2 x 500 ml), bicarbonato de sodio saturado (300 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 1/99 v/v metanol/DCM a 5/95 v/v metanol/DCM) para dar el producto en forma de un aceite de color amarillo y se recuperó 1 g adicional del material de partida sin reaccionar. Este material se sometió a las mismas condiciones de reacción anteriores, pero se dejó en agitación durante 16 h. Tras la elaboración y

purificación, se aisló producto adicional (2,7 g, 79%, 2 etapas) CL/EM (3,742 min (ES⁺)), *m/z*: 545,2 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,38 (m, 1H), 7,72 (m, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,37 (m, 1H), 6,10 (d, 1H, *J* = 15,8 Hz), 5,97 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,36 (ddd, 1H, *J* = 17,2, 3,1, 1,5 Hz), 5,25 (ddd, 1H, *J* = 10,4, 2,5, 1,3 Hz), 4,78 (m, 1H), 4,65 (dt, 2H, *J* = 5,7, 1,3 Hz), 3,84 (m, 3H), 3,79 (s, 3H), 3,04 (dd, 1H, *J* = 16,7, 10,5 Hz), 2,40 (dd, 1H, *J* = 16,0, 4,5 Hz), 1,82 (dd, 3H, *J* = 6,8, 1,0 Hz), 1,36 - 1,26 (m, 3H), 1,14 (d, 18H, *J* = 7,3 Hz).

(f) 11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((*E*)-prop-1-enil)-8-(trisisopropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11a*S*)-alilo (**31**)

10 Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido seco (1,16 g, 14,87 mmol, 3,0 equiv.) a una solución de cloruro de oxalilo (0,94 g, 7,43 mmol, 1,5 equiv.) en DCM (25 ml) a -78°C en una atmósfera de nitrógeno. Manteniendo la temperatura a -78°C, después de 10 min se añadió gota a gota una solución del alcohol primario **30** (2,7 g, 4,96 mmol, 1,0 equiv.) en DCM (20 ml). Después de 15 min adicionales, se añadió trietilamina seca (2,5 g, 24,78 mmol, 5,0 equiv.) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó sucesivamente con HCl 0,1 N frío (50 ml), hidrogenocarbonato de sodio saturado (50 ml) y salmuera (10 ml) y la capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para dar el producto en forma de un aceite de color amarillo que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (2,68g, se asume un 100% de rendimiento). CL/EM (3,548 min (ES⁺)), *m/z*: 543,2 [M+H]⁺.

20 (g) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((*E*)-prop-1-enil)-8-(trisisopropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11a*S*)-alilo (**32**)

25 Se añadió sulfonato de terc-butildimetilsilil trifluorometano (3,93 g, 14,87 mmol, 3,0 equiv.) a una solución de la carbonilamina **31** (se asume un 100% de rendimiento, 2,68 g, 4,96 mmol, 1,0 equiv.) y 2,6-lutidine (2,12 g, 19,83 mmol, 4,0 equiv.) en DCM seco (40 ml) a 0°C en una atmósfera de nitrógeno. Después de 10 minutos, se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 60 minutos más. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (10 ml), bicarbonato de sodio saturado (10 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, cloroformo a 2/98 v/v metanol/cloroformo) para dar el producto en forma de un aceite de color amarillo (2,0g, 63%, 2 etapas). CL/EM (4,748 min (ES⁺)), *m/z*: 657,2 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,19 (s, 1H), 6,86 (m, 1H), 6,66 (s, 1H), 6,22 (d, 1H, *J* = 15,4 Hz), 5,81 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 5,78 (m, 1H), 5,48 (m, 1H), 5,11 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz), 5,08 (m, 1H), 4,58 (dd, 1H, *J* = 13,4, 5,4 Hz), 4,35 (dd, 1H, *J* = 13,2, 5,7 Hz), 3,83 (s, 3H), 3,76 (s, 1H), 3,00 (dd, 1H, *J* = 15,6, 11,0 Hz), 2,53 (m, 1H), 1,81 (dd, 3H, *J* = 6,8, 0,9 Hz), 1,30 - 1,18 (m, 3H), 1,08 (d, 9H, *J* = 2,3 Hz), 1,06 (d, 9H, *J* = 2,3 Hz), 0,86 (s, 9H), 0,25 (s, 3H), 0,18 (s, 3H).

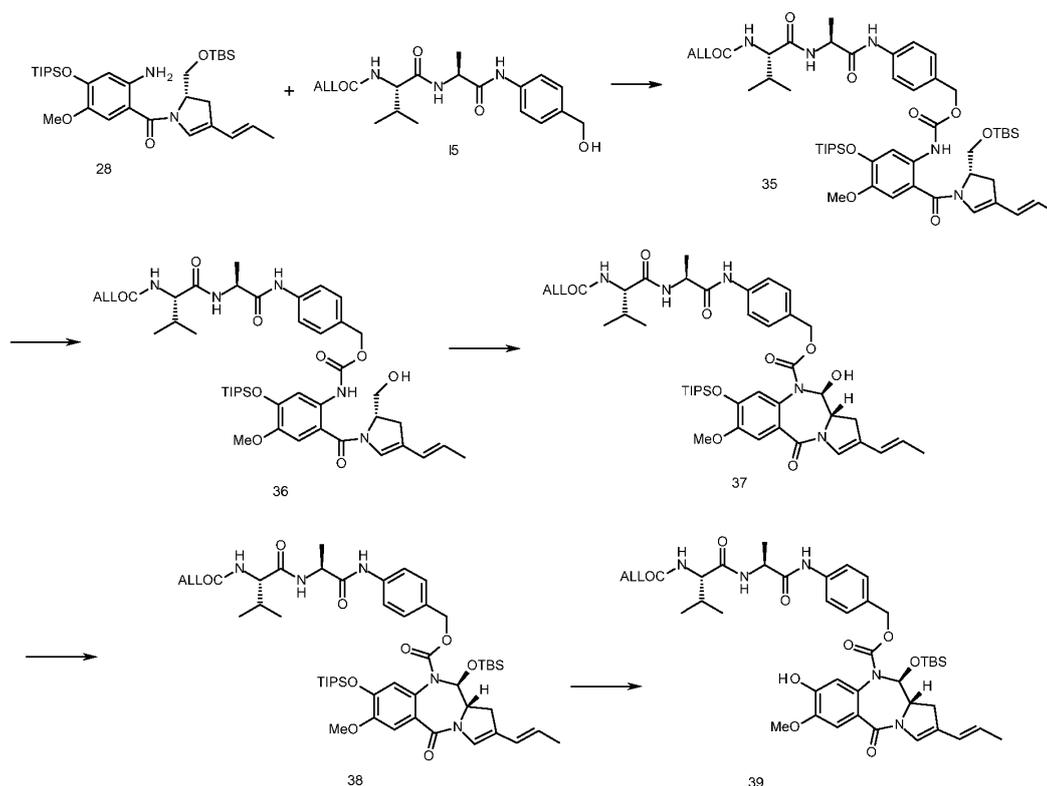
35 (h) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((*E*)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11a*S*)-alilo (**33**)

40 Se añadió dihidrato de acetato de litio (0,31 g, 3,04 mmol, 1,0 equiv.) a una solución de la diazepina **32** (2,0 g, 3,04 mmol, 1,0 equiv.) en DMF húmedo (20 ml) a 25°C y se agitó durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 0,1 M (50 ml, pH 3), agua (50 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 50/50 v/v *n*-hexano/EtOAc a 25/75 v/v *n*-hexano/EtOAc) para dar el producto en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,68g, 45 %). CL/EM (3,352 min (ES⁺)), *m/z*: 501,1 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,02 (s, 1H), 6,66 (m, 1H), 6,53 (s, 1H), 6,03 (d, 1H, *J* = 15,5 Hz), 5,80 (s, 1H), 5,63 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 5,55 (m, 1H), 5,29 (m, 1H), 4,87 (m, 2H), 4,39 (dd, 1H, *J* = 13,5, 4,2 Hz), 4,20 (dd, 1H, *J* = 13,2, 5,7 Hz), 3,73 (s, 3H), 3,59 (m, 1H), 2,81 (dd, 1H, *J* = 16,1, 10,5 Hz), 2,35 (d, 1H, *J* = 15,7 Hz), 1,61 (d, 3H, *J* = 6,4 Hz), 0,67 (s, 9H), 0,05 (s, 3H), 0,00 (s, 3H).

50 (i) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-(3-yodopropoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((*E*)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11a*S*)-alilo (**34**)

55 Se añadieron diyodopropano (0,295 g, 1,00 mmol, 5,0 equiv.) y carbonato de potasio (0,028 g, 0,20 mmol, 1,0 equiv.) a una solución del fenol **33** (0,100 g, 0,020 mmol, 1,0 equiv.) en acetona seca (5 ml). La mezcla de reacción se calentó a 60°C durante 6 horas, cuando la CL/EM mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 75/25 v/v *n*-hexano/EtOAc a 50/50 v/v *n*-hexano/EtOAc) para dar el producto en forma de un aceite incoloro (0,074 g, 56%). CL/EM (3,853 min (ES⁺)), *m/z*: 669,0 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,26 (s, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,24 (d, 1H, *J* = 15,3 Hz), 5,87 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 5,78 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,12 (m, 2H), 4,65 (m, 2H), 4,41 (m, 1H), 4,11 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,81 (m, 1H), 3,40 (t, 2H, *J* = 6,7 Hz), 3,05 (dd, 1H, *J* = 16,3, 10,1 Hz), 2,57 (m, 1H), 2,34 (m, 2H), 1,84 (d, 3H, *J* = 6,6 Hz), 0,92 (s, 9H), 0,28 (s, 3H), 0,26 (s, 3H).

65 (iii) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((*E*)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11*S*,11a*S*)-4-((*S*)-2-((*S*)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)encilo (**39**)



(a) ((S)-1-(((S)-1-(4-(((2-(((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((triospropilsilil)oxi)fenil)carbamoil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo (**35**)

Se añadió trietilamina (0,256 ml, 1,84 mmol, 2,2 equiv.) a una solución en agitación de la amina **28** (0,480 g, 0,835 mmol, 1,0 equiv.) y trifosgeno (0,089 g, 0,301 mmol, 0,36 equiv.) en THF seco (15 ml) a 5°C (baño de hielo). El progreso de la reacción de isocianato se monitorizó retirando de manera periódica alícuotas de la mezcla de reacción e inactivándolas con metanol y llevando a cabo un análisis por CLEM. Una vez que se completó la reacción de isocianato, se añadió rápidamente mediante inyección una solución de Alloc-Val-Ala-PABOH **15** (0,473 g, 1,25 mmol, 1,5 equiv.) y trietilamina (0,174 ml, 1,25 mmol, 1,5 equiv.) en THF seco (10 ml) al isocianato recién preparado. La reacción se dejó en agitación a 40°C durante 4 horas, seguido de agitación a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se concentró a presión reducida y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 20/80 v/v n-hexano/EtOAc a 50/50 v/v n-hexano/EtOAc, después, 1/99 v/v DCM/MeOH a 5/95 v/v DCM/MeOH) para dar el producto en forma de un sólido de color amarillo (0,579 g, 71%). CL/EM (4,468 min (ES⁺)), *m/z*: 978,55 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,63 (s a, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,78 (s a, 1H), 7,53 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz), 7,31 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz), 6,76 (s, 1H), 6,59 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 6,36 (s a, 1H), 6,04 (d, 1H, *J* = 15,9 Hz), 5,90 (m, 1H), 5,55 (m, 1H), 5,33 - 5,21 (m, 3H), 5,10 (s, 2H), 4,66 (m, 2H), 4,57 (dd, 2H, *J* = 5,6, 1,0 Hz), 3,98 (dd, 1H, *J* = 7,3, 6,8 Hz), 3,90 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,78 (s, 3H), 2,82 (dd, 1H, *J* = 15,4, 9,6 Hz), 2,72 (dd, 1H, *J* = 15,9, 3,5 Hz), 2,17 (m, 1H), 1,78 (dd, 3H, *J* = 6,5, 0,8 Hz), 1,46 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,29 (m, 3H), 1,11 (d, 18H, *J* = 7,1 Hz), 0,97 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,92 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,83 (s, 9H), 0,04 (s, 3H), 0,01 (s, 3H).

(b) ((S)-1-(((S)-1-(4-(((2-((S)-2-(hidroximetil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5-((triospropilsilil)oxi)fenil)carbamoil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato de alilo (**36**)

Se disolvió el éter de siliilo **35** (1,49 g, 1,52 mmol, 1,0 equiv.) en una mezcla 7:1:1:2 de ácido acético/metanol/tetrahidrofurano/agua (14:2:2:4 ml) y se dejó en agitación a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la reacción se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó secuencialmente con agua, bicarbonato de sodio acuoso y después salmuera. Después, se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 100/0 después 99/1 a 92/8 v/v DCM/MeOH) para dar el producto en forma de un sólido de color naranja (1,2 g, 92%). CL/EM (3,649 min (ES⁺)), *m/z*: 865,44 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,44 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,69 (s a, 1H), 7,53 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz), 7,32 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz), 6,78 (s, 1H), 6,56 (m, 2H), 6,32 (s a, 1H), 6,05 (d, 1H, *J* = 14,9 Hz), 5,90 (m, 1H), 5,56 (m, 1H), 5,30 (m, 2H), 5,22 (m, 1H), 5,10 (d, 2H, *J* = 3,1 Hz), 4,73 (m, 1H), 4,64 (m, 1H), 4,57 (d, 2H, *J* = 5,8 Hz), 4,01 (m, 1H), 3,79 (m, 2H), 3,76 (s, 3H), 2,98 (dd, 1H, *J* = 16,3, 10,2 Hz), 2,38 (dd, 1H, *J* = 16,6, 4,1 Hz), 2,16 (m, 1H), 1,78 (dd, 3H, *J* = 6,8, 0,9 Hz), 1,46 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,29 (m, 3H), 1,11 (d, 18H, *J* = 7,4 Hz), 0,97 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz), 0,92 (d, 3H, *J* = 6,8

Hz).

(c) 11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triisopropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**37**)

5 Se añadió gota a gota dimetilsulfóxido seco (0,180 g, 2,3 mmol, 3,0 equiv.) a una solución de cloruro de oxalilo (0,147 g, 1,1 mmol, 1,5 equiv.) en DCM (10 ml) a -78°C en una atmósfera de nitrógeno. Manteniendo la temperatura a -78°C, después de 20 minutos, se añadió gota a gota una solución del alcohol primario **36** (0,666 g, 0,77 mmol, 1,0 equiv.) en DCM (10 ml). Después de 15 minutos adicionales, se añadió trietilamina seca (0,390 g, 3,85 mmol, 5,0 equiv.) y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó sucesivamente con HCl 0,1 N frío (10 ml), hidrogenocarbonato de sodio saturado (10 ml) y salmuera (5 ml). Después, se secó la capa orgánica sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. Después, se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 50/50 v/v n-hexano/EtOAc a 25/75 v/v n-hexano/EtOAc) para dar el producto en forma de un sólido de color blanco (0,356 g, 54 %). CL/EM (3,487 min (ES⁺)), *m/z*: 862,2 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,34 (s a, 1H), 7,47 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz), 7,17 (s, 1H), 7,14 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz), 6,86 (s a, 1H), 6,65 (s a, 1H), 6,42 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 6,22 (d, 1H, *J* = 14,4 Hz), 5,80 (m, 1H), 5,40 (m, 1H), 5,53 (m, 1H), 5,32 (m, 1H), 5,21 (d, 2H, *J* = 9,6 Hz), 5,06 (d, 1H, *J* = 12,3 Hz), 4,90 (m, 1H), 4,58 (m, 3H), 3,98 (m, 1H), 3,84 (m, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,50 (m, 1H), 3,05 (dd, 1H, *J* = 16,0, 10,3 Hz), 2,76 (m, 1H), 2,15 (m, 1H), 1,80 (dd, 3H, *J* = 6,7, 0,8 Hz), 1,44 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,16 (m, 3H), 1,01 (d, 18H, *J* = 6,6 Hz), 0,96 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,92 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz).

(d) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-8-(triisopropilsililoxi)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**38**)

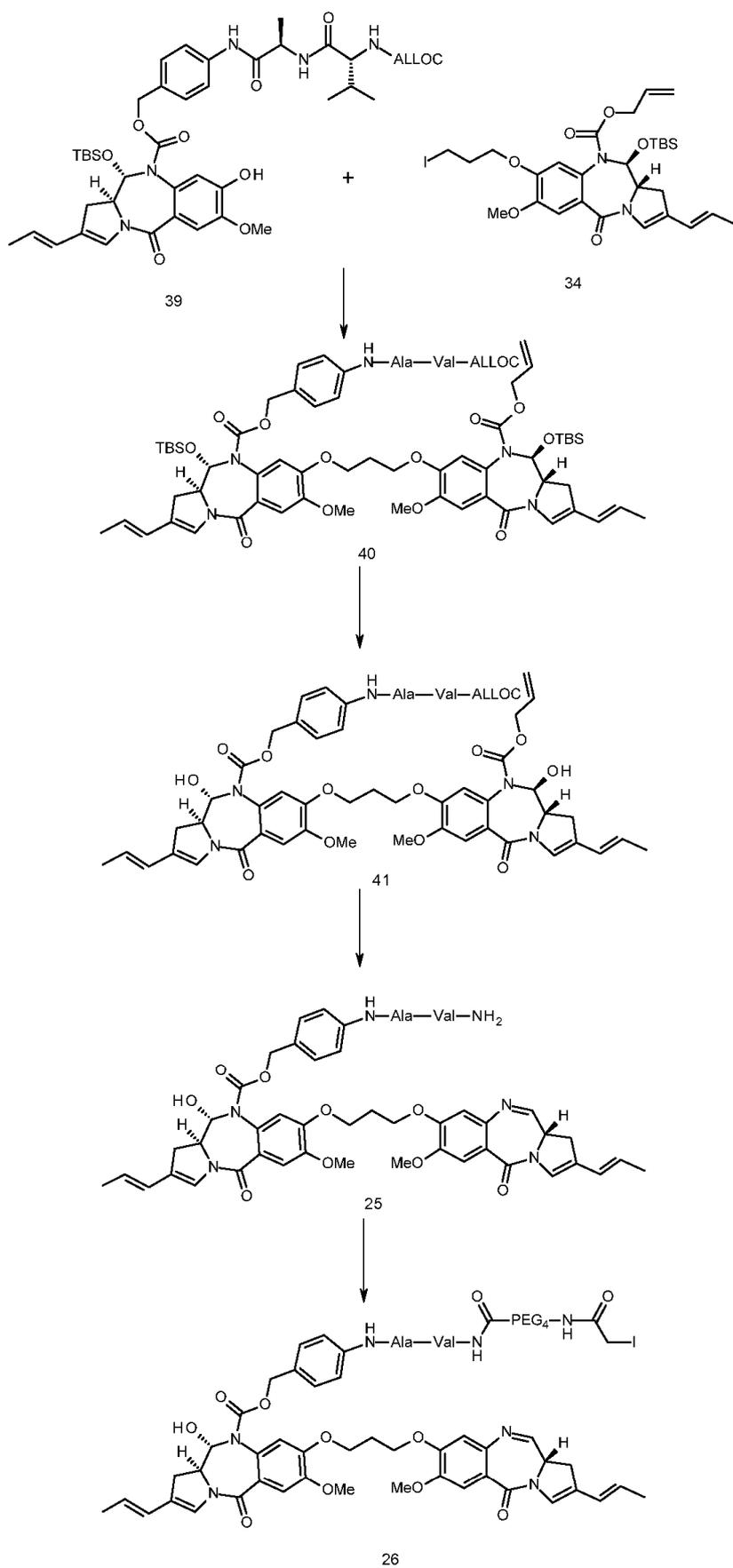
25 Se añadió sulfonato de 1H-butildimetilsililtrifluorometano (0,46 g, 1,74 mmol, 3,0 equiv.) a una solución del alcohol secundario **37** (0,5 g, 0,58 mmol, 1,0 equiv.) y 2,6-lutidina (0,25 g, 2,32 mmol, 4,0 equiv.) en DCM seco (10 ml) a 0°C en una atmósfera de nitrógeno. Después de 10 minutos, se dejó calentar la mezcla a temperatura ambiente y se agitó durante 120 minutos adicionales. Después, se lavó sucesivamente la fase orgánica con agua (10 ml), bicarbonato de sodio saturado (10 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 50/50 v/v n-hexano/EtOAc) para dar el producto en forma de un sólido de color blanco (0,320 g, 57 %). CL/EM (4,415 min (ES⁺)), *m/z*: 976,52 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,31 (s a, 1H), 7,48 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz), 7,21 (s, 1H), 7,14 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz), 6,89 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 6,38 (d, 1H, *J* = 7,3 Hz), 6,25 (d, 1H, *J* = 14,6 Hz), 5,93 (m, 1H), 5,85 (d, 1H, *J* = 8,8 Hz), 5,50 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 5,24 (m, 2H), 5,15 (d, 1H, *J* = 12,5 Hz), 4,86 (d, 1H, *J* = 12,2 Hz), 4,62 (m, 3H), 4,01 (m, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,78 (m, 1H), 3,04 (m, 1H), 2,56 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 1,84 (dd, 3H, *J* = 6,6, 0,7 Hz), 1,48 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 1,20 (m, 3H), 1,05 (d, 9H, *J* = 2,9 Hz), 1,03 (d, 9H, *J* = 2,9 Hz), 0,99 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,95 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,88 (s, 9H), 0,27 (s, 3H), 0,14 (s, 3H).

(e) 11-(terc-butildimetilsililoxi)-8-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (**39**)

45 Se añadió dihidrato de acetato de litio (0,010 g, 0,10 mmol, 1,0 equiv.) a una solución del éter de sililo **38** (0,100 g, 0,10 mmol, 1,0 equiv.) en DMF húmeda (2 ml) a 25°C durante 3 horas. Después, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (20 ml) y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 0,1 M (20 ml, pH 3), agua (20 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 5/95 v/v metanol/DCM) para dar el producto en forma de un aceite de color amarillo pálido (0,070 g, 83 %). CL/EM (3,362 min (ES⁺)), *m/z*: 820,2 [M+H]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (s, 1H), 7,48 (d, 2H, *J* = 8,2 Hz), 7,25 (s, 1H), 7,12 (d, 2H, *J* = 8,1 Hz), 6,88 (s, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,47 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz), 6,24 (d, 1H, *J* = 15,2 Hz), 6,03 (s, 1H), 5,92 (m, 1H), 5,84 (d, 1H, *J* = 8,9 Hz), 5,50 (m, 1H), 5,34 (m, 1H), 5,26 (m, 2H), 5,18 (d, 1H, *J* = 12,3 Hz), 4,80 (d, 1H, *J* = 12,4 Hz), 4,66 - 4,60 (m, 3H), 4,02 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,81 (m, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,57 (m, 1H), 2,19 (m, 1H), 1,84 (dd, 3H, *J* = 6,8, 0,8 Hz), 1,48 (d, 3H, *J* = 7,1 Hz), 1,00 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,95 (d, 3H, *J* = 6,8 Hz), 0,87 (s, 9H), 0,26 (s, 3H), 0,12 (s, 3H).

(iv) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxa-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)bencilo (**26, A**)

60



(a) 8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((R)-2-((R)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)benziloxi)carbonil)-11-(terc-butildimetilsililo)xi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,10,11,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-11-(terc-butildimetilsililo)xi)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (**40**)

Se añadió carbonato de potasio (0,030 g, 0,21 mmol, 1,0 equiv.) a una solución del fenol **39** (0,175 g, 0,21 mmol, 1,0 equiv.) y el enlazador de yodo **34** (0,214 g, 0,32 mmol, 1,5 equiv.) en acetona (10 ml). La mezcla de reacción se calentó en una atmósfera de nitrógeno a 75°C en un matraz sellado durante 17 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad a presión reducida y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 2/98 v/v metanol/DCM a 5/95 v/v metanol/DCM) para dar el producto en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,100 g, 35%). CL/EM (4,293 min (ES⁺)), *m/z*: 1359,13 [M]⁺.

(b) 8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((R)-2-((R)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)benziloxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,10,11,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (**41**)

Se añadió fluoruro de tetra-n-butilamonio (1M, 0,22 ml, 0,22 mmol, 2,0 equiv.) a una solución del éter de sililo **40** (0,150 g, 0,11 mmol, 1,0 equiv.) en THF seco (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras lo cual, la CL/EM indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (10 ml) y se lavó secuencialmente con agua (5 ml) y salmuera (5 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para dejando un sólido de color amarillo. La purificación mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, 6/94 v/v metanol/DCM a 10/90 v/v metanol/DCM) dio el producto en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,090 g, 73%). CL/EM (2,947 min (ES⁺)), *m/z*: 1154,0 [M+Na]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (s a, 1H), 7,39 (d, 2H, *J* = 7,6 Hz), 7,18 (d, 2H, *J* = 10,6 Hz), 7,10 (m, 3H), 6,86 (d, 2H, *J* = 10,0 Hz), 6,74 (s, 1H), 6,55 (s, 1H), 6,22 (dd, 2H, *J* = 15,3, 6,6 Hz), 5,85 (m, 2H), 5,74 (m, 3H), 5,52 (m, 2H), 5,22 (m, 1H), 5,00 (m, 2H), 4,57 (m, 6H), 4,41 (m, 2H), 4,09 (m, 4H), 3,85 (m, 11H), 3,06 (m, 2H), 2,76 (m, 2H), 2,20 (m, 2H), 2,08 (m, 1H), 1,79 (d, 6H, *J* = 6,4 Hz), 1,40 (d, 3H, *J* = 6,1 Hz), 0,90 (m, 6H).

(c) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((R)-2-((R)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)benzilo (**25**)

Se añadió Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (0,005 g, 0,005 mmol, 0,06 equiv.) a una solución de la bis-carbonilamina **41** (0,090 g, 0,08 mmol, 1,0 equiv.) y pirrolidina (16 µl, 0,20 mmol, 2,5 equiv.) en DCM seco (5 ml). Después de 20 minutos, se diluyó la mezcla de reacción con DCM (10 ml) y se lavó secuencialmente con cloruro de amonio saturado (5 ml) y salmuera (5 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se retiró a presión reducida, dejando el producto en bruto en forma de un sólido de color amarillo pálido que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional (0,075 g, se asume un 100% de rendimiento). CL/EM (2,060 min (ES⁺)), *m/z*: 947,2 [M+H]⁺.

(d) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)benzilo (**26, A**)

Se añadió EDCI (0,015 g, 0,08 mmol, 1,0 equiv.) a una solución de la amina **25** (se asume un 100% de rendimiento 0,075 g, 0,08 mmol, 1,0 equiv.) y yodoacetamida-PEG₄-ácido **17** (0,034 g, 0,08 mmol, 1,0 equiv.) en diclorometano seco (5 ml) y la reacción se agitó en la oscuridad. Después de 50 minutos, se añadió una cantidad adicional de yodoacetamida-PEG₄-ácido **17** (0,007 g, 0,016 mmol, 0,2 equiv.) junto con una cantidad adicional de EDCI (0,003 g, 0,016 mmol, 0,2 equiv.). Tras un total de 2,5 horas, se diluyó la mezcla de reacción con diclorometano (15 ml) y se lavó secuencialmente con agua (10 ml) y salmuera (10 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, cloroformo al 100% a 90:10 v/v cloroformo:metanol). Las fracciones puras se combinaron para dar el producto (0,0254 g, 23%, 2 etapas). Las fracciones en bruto se recogieron y purificaron mediante TLC preparativa (gel de sílice, 90:10 v/v cloroformo:metanol) para dar un segundo lote de producto (0,0036 g, 3%, 2 etapas). CL/EM (2,689 min (ES⁺)), *m/z*: 681,0 1/2[M+2H]⁺.

Métodos experimentales generales para el Ejemplo 3

El progreso de la reacción se controló mediante cromatografía de capa fina (TLC) usando gel de sílice Merck Kieselgel 60 F254, con indicador fluorescente, sobre placas de aluminio. La visualización de la TLC se logró con luz UV o vapor de yodo, a menos que se indique otra cosa. La cromatografía ultrarrápida se llevó a cabo usando gel de sílice Merck Kieselgel 60 F254. Los disolventes de extracción y cromatografía se compraron y usaron sin purificación adicional de Fisher Scientific, R. U. Todos los productos químicos se compraron de Aldrich, Lancaster o BDH.

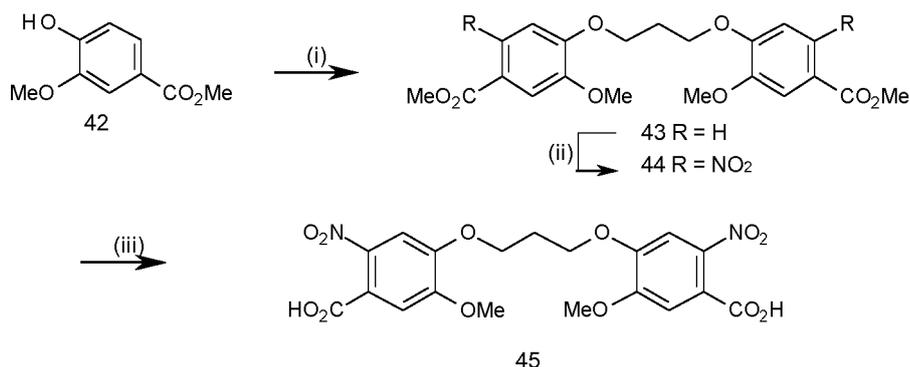
Se midieron valores de desplazamiento químico de RMN de protón en la escala delta a 400 MHz usando un dispositivo Bruker AV400. Se han usado las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuadruplete; quin., quintuplete; m, multiplete; br, ancho. Las constantes de acoplamiento se notifican en hertzios. A menos que se indique otra cosa, las cromatografías en columna (mediante el procedimiento ultrarrápido) se llevaron a cabo en sílice Merck Kieselgel (Art. 9385). Los datos de espectrometría de masas (EM) se recogieron usando un instrumento Waters Micromass LCT acoplado a un módulo de separación Waters 2795 HPLC. La cromatografía de capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas de aluminio gel de sílice (Merck 60, F₂₅₄). Todos los demás productos químicos y disolventes se usaron tal cual sin purificación adicional.

- 5
10
15

O, gradiente del 5% de B aumentando hasta 100% de B a lo largo de 10,00 min, permaneciendo con 100% de B durante 2,00 min y después volviendo a reducir hasta 5% de B a lo largo de 0,10 minutos (mantenido durante 2,90 min). El tiempo de ejecución total es de 15 minutos. Columna: Gemini-NX 3u C18 110A, 100 x 2,00mm; (Sistema 2).
20 Los cromatogramas se basan en la detección UV a 254 nm. Los espectros de masas se lograron usando el EM en modo positivo.

Ejemplo 3

- 25 (a) 1',3'-Bis(4-carboxi-2-metoxi-5-nitrofenoxi)propano (**45**)



- (i) 1',3'-Bis[2-metoxi-4-(metoxicarbonil)fenoxi]propano (**43**)

- 30
35
40
- Se añadió gota a gota azodicarboxilato de diisopropilo (71,3 ml, 73,2 g, 362 mmol) a lo largo de un periodo de 60 minutos a una solución agitada superiormente de vanilato de metilo **42** (60,0 g, 329 mmol) y Ph₃P (129,4 g, 494 mmol) en THF anhidro (800 ml) a 0-5 °C (hielo/acetona) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se dejó en agitación a 0-5 °C durante 1 hora adicional, tiempo tras el cual se añadió gota a gota una solución de 1,3-propanodiol (11,4 ml, 12,0 g, 158 mmol) en THF (12 ml) a lo largo de un periodo de 20 minutos. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 5 días. El precipitado de color blanco resultante **43** se recogió por filtración al vacío, se lavó con THF y se secó al vacío en un desecador de vacío hasta lograr un peso constante. Rendimiento = 54,7 g (84% basándose en 1,3-propanodiol). Pureza satisfactoria mediante CL/EM (3,20 min (ES+) *m/z* (intensidad relativa) 427 ([*M* + Na]⁺, 10); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,64 (dd, 2H, *J* = 1,8, 8,3 Hz), 7,54 (d, 2H, *J* = 1,8 Hz), 6,93 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz), 4,30 (t, 4H, *J* = 6,1 Hz), 3,90 (s, 6H), 3,89 (s, 6H), 2,40 (p, 2H, *J* = 6,0 Hz).

- (ii) 1',3'-Bis[2-metoxi-4-(metoxicarbonil)-5-nitrofenoxi]propano (**44**)

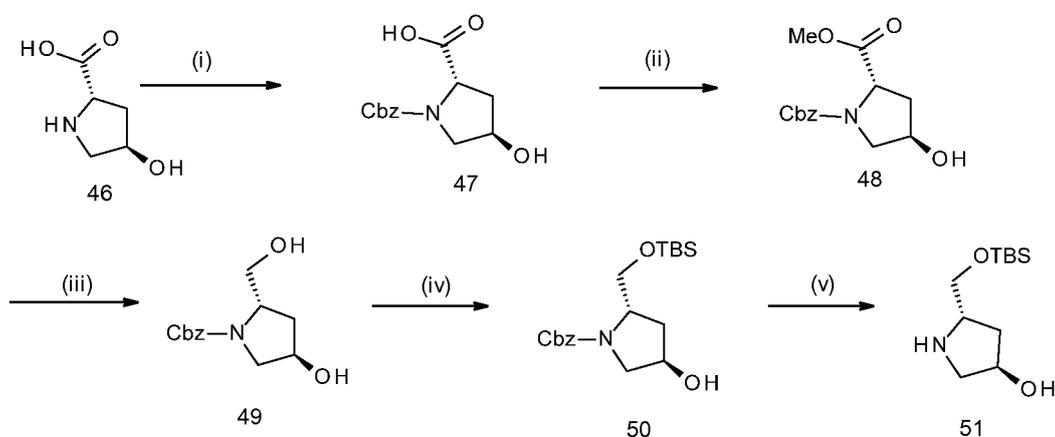
- 45
50
- Se añadió lentamente Cu(NO₃)₂·3H₂O sólido (81,5 g, 337,5 mmol) a una suspensión agitada superiormente del biséster **43** (54,7 g, 135 mmol) en anhídrido acético (650 ml) a 0-5 °C (hielo/acetona). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 hora a 0-5 °C y después se dejó calentar a temperatura ambiente. Una leve exoterma (aprox. 40-50 °C), acompañada del espesamiento de la mezcla y del desprendimiento de NO₂ se observó en esta etapa. Se añadió anhídrido acético adicional (300 ml) y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo (~1,5 l), se agitó y se dejó que volviese a temperatura ambiente. El precipitado de color amarillo resultante se recogió mediante filtración al vacío y se secó en un desecador para dar el compuesto de bis-nitro deseado **44** en forma de un sólido de color amarillo. Rendimiento =

66,7 g (100%). Pureza satisfactoria mediante CL/EM (3,25 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 517 ($[M + Na]^+$, 40); RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,49 (s, 2H), 7,06 (s, 2H), 4,32 (t, 4H, $J = 6,0$ Hz), 3,95 (s, 6H), 3,90 (s, 6H), 2,45-2,40 (m, 2H).

5 (iii) *1',3'-Bis(4-carboxi-2-metoxi-5-nitrofenoxi) propano (45)*

Se trató una suspensión del éster de metilo **44** (66,7 g, 135 mmol) en THF (700 ml) con NaOH 1N (700 ml) y la mezcla de reacción se dejó en agitación vigorosa a temperatura ambiente. Después de 4 días de agitación, la suspensión se convirtió en una solución de color oscuro que se sometió a evaporación rotatoria a presión reducida para retirar el THF. El residuo acuoso resultante se acidificó a pH 1 con HCl concentrado y el precipitado incoloro **45** se recogió y se secó minuciosamente en un horno de vacío (50°C), Rendimiento = 54,5 g (87%). Pureza satisfactoria mediante CL/EM (2,65 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 489 ($[M + Na]^+$, 30)); RMN 1H (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7,62 (s, 2H), 7,30 (s, 2H), 4,29 (t, 4H, $J = 6,0$ Hz), 3,85 (s, 6H), 2,30-2,26 (m, 2H).

15 (b) *(2S,4R)-2-*t*-butildimetilsililoximetil-4-hidroxi-pirrolidina (51)*



(i) *(2S,4R)-N-(benciloxycarbonil)-2-carboxi-4-hidroxi-pirrolidina (47)*

20 Se añadió una solución de cloroformato de bencilo (12,5 ml, 14,9 g, 87,5 mmol) en tolueno (40 ml) a una solución de *trans*-4-hidroxi-L-prolina **46** (10 g, 76,3 mmol) y $NaHCO_3$ (16 g, 190 mmol) en H_2O (165 ml) a lo largo de un periodo de 15 minutos. Después de agitar a temperatura ambiente durante 12 horas, se dejó que se separaran las fases. La fase acuosa se lavó con éter dietílico (4 x 50 ml), se enfrió en un baño de hielo y después se acidificó a pH 2 con HCl conc. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (5 x 50 ml) y se secaron los extractos orgánicos combinados ($MgSO_4$) y se evaporó el exceso de disolvente al vacío para dar un aceite viscoso incoloro **47** (20,30 g, 100%). $[\alpha]^{27}_D = -565^\circ$ ($c = 0,1$, MeOH);

(ii) *(2S,4R)-N-(benciloxycarbonil)-2-metoxicarbonil-4-hidroxi-pirrolidina (48)*

30 Se añadió una cantidad catalítica de H_2SO_4 concentrado (1,1 ml) a una solución de la *(2S,4R)*-*N*-(benciloxycarbonil)-2-carboxi-4-hidroxi-pirrolidina **47** (80 g, 302 mmol) en MeOH anhidro (462 ml) a 10 °C. La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 3 horas, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y después se trató con Et_3N (66 ml) y se agitó durante 1 hora. Después de retirar el exceso de MeOH mediante evaporación rotatoria a presión reducida, se disolvió el residuo en EtOAc (460 ml), se lavó con salmuera saturada y se secó ($MgSO_4$). La filtración y retirada del exceso de disolvente al vacío dio el éster **48** en forma de un aceite viscoso. Rendimiento de 84,4 g (100%). $[\alpha]^{20}_D = -59,4^\circ$ ($c = 0,014$, $CHCl_3$);

(iii) *(2S,4R)-N-(benciloxycarbonil)-2-hidroximetil-4-hidroxi-pirrolidina (49)*

40 Se añadió en porciones $LiBH_4$ sólido (9,89 g, 454 mmol) a una solución del éster **48** (84,4 g, 302 mmol) en THF anhidro (600 ml) a 0 °C. Después de agitar la muestra durante 30 min a 0°C, se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y después se agitó durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente. Durante este tiempo, se formó una suspensión espesa a pesar de la adición de THF adicional (150 ml); La TLC (EtOAc) en este punto reveló la desaparición completa del material de partida. La suspensión se enfrió a 0°C, se diluyó con agua (389 ml) y se trató gota a gota con HCl acuoso (2 M, 400 ml) provocando una eferescencia vigorosa. Se retiró el exceso de THF mediante evaporación rotatoria a presión reducida y el residuo acuoso se extrajo con EtOAc (4 x 250 ml). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera (300 ml) y se secó sobre $MgSO_4$. La filtración y extracción del disolvente dio el producto **49** en forma de un aceite incoloro. Rendimiento de 73,2 g (96%). $[\alpha]^{26}_D = -42,5^\circ$ ($c = 1$,

CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,45 - 7,29 (m, 5H), 5,26 - 5,01 (m, 2H), 4,72 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 4,50 - 4,30 (m, 1H), 4,27 - 4,03 (m, 1H), 3,84 - 3,68 (m, 1H), 3,60 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H), 3,47 (dd, *J* = 12,1, 3,8 Hz, 1H), 2,56 (s, 1H), 2,14 - 1,93 (m, 1H), 1,80 - 1,62 (m, 1H).

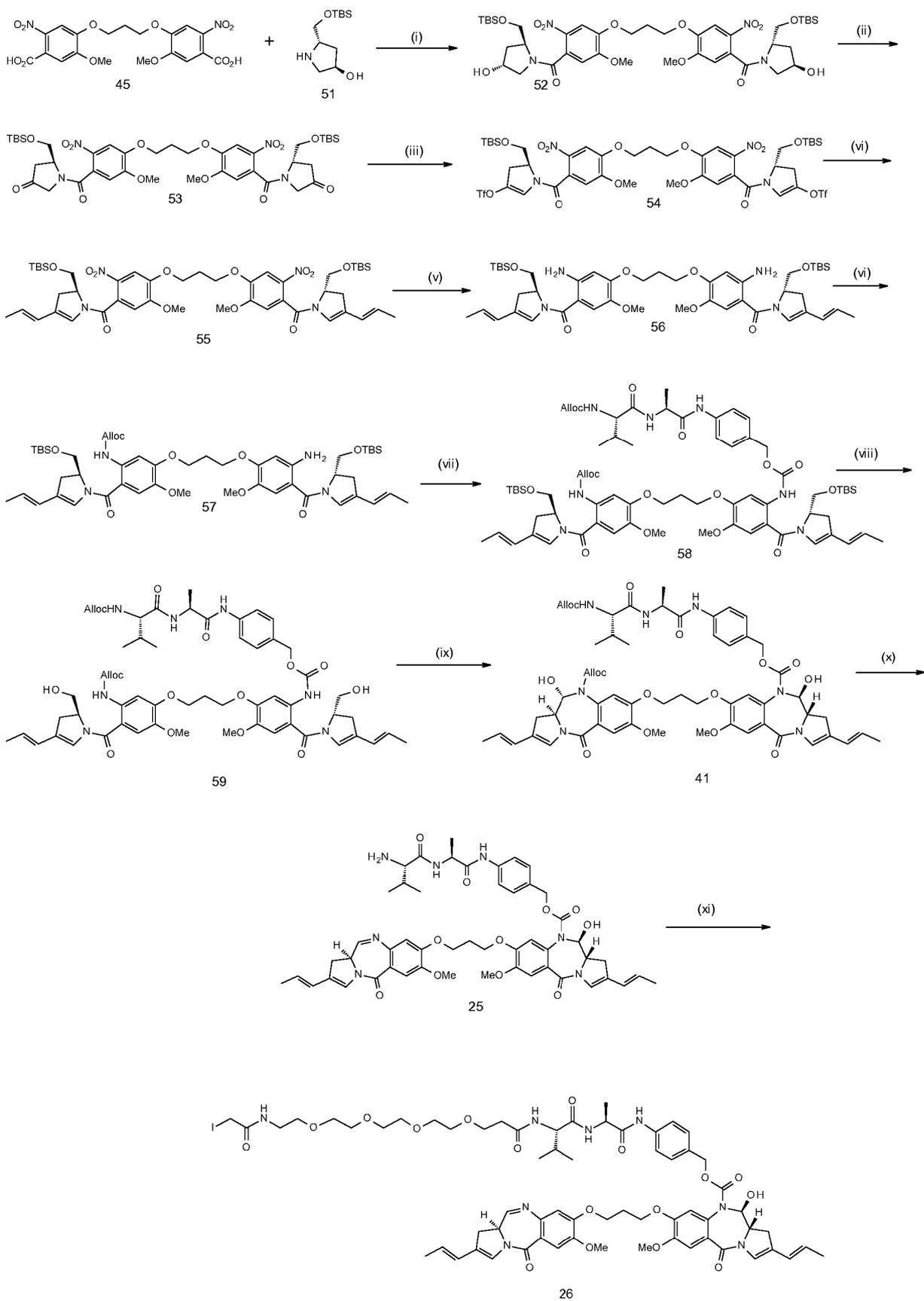
5 (iv) (2*S*,4*R*)-*N*-(benciloxycarbonil)-2-*t*-butildimetilsililoximetil-4-hidroxi-pirrolidina (**50**)

Se añadió cloruro de *t*-butildimetilsililo (35,9 g, 238 mmol) a una solución del diol **49** (77,8 g, 310 mmol), Et₃N (43,7 ml, 31,7 g, 313 mmol) y DBU (9,17 ml, 9,34 g, 61,3 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro recién destilado (650 ml). La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente en una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se lavó con NH₄Cl acuoso saturado (300 ml), salmuera (300 ml) y después se secó (MgSO₄). La filtración y retirada del exceso de disolvente proporcionó el producto en bruto, que se sometió a cromatografía en columna ultrarrápida en columna (80/20 v/v hexano/acetato de etilo para retirar el material *bis* protegido, seguido de 50/50 v/v hexano/acetato de etilo para eluir el producto deseado y después EtOAc puro para recuperar el material de partida) para aislar el éter de sililo **50**. Rendimiento: 67,9 g (78% basándose en cloruro de *t*-butildimetilsililo). [α]²⁵_D = -47,5° (*c* = 1, CHCl₃);

(v) (2*S*,4*R*)-2-*t*-butildimetilsililoximetil-4-hidroxi-pirrolidina (**51**)

Se hidrogenó una solución del éter de sililo **50** (100 g, 273 mmol) en isopropanol (4 x 200 ml) sobre Pd al 10%/C (5% p/p, 5 g) a presión (45 psi, 310 kPa) en un aparato Parr durante 30 minutos. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite para retirar el Pd/C y el lecho de filtro se enjuagó con isopropanol. El exceso de disolvente se retiró por evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo se volvió a disolver en acetato de etilo y el disolvente se retiró a presión reducida. Este ciclo con acetato de etilo se repitió una vez más, seguido de secado a alto vacío. El producto, **51**, cristalizó en forma de un sólido de color blanco, 57 g (90%). [α]²²_D = +35,6° (*c* = 0,042, CHCl₃).

(c) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-(((*S*)-7-metoxi-5-oxo-2-((*E*)-prop-1-en-1-il)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-2-((*E*)-prop-1-en-1-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (1*S*,11*aS*)-4-((2*S*,23*S*)-1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)bencilo. **26**



(i) (S,R)-(4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen))bis(((2S,4R)-2-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-hidroxi-pirrolidin-1-il)metanona) (**52**)

Se añadió DMF anhidra (aprox. 0,5 ml, ~0,13 equiv.) gota a gota a una suspensión en agitación de ácido 4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitrobenzoico) (**45**) (23,2g, 49,9 mmol) y cloruro de oxalilo (12,7 ml, 150 mmol, 3,0 equiv.) en DCM anhidro (310 ml) hasta que se produjo una efervescencia vigorosa. Se repitió la adición de la misma cantidad de DMF anhidra 2 horas después y se dejó la mezcla de reacción en agitación durante una noche. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y se trituró con éter dietílico. El precipitado de color amarillo resultante se filtró de la solución, se lavó con éter dietílico (100 ml) y se añadió inmediatamente a una solución de (3R,5S)-5-((terc-butildimetilsililoxi)metil)pirrolidin-3-ol **51** y trietilamina anhidra (26,5 g, 115 mmol, 2,3 equiv.) en DCM anhidro (200 ml) a -40°C. La suspensión espesa resultante se diluyó con DCM anhidro (140 ml) y se dejó calentar lentamente hasta temperatura ambiente (a lo largo de 90 minutos) tras lo cual, el análisis CLEM indicó que la reacción se había completado. Se añadió DCM (300 ml) y la mezcla se transfirió a un embudo de separación. La capa orgánica se lavó sucesivamente con HCl 0,1 M (2 x 240 ml), NaHCO₃ saturado (240 ml) y salmuera (120 ml). Tras secar sobre MgSO₄ y filtrar, la evaporación del disolvente dejó el producto, **52**, en forma de una espuma de color mostaza (42,6 g, 96%). δ_H (CDCl₃): 7,64 (2H, s), 6,73 (2H, s), 4,47-4,52 (2H, m), 4,39 (2H, s (a)), 4,31-4,34 (2H, t, J=5,6), 4,12 (2H, m), 3,93-3,95 (2H, t, J=3,8), 3,92 (6H, s), 3,73-3,75 (2H, m), 3,27-3,31 (2H, m), 2,96-3,00 (2H, m), 2,55-2,56 (2H, m), 2,39-2,43 (4H, m), 2,27-2,33 (2H, m), 2,04-2,10 (2H, m), 0,89 (18H, s), 0,09 (6H, s), 0,07 (6H, s). CL/EM, Sistema 1: 96% puro a los 1,96 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 893,35 ([M+H]⁺, 100).

(ii) (S,R)-(4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen))bis((S)-5-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-1-(4,5-dimethoxi-2-nitrobenzoil)pirrolidin-3-ona) (**53**)

Se añadió ácido tricloroisocianúrico (8,1 g, 0,035 mol, 2,2 equiv.) en una porción a una solución de diol **52** (14,2 g, 0,016 mol, 1,0 equiv.) y TEMPO (0,5 g, 0,035 mmol, 0,2 equiv.) en DCM anhidro (100 ml) en una atmósfera de nitrógeno a 0°C. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 20 minutos, tras lo cual, el análisis CLEM de la mezcla de reacción mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (100 ml) y la mezcla fría se vertió en bicarbonato de sodio saturado (200 ml). La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 minutos, después se transfirió a un embudo de separación. Se retiró la capa orgánica y se lavó con tiosulfato de sodio 0,2M (200 ml), salmuera (25 ml) y se secó (MgSO₄).

La evaporación del disolvente dio el producto en bruto **53** en forma de un sólido de color amarillo pálido (14,1 g, 100 %). El producto se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente. δ_H (CDCl₃): 7,76 (0,6H, s), 7,74 (2H, s), 7,74 (0,6H, s), 6,82 (0,6H, s), 6,74 (0,6H, s), 6,73 (2H, s), 4,95-4,98 (2H, d (a), J=8,9), 4,36 (1H, d, J=18,4) 4,27-4,35 (10H, m), 3,96 (1,8H, s), 3,94 (6H, s), 3,94 (1,8H, s), 3,62-3,66 (1H, d, J=18,9), 3,70-3,73 (3H, dd, J=10,3, 1,9), 3,62-3,66 (3H, d, J=17), 3,42-3,46 (3,6H, d, J=17), 2,75-2,82 (4H, dd, J=17,8, 9,8), 2,52-2,57 (3H, d, J=17,8), 2,43-2,47 (4,6H, m), 0,86 (18H, s), 0,85 (8H, s), 0,10 (6H, s), 0,07 (6H, s), 0,02 (2H, s), 0,00 (2H, s). CL/EM, Sistema 1: 100% puro a los 2,05 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 889,20 ([M+H]⁺, 100).

(iii) Bis(trifluorometanosulfonato) de (5S,5'S)-1,1'-(4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitrobenzoil))bis(5-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4,5-dihidro-1H-pirrol-3,1-diilo) (**54**)

Se añadió gota a gota anhídrido tríflico (22,84 g, 0,08 mol, 4,0 equiv.) a una solución vigorosamente agitada de la bis-cetona en bruto **53**¹ (18,0 g, 0,02 mol, 1 equiv.) en DCM anhidro (350 ml) que contenía 2,6-lutidina (13,0 g, 0,12 mol, 6,0 equiv.) a -50°C. La mezcla de reacción se agitó a -50°C durante 1,5 horas, tras lo cual, el análisis CLEM indicó que la reacción se había completado. La fase orgánica se lavó sucesivamente con ácido cítrico al 5% (300 ml), bicarbonato de sodio saturado (400 ml) y salmuera (50 ml), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó, dejando un aceite de color pardo, **54** (23,0 g, 99%) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. δ_H (CDCl₃): 7,76 (2H, s), 6,77 ("H, s), 6,08 (2H, m), 4,78 ("H, m), 4,34-4,37 (4H, t, J=5,8), 3,92-9,97 (4H, m), 3,95 (6H, s), 3,14-3,19 (2H, ddd, J=16,5, 10,5, 2,5), 2,96-3,02 (2H, ddd, J=16,2, 4,0, 1,5), 0,45-2,48 (2H, quin=5,8), 0,91 (18H, s), 0,11 (6H, s), 0,11 (6H, s).

(iv) (S,E)-(4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(5-metoxi-2-nitro-4,1-fenilen))bis(((S)-2-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-((E)-prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona) (**55**)

Se añadió Tetrakis(trifenilfosfina)paladio (2,3 g, 1,99 mmol, 0,1 equiv.) a una mezcla del bis-triflato en bruto **54** (23,0 g, 19,9 mmol), fosfato de potasio (16,9 g, 79,6 mmol, 4,0 equiv.) y ácido trans-1-propeno-1-ilborónico (4,28 g, 49,8 mmol, 2,5 equiv.) en dioxano seco (200 ml) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, tras lo cual, el análisis CLEM mostró la formación del producto deseado, junto con un producto monoacoplado de Suzuki. Se añadió un 10% de catalizador adicional y se agitó la mezcla de reacción durante una noche, tras lo cual, el análisis CLEM mostró que la reacción se había completado. Se añadió agua (100 ml) y el producto se extrajo con acetato de etilo (150 ml), se lavó con salmuera (50 ml) y se secó sobre MgSO₄. La evaporación del disolvente dejó un aceite de color pardo que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (1% v/v metanol/diclorometano) para dar el producto **55** en forma de un sólido de color naranja. (11,4 g, 54,3 % a lo largo de 3 etapas a partir de diol **52**) δ_H (CDCl₃): 7,75 (2H, s), 6,79 (2H, s), 5,94-5,98 (2H, d (a), J=15,6), 5,73 (2H, s (a)), 5,51-5,99 (2H, cd, J=15,6, 6,6), 4,69 (2H, m), 4,33-4,36 (4H, t, J=5,9), 3,76-4,15 (4H, m), 3,94 (6H, s), 2,86-2,92 (2H, m), 2,73-2,76 (2H, d (a), J=16,0), 2,43-2,49 (2H, quin., J=5,9), 1,74-1,76 (6H, dd, J=6,6, 0,7), 0,89 (18H, s), 0,11

(6H, s), 0,10 (6H, s). CL/EM, Sistema 1: 100% puro a los 2,36 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1896,85 ([2M+Na]⁺, 100).

5 (v) (S,E)-(4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2-amino-5-metoxi-4,1-fenilen))bis(((S)-2-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-((E)-prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-il)metanona) (**56**)

10 Se añadió polvo de cinc (39,9 g, 610 mmol, 36,0 equiv.) en una porción a una solución del compuesto de bis-nitro **55** (15,9 g, 17,0 mmol, 1,0 equiv.) en ácido fórmico al 5%/metanol (350 ml) manteniendo la temperatura entre 25-30°C con la ayuda de un baño de agua fría. La reacción se agitó a 30°C durante 20 minutos, tras lo cual, la CLEM mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró a través de un lecho corto de celite para retirar el exceso de cinc, que se lavó con acetato de etilo (750 ml). Las fracciones orgánicas se lavaron con agua (750 ml), bicarbonato de sodio saturado (750 ml) y salmuera (50 ml), se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron para dejar un aceite de color pardo. El producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH 96%) para dar la bis-anilina **56** en forma de un sólido de color amarillo pálido (9,46 g, 63,9 %). δ_H (DMSO-*d*₆): 6,64 (2H, s), 6,46 (2H, s (a)), 6,43 (2H, s), 6,17-6,21 (2H, d (a), J=15), 5,39-5,48 (2H, cd, J=15, 6,5), 5,14 (4H, s), 4,50-4,52 (2H, m), 4,05-4,08 (4H, t, J=6,0), 3,67-3,83 (4H, m), 3,62 (6H, s), 2,77-2,83 (2H, dd, J=15,5, 10), 2,54-2,59 (2H, dd, J=15,5, 3,5), 2,17-2,24 (2H, quin., J=6,0), 1,71-1,73 (6H, d, J=6,6), 0,83 (18H, s), 0,01 (6H, s), 0,00 (6H, s). CL/EM, Sistema 1: 100% puro a los 2,34 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 877,20 ([M+H]⁺, 100).

20 (vi) 5-(3-(5-amino-4-((S)-2-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-((E)-prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-2-metoxifenoxi)propoxi)-2-((S)-2-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-((E)-prop-1-enil)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxifenilcarbamato de alilo (**57**)

25 Se añadió piridina (1,53 ml, 18,89 mmol, 1,0 equiv.) a una solución de la bis-anilina **56** (16,57 g, 18,89 mmol, 1,0 equiv.) en DCM anhidro (240 ml) a -78°C en una atmósfera de nitrógeno. Después de 5 minutos, se añadió cloroformato de alilo (1,50 ml, 14,17 mmol, 0,75 equiv.) en DCM anhidro (10 ml) y se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, la capa orgánica se lavó sucesivamente con ácido cítrico al 5% (50 ml), bicarbonato de sodio saturado (50 ml) y salmuera (10 ml), se secó sobre MgSO₄ y se evaporó para dar una espuma de color amarillo. El producto se purificó por cromatografía ultrarrápida (sistema de purificación Biotage SP4, cartucho Biotage Snap HP-Sil 100 g, gradiente de elución Hexane:EtOAc 70% - 0%) para dar 3 fracciones:

Fracción uno (producto protegido con bis-alloc) en forma de un sólido de color blanquecino (3,6 g)

Fracción dos (producto deseado, **57**) en forma de un sólido de color amarillo (7,1 g, 52,2 %)

35 Fracción tres (material de partida sin reaccionar) en forma de un sólido de color naranja (5,5 g) δ_H (DMSO-*d*₆): 9,09 (1H, s (a)), 7,23 (1H, s (a)), 6,82 (1H, s (a)), 6,47 (1H, s (a)), 6,43 (1H, s), 6,10-6,28 (3H, m), 5,86-5,93 (1H, m), 5,40-5,48 (3H, m), 5,27-5,31 (1H, dd, J=17,2, 1,2), 5,15-5,19 (3H, m), 4,52 (4H, m), 4,12-4,15 (2H, t, J=6,0), 4,06-4,09 (2H, t, J=6,0), 3,66-3,87 (4H, m), 3,74 (3H, s), 3,62 (3H, s), 2,76-2,83 (2H, m), 2,54-2,58 (2H, d (a), J=16,0), 2,19-2,25 (2H, quin., J=6,0), 1,71-1,73 (6H, d, J=6,2), 0,85 (9H, s), 0,83 (9H, s), 0,05 (3H, s), 0,03 (3H, s), 0,01 (3H, s), 0,00 (3H, s). CL/EM, Sistema 1: 100% puro a los 2,41 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 961,40 ([M+H]⁺, 100).

El compuesto protegido con bis-alloc y el material de partida sin reaccionar se reciclaron usando el siguiente procedimiento:

45 Se añadió Tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0,350 g, 0,30 mmol, 0,06 equiv.) a una solución de la anilina protegida con bis-alloc (5,27 g, 5,04 mmol, 1 equiv.) y pirrolidina (1,04 ml, 12,6 mmol, 2,5 equiv.) en DCM anhidro (50 ml) en atmósfera de nitrógeno y la mezcla se agitó durante 1 hora, tras lo cual, el análisis CLEM mostró que la reacción se había completado. La mezcla se diluyó con DCM y se transfirió a un embudo de separación. El producto se lavó con NH₄Cl saturado (100 ml), NaHCO₃ saturado (100 ml) y salmuera (60 ml). Después de secarse sobre MgSO₄, la evaporación del disolvente dio el producto en forma de un sólido de color naranja (4,5 g). Se combinó un producto de una reacción separada (1 g) y la mezcla en bruto se absorbió sobre sílice, después se purificó por cromatografía ultrarrápida (sistema de purificación Biotage SP4, cartucho Biotage Snap HP-Sil 100g, gradiente de elución hexano:EtOAc 70%-0%) para dar la bis-anilina **56** en forma de un sólido de color naranja (3,1 g), que después se combinó con **56** recuperado sin reaccionar en la protección con mono-alloc (usando 0,7 equiv. de cloroformato de alilo).

60 (vii) 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil((S,E)-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2-((S)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5,1-fenilen))dicarbamato de alilo (**58**)

65 Se añadió trietilamina (2,26 ml, 16,2 mmol, 2,2 equiv.) a una solución en agitación de la anilina **57** (7,1 g, 7,38 mmol, 1,0 equiv.) y trifosgeno (0,79 g, 2,65 mmol, 0,36 equiv.) en THF anhidro (70 ml) en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El análisis CLEM de una alícuota inactivada con metanol, mostró la formación del isocianato. Se añadió una solución de Alloc-Val-Ala-PAB-OH (4,18 g, 11,08 mmol, 1,5 equiv.) y trietilamina (1,54 ml, 11,08 mmol, 1,5 equiv.) en THF seco (150 ml) en una porción usando un embudo de adición y la mezcla resultante se agitó durante una noche a 40°C. La

evaporación de la mezcla de reacción dejó un aceite de color pardo que se purificó por cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH 97,5%) para dar el producto, **58**, en forma de un sólido de color amarillo pálido (6,7 g, 67,0 %). Se aislaron 1,2 g (12 %) adicionales de las fracciones mezcladas. δ_H (DMSO- d_6): 9,99 (1H, s (a)), 9,10 (2H, s (a)), 8,14-8,16 (1H, d, J=6,0), 7,56-7,58 (2H, d, J=8,5), 7,27-7,29 (2H, d, J=8,4), 7,22-7,24 (2H, d, J=8,8), 6,81 (2H, s (a)), 6,28 (2H, s (a)), 6,09-6,14 (2H, d (a), J=16,0), 5,86-5,94 (2H, m), 5,41-5,50 (2H, m), 5,27-5,32 (2H, ddd, J=17,0, 3,6, 1,6), 5,15-5,19 (2H, ddd, J=10,4, 3,1, 1,5), 4,96-5,04 (2H, m), 4,40-4,52 (7H, m), 4,12-4,15 (4H, m), 3,83-3,91 (3H, m), 3,74 (6H, s), 3,64-3,72 (2H, m), 2,73-2,79 (2H, m), 2,51-2,58 (2H, m), 2,19-2,25 (2H, m), 1,93-2,01 (1H, m), 1,71-1,73 (6H, d, J=6,0), 1,29-1,30 (3H, d, J=7,0), 0,82-0,89 (24H, m), -0,02-0,04 (12H, m). CL/EM, Sistema 1: 100% puro a los 2,38 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1387,15 ($[M+Na]^+$, 100).

(viii) 4-((S)-2-((S)-2-(((aliloxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)encil((S,E)-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2-((S)-2-(hidroximetil)-4-((E)-prop-1-en-1-il)-2,3-dihidro-1H-pirrol-1-carbonil)-4-metoxi-5,1-fenilen))dicarbamato de alilo (**59**)

(a) Método 1: Se añadió agua (12 ml) a una solución de éter de TBS **58** (1,73 g, 1,27 mmol) en AcOH (42 ml): MeOH (6 ml): THF (6 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. La reacción se monitorizó mediante CLEM, que mostró la formación del producto deseado, junto con pequeñas cantidades del material de partida sin reaccionar y productos mono-desprotegidos tras 1 hora. Se añadieron 10 ml de AcOH:MeOH:THF:H₂O (7:1:1:2) y la mezcla se agitó durante una hora más. El análisis CLEM mostró que la reacción estaba prácticamente completa, observándose solo pequeñas cantidades de productos mono-desprotegidos. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, se transfirió a un embudo de separación, se lavó con agua, y después con NaHCO₃ saturado hasta alcanzar un pH básico. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró al vacío. El producto en bruto se absorbió sobre sílice y se purificó por cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución de CHCl₃:MeOH 100%-95%) para dar el producto, **59**, en forma de un sólido de color crema (1,02 g, 71%).

(b) Método 2: Se añadió fluoruro de tetra-n-butilamonio (1M, 9,19 ml, 9,19 mmol, 2,0 equiv.) a una solución del compuesto protegido con TBS **58** (6,25 g, 4,59 mmol, 1,0 equiv.) en THF anhidro (75 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras lo cual la CLEM indicó la formación del producto, junto con pequeñas cantidades de compuestos monodesprotegidos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (500 ml) y se lavó secuencialmente con agua (250 ml) y salmuera (50 ml). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se evaporó, dejando un sólido de color amarillo. La purificación por cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH 94%) proporcionó el bis-alcohol **59** en forma de un sólido de color crema pálido (3,43 g, 66,0 %). δ_H (DMSO- d_6): 9,99 (1H, s (a)), 9,08 (1H, s (a)), 9,05 (1H, s (a)), 8,14-8,16 (1H, d, J=6,8), 7,56-7,58 (2H, d, J=8,5), 7,28-7,30 (2H, d, J=8,5), 7,23-7,25 (2H, d, J=8,7), 7,19-7,24 (1H, m), 6,88 (2H, s (a)), 6,22 (2H, s (a)), 6,08-6,12 (2H, d, J=16,3), 5,86-5,94 (2H, m), 5,41-5,48 (2H, m), 5,26-5,32 (2H, m), 5,16-5,48 (2H, m), 5,00 (2H, s (a)), 4,84-4,88 (2H, m), 4,40-4,52 (7H, m), 4,11-4,15 (4H, m), 3,87-3,90 (1H, dd, J=8,9, 7,2), 3,75 (6H, s), 3,63-3,69 (2H, m), 3,48-3,54 (2H, m), 2,71-2,79 (2H, m), 2,55-2,61 (2H, m), 2,20-2,25 (2H, m), 1,93-2,01 (1H, m), 1,71-1,73 (6H, d, J=6,0), 1,29-1,31 (3H, d, J=7,1), 0,87-0,89 (3H, d, J=6,8), 0,82-0,84 (3H, d, J=6,7). CL/EM, Sistema 1: 100% puro a los 1,74 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1136,25 ($[M+H]^+$, 100).

(ix) 8-(3-((11S,11aS)-10-((4-((S)-2-((S)-2-(aliloxicarbonilamino)-3-metilbutanamido)propanamido)enciloxi)carbonil)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-5,10,11,11a-tetrahydro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-iloxi)propoxi)-11-hidroxi-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-enil)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-alilo (**41**)

Se añadió gota a gota una solución de cloruro de oxalilo (357 mg, 2,82 mmol, 3,2 equiv.) en THF anhidro¹ (~700 μ l) a una solución premezclada de DMSO anhidro (400 μ l, 5,63 mmol, 6,4 equiv.) en THF (12 ml) a -78°C en atmósfera de nitrógeno y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Se añadió gota a gota una solución del diol **59** (1 g, 0,880 mmol) en THF (20 ml) a lo largo de 10 minutos y la mezcla se agitó durante 20 minutos más, antes de la adición de trietilamina (1,23 ml, 8,80 mmol, 10 equiv.). Después, se dejó calentar la mezcla a temperatura ambiente y se monitorizó el progreso de la reacción mediante CLEM, que mostró que la reacción se había completado tras 85 minutos. La mezcla se diluyó con EtOAc y se transfirió a un embudo de separación. El producto se lavó con HCl 1N y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaHCO₃ saturado, salmuera y se secaron sobre MgSO₄. El producto en bruto se disolvió en DCM:MeOH, se absorbió sobre sílice y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM:MeOH 98%-97,5%-97%)³ para dar el producto ciclado **41** en forma de un sólido incoloro (561 mg, 56%). δ_H (CDCl₃): 8,67 (1H, s (a)), 7,42 (1H, s (a)), 7,40 (1H, s (a)), 7,19-7,22 (2H, d, J=10,2), 7,10-7,16 (2H, m), 6,87-6,90 (2H, m), 6,83 (1H, m), 6,76 (1H, s (a)), 6,54 (1H, s (a)), 6,25-6,27 (1H, d, J=6,5), 6,21-6,23 (1H, d, J=7,0), 5,84-5,94 (1H, m), 5,71-5,80 (3H, m), 5,44-5,59 (3H, m), 5,27-5,33 (2H, d, J=17,7), 5,19-5,29 (1H, d, J=10,4), 4,99-5,09 (2H, m), 4,68-4,76 (2H, m), 4,52-4,61 (4H, m), 4,39-4,45 (1H, m), 4,10-4,16 (2H, m), 4,00-4,04 (2H, m), 3,95-3,96 (1H, m), 3,86-3,89 (3H, m), 3,86 (3H, s), 3,84 (3H, s), 3,04-3,12 (2H, m), 2,75-2,82 (2H, m), 2,10-2,28 (3H, m), 1,81-1,82 (6H, d, J=7,1), 1,39-1,45 (3H, m), 0,94-0,96 (3H, d, J=6,8), 0,91-0,93 (3H, d, J=7,0). CL/EM, Sistema 1: 100% puro a los 1,72 min (ES+) m/z (intensidad relativa) 1132,25 ($[M+H]^+$, 100). H RMS: C₅₉H₆₉N₃O₁₆⁺ requiere 1132,4834, hallada 1132,2799 (MH⁺), 1149,3333 (M+NH₄⁺)

(x) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-

10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-(2-(1-((1-amino-3-metil-1-oxobutan-2-il)amino)-1-oxopropan-2-il)hidrazinil)bencilo (**25**)

5 Se añadió tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (14 mg, 0,01 mmol, 0,06 equiv.) a una solución de **41** (0,208 mmol) y pirrolidina (43 µl, 0,52 mmol, 2,5 equiv.) en cloroformo (5 ml). La mezcla de reacción se agitó 20 minutos y se diluyó con cloroformo y se lavó secuencialmente con cloruro de amonio acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y el exceso de cloroformo se retiró mediante evaporación rotatoria a presión reducida. El residuo resultante **25** se usó como una mezcla en bruto para la reacción siguiente. δ_H (DMSO- d_6): 10,26 (1H, s), 7,97 (1H, d, J=5,9), 7,59 (2H, d, J=8,4), 7,22 (3H, m), 7,08 (1H, s), 7,04 (1H, s), 7,00 (1H, m), 6,90 (2H, s), 10 6,77 (2H, m), 6,55 (1H, s), 6,30 (3H, m), 5,75 (2H, s), 5,55 (3H, m), 5,42 (1H, m), 5,23 (1H, d, J=12,4), 4,76 (1H, d, J=12,1), 4,33 (1H, m), 4,22 (2H, m), 4,10 (3H, m), 4,00 (3H, m), 3,80 (5H, m), 3,70 (3H, s), 3,17 (1H, d, J=5,1), 3,03 (3H, m), 2,87 (4H, m), 2,61 (3H, m), 2,26 (4H, m), 1,77 (10H, m), 1,19 (3H, d, J=7,0), 0,89 (3H, m), 0,79 (6H, t, J=6,4). LCMS, Sistema 2: 1,23 min.; m/z (ES⁺): 946,35 (M+H⁺)

15 (xi) 11-hidroxi-7-metoxi-8-(3-(((S)-7-metoxi-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-5,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-8-il)oxi)propoxi)-5-oxo-2-((E)-prop-1-en-1-il)-11,11a-dihidro-1H-benzo[e]pirrolo[1,2-a][1,4]diazepin-10(5H)-carboxilato de (11S,11aS)-4-((20S,23S)-1-yodo-20-isopropil-23-metil-2,18,21-trioxo-6,9,12,15-tetraoxa-3,19,22-triazatetracosanamido)bencilo, (**26**)

20 Se añadió *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC, 32 µl, 0,208 mmol) a una solución de **25** en bruto (0,208 mmol) y yodoacetamida(PEG)₄ ácido (90 mg, 0,208 mmol) en cloroformo (8 ml). La reacción se agitó durante 3 horas y se siguió observando presencia del material de partida mediante CL/EM. Se añadieron *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (0,104 mmol) y yodoacetamida(PEG)₄ ácido (0,104 mmol) adicionales a la mezcla de reacción y se dejó reaccionar durante una noche a 4°C. La mezcla de reacción se cargó directamente sobre sílice y se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna (gel de sílice; 100% diclorometano a 5% metanol en diclorometano). Las fracciones puras se recogieron y combinaron y se retiró el exceso de eluyente mediante evaporación rotatoria a presión reducida, para dar **26** (149 mg, 53% a lo largo de 2 etapas). δ_H (DMSO- d_6): 9,92 (1H, s), 8,17 (1H, d, J=6,5), 7,97 (1H, d, J=3,9), 7,86 (1H, d, J=8,6), 7,54 (2H, m), 7,33 (1H, s), 7,17 (2H, m), 7,07 (1H, m), 6,88 (2H, s a), 6,78 (2H, m), 6,30 (2H, m), 5,56 (3H, m), 5,11 (1H, m), 4,86 (1H, m), 4,38 (2H, m), 4,20 (2H, m), 4,10 (2H, m), 4,06 (1H, s), 4,00 (1H, m), 3,80 30 (4H, m), 3,74 (2H, m), 3,64 (2H, s), 3,59 (2H, t, J=6,4), 3,49 (9H, m), 3,40 (4H, m), 3,25 (2H, m), 3,20 (2H, m), 3,00 (2H, m), 2,63 (2H, m), 2,40 (3H, m), 2,19 (3H, m), 1,95 (1H, m), 1,78 (5H, m), 1,28 (4H, m), 0,84 (6H, dd, J=15,9, 6,7). LCMS, Sistema 2: 1,54 min.; m/z (ES⁺): 1361,40 (M+H⁺); Sistema 3: 6,14 min; m/z (ES⁺): 1361,40 (M+H⁺).

35 Ejemplo 4 Formación de conjugados

Procedimiento general de conjugación de anticuerpos

40 Se diluyen anticuerpos a 1-5 mg/ml en un tampón de reducción (ejemplos: solución salina tamponada con fosfato PBS, tampón histidina, tampón borato de sodio, tampón Tris). Se añade una solución recientemente preparada de TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina) para reducir selectivamente los puentes de disulfuro de cisteína. La cantidad de TCEP es proporcional al nivel objetivo de reducción, dentro de 1 a 4 equivalentes molares por anticuerpo, que generan 2 a 8 tioles reactivos. Después de la reducción durante varias horas a 37 °C, la mezcla se enfría hasta temperatura ambiente y el exceso de fármaco-conector (**A**) se añade como una solución de DMSO diluida (contenido de DMSO final de hasta el 10 % en volumen/volumen de mezcla de reacción). La mezcla se agita suavemente a tanto 4 °C como a temperatura ambiente durante el tiempo apropiado, generalmente 10-30 horas para el compuesto **B**. El exceso de tioles reactivos puede hacerse reaccionar con un 'reactivo de encapuchado de tiol' como *N*-etilmaleimida (NEM) al final de la conjugación. Los conjugados de anticuerpo-fármaco se concentran usando filtros de concentración centrífuga con un corte de peso molecular de 10 kDa o superior, a continuación se purifican por filtración de flujo tangencial (TFF) o cromatografía de líquidos rápida de proteínas (FPLC). Los de 50 conjugados de anticuerpo-fármaco correspondientes pueden determinarse por análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o cromatografía de líquidos de resolución ultra-alta (UHPLC) para evaluar la relación de fármaco por anticuerpo (DAR) usando cromatografía de fase inversa (RP) o cromatografía de interacción hidrofoba (HIC), acoplada a detección UV-visible, de fluorescencia o por espectrómetro de masas; el nivel de agregados y la pureza de los monómeros puede analizarse por HPLC o UHPLC usando cromatografía de exclusión por tamaño 55 acoplada a detección UV-visible, de fluorescencia o por espectrómetro de masas. La concentración de conjugado final se determina por una combinación de ensayo espectroscópico (absorbancia a 280, 214 y 330 nm) y bioquímico (ensayo con ácido bicinonínico BCA; Smith, P.K. y col. (1985) Anal. Biochem. 150 (1): 76-85; usando un anticuerpo IgG de concentración conocida como referencia). Los conjugados de anticuerpo-fármaco se esterilizan generalmente por filtración usando filtros de 0,2 µm bajo condiciones asépticas, y se guardan a +4 °C, -20 °C o -80 °C. 60

Ejemplos de conjugaciones particulares se describen a continuación.

ADC1A

65 Se diluye anticuerpo 1 (15 mg, 102 nanomoles) en 12,0 ml de un tampón de reducción que contiene borato de sodio

10 mM a pH 8,4, EDTA 2,5 mM y una concentración final de anticuerpo de 1,25 mg/ml. Se añade una solución 10 mM de TCEP (2 equivalentes molares/anticuerpo, 204 nanomoles, 20 μ l) y la mezcla de reducción se calienta a 37 °C durante dos horas en una estufa de incubación orbital. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente, se añade el compuesto **A** como una solución de DMSO (5 equivalentes molares/anticuerpo, 510 nanomoles, en 1,2 μ l de DMSO). La solución se mezcla 18 horas a temperatura ambiente, a continuación se transfiere a un filtro de centrífuga de 50 kDa de MWCO Amicon Ultracell de 15 ml, se concentra a aprox. 2,0 ml y se inyecta en una FPLC AKTA™ usando una columna XK16/70 de GE Healthcare rellena con Superdex 200 PG, eluyendo con 1,5 ml/min de solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración. Las fracciones correspondientes al pico de monómero de **ADC deseado** se reúnen, se analizan y se esterilizan por filtración. El ensayo de BCA da una concentración de **ADC1A** final a 0,67 mg/ml en 12,5 ml, y la masa obtenida es 8,4 mg (56 % de rendimiento). El análisis de HPLC en un sistema Waters Alliance usando una columna Agilent PLRP-S 1000 A 8 μ m 150 x 2,1 mm que eluye con un gradiente de agua y acetonitrilo sobre una muestra reducida de **ADC1A** a 280 nm muestra una mezcla de cadenas ligeras y pesadas unidas a varias moléculas de **A**, de acuerdo con una relación de fármaco por anticuerpo (DAR) de 2,2 moléculas de **A** por anticuerpo. El análisis de SEC sobre una FPLC AKTA™ usando una columna XK16/70 de GE Healthcare rellena con Superdex 200 PG, eluyendo con solución salina tamponada con fosfato (PBS) esterilizada por filtración sobre una muestra de **ADC1A** a 280 nm muestra una pureza de monómeros del 95,3 % con 4,7 % de agregados.

Como se usa en el presente documento, "Anticuerpo 1" es un anticuerpo anti-Her2 que comprende un dominio VH que tiene la secuencia según SEQ ID N°. 1 y un dominio VL que tiene la secuencia según SEQ ID N°. 2.

Ejemplo 5: Estudios de eficacia de ADC *in vivo*

Ratones CB.17 SCID, de edades 8-12 semanas, se inyectan subcutáneamente con fragmentos de tumor de 1 mm³ derivados de la línea celular BT-474 en el flanco. Cuando los tumores alcanzan un tamaño promedio de 100 - 150 mm³, se empieza el tratamiento. Los ratones se pesan dos veces a la semana. El tamaño tumoral se mide dos veces a la semana. Los animales se monitorizan individualmente. El punto final del experimento es un volumen tumoral de 1000 mm³ o 60 días, sea cual sea el que aparezca primero. Los que responden pueden ser seguidos más tiempo.

Grupos de 10 ratones xenoinjertados se inyectan i.v. con 0,2 ml de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), o anticuerpo desnudo, en solución salina tamponada con fosfato (vehículo) o con 0,2 ml de vehículo solo. La concentración de ADC se ajusta para dar, por ejemplo, 0,3 o 1,0 mg de ADC/kg de peso corporal en una dosis única. Pueden administrarse tres dosis idénticas a cada ratón a intervalos de, por ejemplo, 1 semana.

La Figura 1 muestra el efecto sobre el volumen tumoral medio en grupos de 10 ratones dosificados con **ADC1A** a 0,3 (verde) o 1,0 mg/kg (rojo) en comparación con controles de vehículo (negro) o Ig desnuda (azul).

Abreviaturas

Ac	acetilo
Acm	acetamidometilo
Alloc	aliloxicarbonilo
Boc	dicarbonato de di- <i>terc</i> -butilo
t-Bu	terc-butilo
Bzl	bencilo, en el que Bzl-OMe es metoxibencilo y Bzl-Me es metilbenceno
Cbz o Z	benciloxi-carbonilo, en el que Z-Cl y Z-Br son cloro- y bromobenciloxicarbonilo, respectivamente
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
Dnp	dinitrofenilo
DTT	ditiotreitolo
Fmoc	9 <i>H</i> -fluoren-9-ilmetoxicarbonilo
imp	grupo protector de imina <i>N</i> -10: 3-(2-metoxietoxi)propanoato-Val-Ala-PAB
MC-OSu	maleimidocaproil-O- <i>N</i> -succinimida
Moc	metoxicarbonilo
MP	maleimidopropanamida
Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo
PAB	para-aminobenciloxicarbonilo
PEG	etilenoxi
PNZ	carbamato de <i>p</i> -nitrobencilo
Psec	2-(fenilsulfonil)etoxicarbonilo
TBDMS	terc-butildimetilsililo
TBDPS	terc-butildifenilsililo
Teoc	2-(trimetilsilil)etoxicarbonilo
Tos	tosilo
Troc	cloruro de 2,2,2-tricloroetoxicarbonilo
Trt	tritilo
Xan	xantilo

SECUENCIAS

SEQ ID N°. 1 (VH de Her):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVS
S

5

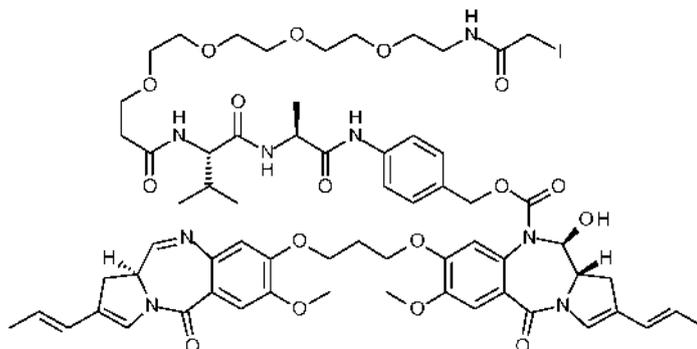
SEQ ID N°. 2 (VL de Her):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR
FSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es A:



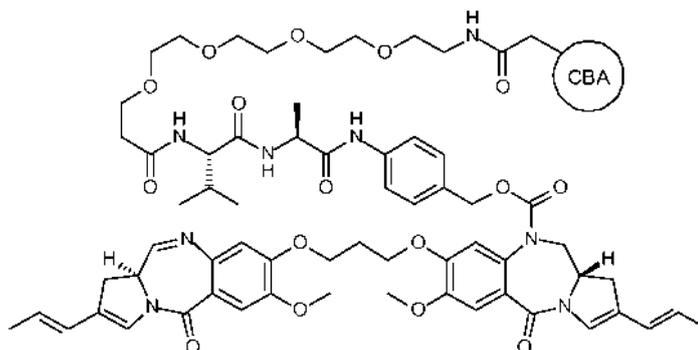
A

5

y sales y solvatos del mismo.

2. Un conjugado de fórmula ConjA:

10



ConjA

en el que CBA representa un agente de unión a célula.

15

3. El conjugado según la reivindicación 2, en el que el agente de unión a célula es un anticuerpo o un fragmento activo del mismo.

4. El conjugado según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo son un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo para un antígeno asociado a tumor.

20

5. El conjugado de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo son un anticuerpo que se une a uno o más antígenos asociados a tumor o receptores de la superficie celular seleccionados de (1)-(88):

25

- (1) BMPR1B;
- (2) E16;
- (3) STEAP1;
- (4) 0772P;
- (5) MPF;
- (6) Napi3b;
- (7) Sema 5b;
- (8) PSCA hlg;
- (9) ETBR;
- (10) MSG783;
- (11) STEAP2;
- (12) TrpM4;
- (13) CRIPTO;
- (14) CD21;
- (15) CD79b;
- (16) FcRH2;

30

35

- (17)** HER2;
(18) NCA;
(19) MDP;
(20) IL20R-alfa;
 5 **(21)** Brevicano;
(22) EphB2R;
(23) ASLG659;
(24) PSCA;
(25) GEDA;
 10 **(26)** BAFF-R;
(27) CD22;
(28) CD79a;
(29) CXCR5;
(30) HLA-DOB;
 15 **(31)** P2X5;
(32) CD72;
(33) LY64;
(34) FcRH1;
(35) IRTA2;
 20 **(36)** TENB2;
(37) PSMA - FOLH1;
(38) SST;

 25 (38.1) SSTR2;
 (38.2) SSTR5;
 (38.3) SSTR1;
 (38.4) SSTR3;
 (38.5) SSTR4;

 30 **(39)** ITGAV;
(40) ITGB6;
(41) CEACAM5;
(42) MET;
(43) MUC1;
 35 **(44)** CA9;
(45) EGFRvIII;
(46) CD33;
(47) CD 19;
(48) IL2RA;
 40 **(49)** AXL;
(50) CD30 - TNFRSF8;
(51) BCMA - TNFRSF17;
(52) Ag de CT - CTA;
(53) CD174 (Lewis Y) - FUT3;
 45 **(54)** CLEC14A;
(55) GRP78 - HSPA5;
(56) CD70;
(57) Antígenos específicos de células madre;
(58) ASG-5;
 50 **(59)** ENPP3;
(60) PRR4;
(61) GCC - GUCY2C;
(62) Liv-1 - SLC39A6;
(63) 5T4;
 55 **(64)** CD56 - NCMA1;
(65) CanAg;
(66) FOLR1;
(67) GPNMB;
(68) TIM-1 - HAVCR1;
 60 **(69)** RG-1/Mindina diana de tumor de la próstata - Mindina/RG-1;
(70) B7-H4 - VTCN1;
(71) PTK7;
(72) CD37;
(73) CD138 - SDC1;
 65 **(74)** CD74;
(75) Claudinas - CL;

- (76) EGFR;
(77) Her3;
(78) RON - MST1 R;
(79) EPHA2;
5 (80) CD20 - MS4A1;
(81) Tenascina C - TNC;
(82) FAP;
(83) DKK-1;
10 (84) CD52;
(85) CS1 - SLAMF7;
(86) Endoglina- ENG;
(87) Anexina A1 - ANXA1;
(88) V-CAM (CD106) - VCAM1.
- 15 6. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo manipulado por cisteína.
7. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que la carga de fármaco (p) de fármacos (D) con respecto a anticuerpo (Ab) es un número entero de 1 a aproximadamente 8.
- 20 8. El conjugado según la reivindicación 7, en el que p es 1, 2, 3 o 4.
9. Una composición que comprende una mezcla de compuestos de conjugados de fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde la carga de fármaco promedio por anticuerpo en la mezcla de compuestos de conjugados de anticuerpo-fármaco es aproximadamente 1 a aproximadamente 8.
- 25 10. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 o la composición según la reivindicación 9, para su uso en terapia.
- 30 11. El conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 o la composición según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa en un sujeto.
12. El conjugado según la reivindicación 11, en donde la enfermedad es cáncer.
- 35 13. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 o la composición según la reivindicación 9 y un diluyente, un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13 que comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente quimioterapéutico.
- 40 15. Un procedimiento de preparación de un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un agente de unión a célula con el compuesto B como se define en la reivindicación 1.

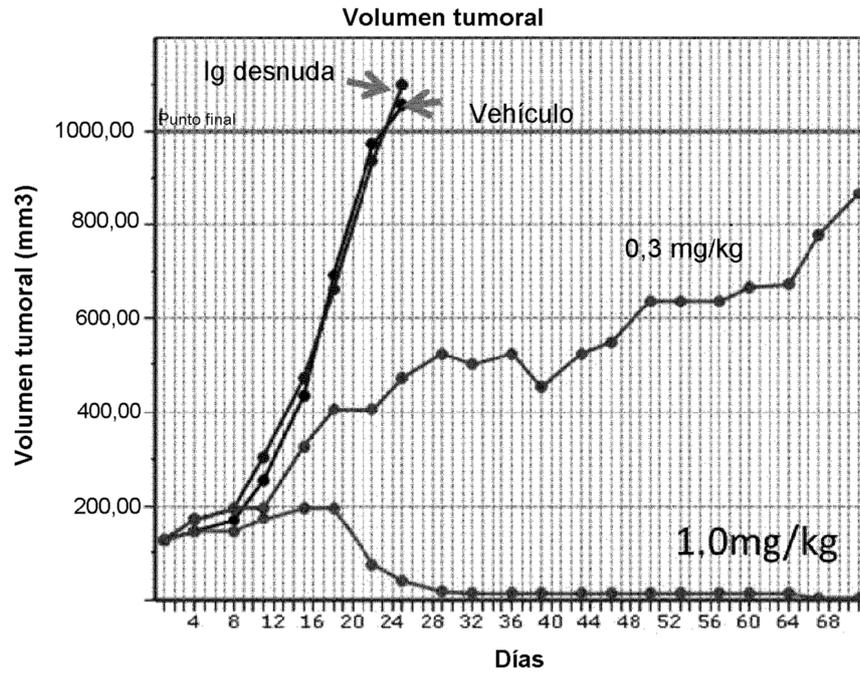


Figura 1