

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 226**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395	(2006.01)	A61K 47/55	(2007.01)
A61K 48/00	(2006.01)		
A61K 31/70	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
C07K 16/28	(2006.01)		
C07K 16/32	(2006.01)		
C12Q 1/48	(2006.01)		
A61K 47/65	(2007.01)		
A61K 47/68	(2007.01)		
A61K 47/54	(2007.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2012 PCT/IB2012/001065**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12153193**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 12782658 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2707031**

54 Título: **Conjugados de proteína-agente activo y método para preparar los mismos**

30 Prioridad:

08.05.2011 US 201161483698 P

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

24.02.2020

73 Titular/es:

**LEGOCHEM BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
8-26, Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon 34302, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, YONGZU;
PARK, TAEKYO;
WOO, SUNGHO;
LEE, HYANGSOOK;
KIM, YOUNGUN;
CHO, JONGUN;
JUNG, DOOHWAN;
KIM, SUNYOUNG;
KWON, HYUNJIN;
OH, KYUMAN;
CHUNG, YUNSEO y
PARK, YUN-HEE**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 744 226 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de proteína-agente activo y método para preparar los mismos

5 **Antecedentes****(a) Campo técnico**

10 La invención se define mediante las reivindicaciones y cualquier otro aspecto o realización expuestos en el presente documento que no se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para información. La presente divulgación se refiere a un conjugado de proteína-agente activo. La proteína (por ejemplo, un oligopéptido, un polipéptido, un anticuerpo, o similar) tiene una especificidad de sustrato para una diana deseada, y el agente activo (por ejemplo, un fármaco, una toxina, un ligando, una sonda de detección, y similares) tiene una función o actividad específica. La divulgación también se refiere a métodos para preparar el conjugado. La divulgación se refiere además a métodos de uso del conjugado para administrar un agente activo a una célula diana en un sujeto, así como a métodos para tratar a un sujeto que necesita el agente activo (por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer).

(b) Antecedentes de la técnica

20 Se han propuesto métodos para inhibir el crecimiento de células cancerosas mediante la administración dirigida de agentes anticancerígenos. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración dirigida de un conjugado anticuerpo-fármaco puede destruir una célula cancerosa particular. Como el anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) se une específicamente a la célula cancerosa, el fármaco se administra a la célula cancerosa diana. La administración dirigida del fármaco garantiza que el fármaco actúa sobre la célula cancerosa diana en vez de sobre células huésped normales, minimizando de ese modo los efectos secundarios que resultan del daño a células normales.

30 Los conjugados de anticuerpo pueden usarse para administrar moléculas químicas y/o biológicas. Los ejemplos de moléculas químicas y/o biológicas incluyen un fármaco usado de manera convencional en tratamiento químico, una toxina de proteína bacteriana (por ejemplo, toxina diftérica), una toxina de proteína vegetal (por ejemplo, ricina), una toxina de molécula pequeña (por ejemplo, auristatina, geldanamicina, maitansinoide, caliqueamicina, daunomicina, metotrexato, vindesina y tubulisina), un ligando de afinidad, una sonda de detección (por ejemplo, sonda fluorescente, sonda radiactiva), y similares (incluyendo combinaciones de los mismos).

35 Los conjugados anticuerpo-fármaco que se han propuesto hasta ahora se preparan enlazando un resto del fármaco con una pluralidad de grupos lisina de un anticuerpo. Alternativamente, los conjugados anticuerpo-fármaco se preparan reduciendo la totalidad o parte de los grupos disulfuro intercatenarios de un anticuerpo o reduciendo la totalidad de los grupos disulfuro intercatenarios seguido por una oxidación parcial para proporcionar de ese modo grupos tiol de cisteína libres, y luego enlazando los grupos tiol de cisteína libres con un resto del fármaco.

40 Sin embargo, los métodos de preparación existentes tienen algunos problemas. Por ejemplo, el procedimiento de preparación global es complicado porque los conjugados anticuerpo-fármaco preparados mediante los métodos de preparación existentes no son uniformes (homogéneos). Cuando se preparan conjugados anticuerpo-fármaco uniendo un resto del fármaco con grupos lisina, se obtienen diversos tipos y formas de conjugados anticuerpo-fármaco debido a la presencia de muchos grupos lisina en el anticuerpo (por ejemplo, 100 grupos lisina por anticuerpo). De manera similar, cuando se preparan conjugados anticuerpo-fármaco enlazando grupos tiol con un resto del fármaco, se obtiene una mezcla de diastereómeros debido a enlaces entre grupos tiol y grupos maleimida. Por ejemplo, si se conjugan n fármacos, se obtiene una mezcla de 2^n estereoisómeros. Por tanto, cuando el número de distribución de fármaco es de 0-8 (por ejemplo, cuando se reducen grupos disulfuro intercatenarios), se obtiene

50 una mezcla de $\sum_{n=0}^{n=8} 2^n$ de estereoisómeros. Además, cuando se conjugan i fármacos con q sitios, se obtiene una

mezcla de $\sum_{i=0}^q qCi$ de diferentes compuestos.

Además, cuando se preparan conjugados anticuerpo-fármaco enlazando grupos lisina con un resto del fármaco, puede perderse la carga eléctrica de los grupos lisina, haciendo de ese modo que el anticuerpo pierda su especificidad de antígeno única. Asimismo, la estructura terciaria o cuaternaria del anticuerpo puede no mantenerse cuando se preparan conjugados anticuerpo-fármaco reduciendo grupos disulfuro, haciendo de ese modo que el anticuerpo se desactive o se convierta en un anticuerpo inespecífico. Cuando se preparan conjugados anticuerpo-fármaco usando enlaces tiol-maleimida, el fármaco puede escindirse (de manera inespecífica) de los conjugados a través de, por ejemplo, una reacción inversa.

Para superar los problemas asociados con los métodos de preparación anteriores, se propuso un método alternativo en el que grupos aminoácido en posiciones particulares de un anticuerpo se reemplazan por grupos cisteína. Aunque este método muestra un mejor resultado que los métodos de preparación anteriores en cuanto a toxicidad, actividad y seguridad, este método todavía implica enlaces tiol-maleimida y, por tanto, presenta los problemas de diastereómeros e inestabilidad asociados con los enlaces tiol-maleimida. Se propuso otro método alternativo en el que se unen grupos selenocisteína a los extremos carboxilo terminales de un anticuerpo.

Además de usar las sustituciones de cisteína para controlar el sitio de conjugación, Ambrx Technology (<http://www.ambrx.com>) ha estado trabajando para incorporar aminoácidos no naturales en el anticuerpo para proporcionar grupos funcionales que pueden usarse para la química de grupos conectores. Los sistemas de expresión de Ambrx contienen ARNt sintetasas que aminoacilan el original ARNt original con un aminoácido no natural, insertando de ese modo un aminoácido no natural cada vez que se encuentra el codón de terminación ámbar.

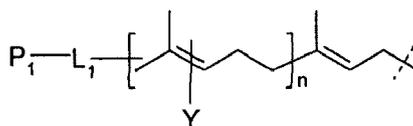
La tecnología de Redwood Bioscience (<http://www.redwoodbioscience.com>) emplea etiquetas de aldehído codificadas genéticamente y tiene como objetivo aprovechar una secuencia específica que se reconoce de manera postraducciona y se modifica por una enzima, es decir, una enzima de generación de formilglucina, para producir un denominado asidero químico de aldehídos. La incorporación de una secuencia CxPxR en posiciones específicas en el anticuerpo proporcionan un medio para producir un aldehído reactivo responsable de la conjugación del fármaco.

Sin embargo, en vista de los problemas en la técnica mencionados anteriormente relacionados con la fabricación de conjugados anticuerpo-fármaco, son muy deseables conjugados anticuerpo-fármaco y nuevos métodos de fabricación de conjugados anticuerpo-fármaco.

La información dada a conocer anteriormente en esta sección de antecedentes es solo para mejorar la comprensión de los antecedentes de la invención y, por tanto, puede contener información que no forma parte de la técnica anterior que ya se conoce por un experto habitual en la técnica.

Sumario de la divulgación

La invención se define mediante las reivindicaciones, y cualquier otro aspecto o realización expuestos en el presente documento que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para información. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un conjugado anticuerpo-agente activo, en el que el anticuerpo tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa, en el que el agente activo se une covalentemente al anticuerpo en el resto de aminoácido, en el que el resto de aminoácido es CAAX, XXCC, XCXC o CXX, en los que C representa cisteína, A representa un aminoácido alifático y X representa un aminoácido que determina una especificidad de sustrato de la isoprenoide transferasa; y en el que el resto de aminoácido se une covalentemente al agente activo a través de al menos un grupo conector, en el que el al menos un grupo conector es un derivado de isoprenilo que puede ser reconocido por la isoprenoide transferasa, en el que el grupo conector está representado por la fórmula (I):



(I)

en la que

P_1 e Y son cada uno independientemente un grupo que contiene un primer grupo funcional (FG1), seleccionándose FG1 del grupo que consiste en: acetileno, azida, aldehído, hidroxilamina, hidrazina, cetona, nitrobenzofurazano (NBD), dansilo, fluoresceína, biotina y rodamina,

L_1 es $(CH_2)_r X_q (CH_2)_p$,

X es oxígeno, azufre, $-NR_1-$, $-C(O)NR_1-$, $-NR_1C(O)-$, $-NR_1SO_2-$, $-SO_2NR_1-$, $-(CH=CH)-$ o acetileno,

R_1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -arilo o alquil C_{1-6} -heteroarilo,

r y p son cada uno independientemente un número entero de 0 a 6,

q es un número entero de 0 a 1, y

n es un número entero de 1 a 4,

5 en la que el agente activo se une a un grupo que contiene un segundo grupo funcional (FG2) que puede reaccionar con el FG1, en la que el FG2 se selecciona del grupo que consiste en: acetileno, hidroxilamina, azida, aldehído, hidrazina, cetona, y

10 en la que el agente activo se une al grupo que contiene un FG2 a través de $-(CH_2)_rX_q(CH_2)_p-$ o $[ZCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2Z]-$, en el que

15 X es oxígeno, azufre, $-NR_1$, $-C(O)NR_1-$, $-NR_1C(O)-$, $-NR_1SO_2$ o $-SO_2NR_1-$,

Z es oxígeno, azufre o NR_1 ,

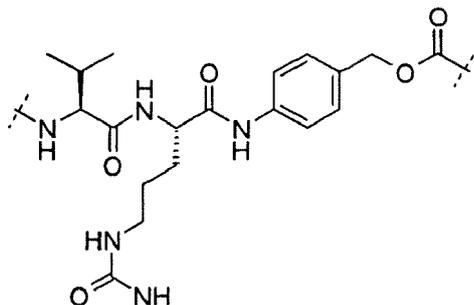
15 R_1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -arilo o alquil C_{1-6} -heteroarilo,

r y p son cada uno independientemente un número entero de 0 a 6,

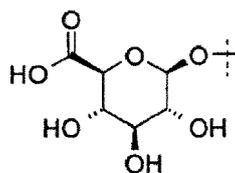
20 q es un número entero de 0 a 1, y

w es un número entero de 0 a 6,

25 en la que el $-(CH_2)_rX_q(CH_2)_p-$ o $-[ZCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2Z]-$ se une a (i) un(os) péptido(s) que puede(n) escindirse por catepsina B o (ii) un glucurónido que puede escindirse por β -glucuronidasa, en la que el péptido que puede escindirse por catepsina B es



30 y el glucurónido que puede escindirse por β -glucuronidasa es



35 y en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo de unión a diana, un mutante de Fv de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico generado de al menos dos anticuerpos intactos, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano o una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo de unión a diana. La presente invención también se refiere a un método para preparar el conjugado anticuerpo-agente activo de la invención, comprendiendo el método: (a) expresar un anticuerpo unido a un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa; (b) hacer reaccionar enzimáticamente, usando la isoprenoide transferasa, el anticuerpo expresado con al menos un isosustrato que tiene un primer grupo funcional (FG1), produciendo de ese modo un anticuerpo funcionalizado; (c) unir un segundo grupo funcional (FG2) a un agente activo, produciendo de ese modo un agente activo funcionalizado; y (d) hacer reaccionar el anticuerpo funcionalizado con el agente activo funcionalizado, produciendo de ese modo el conjugado anticuerpo-agente activo, o (a) expresar un anticuerpo unido a un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa; (b) unir un isosustrato de la isoprenoide transferasa a un agente activo; y (c) hacer reaccionar enzimáticamente, usando la isoprenoide transferasa, el anticuerpo expresado con el agente activo unido al isosustrato. Además, la presente invención se refiere a una composición que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y el conjugado anticuerpo-agente activo de la invención.

Tal como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento, generalmente se describen también

5 en el presente documento conjugados de proteína-agente activo y métodos para fabricar los conjugados de proteína-agente activo. Se describen también en el presente documento métodos para administrar el conjugado de proteína-agente activo a una célula diana en un sujeto, así como métodos para tratar a un sujeto que necesita el agente activo. Los conjugados de proteína-agente activo descritos en el presente documento pueden producirse de manera homogénea y usarse ventajosamente para un tratamiento dirigido de una enfermedad.

10 En aspectos, se describen conjugados de proteína-agente activo en el presente documento. La proteína puede tener un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa. El agente activo puede unirse covalentemente a la proteína en el resto de aminoácido.

15 La proteína puede tener una delección en el extremo carboxilo terminal de la proteína. La modificación puede unirse al resto de aminoácido.

La proteína puede ser una adición de oligopéptido o polipéptido en el extremo carboxilo terminal de la proteína. En aspectos relacionados, la modificación puede unirse al resto de aminoácido.

20 La proteína puede tener una delección en el extremo carboxilo terminal de la proteína y una adición de oligopéptido o polipéptido en el extremo carboxilo terminal de la proteína. En aspectos relacionados, la modificación puede unirse al resto de aminoácido.

La proteína puede ser un anticuerpo o un fragmento de un polipéptido antigénico. Además, la proteína puede ser un anticuerpo monoclonal. Al menos una cadena ligera y/o al menos una cadena pesada del anticuerpo monoclonal puede comprender una región de aminoácidos que tiene el resto de aminoácido.

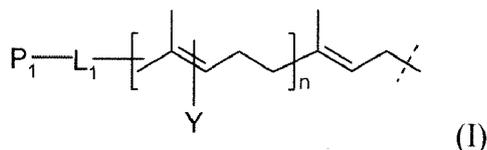
25 En cualquiera de los aspectos anteriores, la isoprenoide transferasa es FTasa o GGTasa.

En cualquiera de los aspectos anteriores, el agente activo es un fármaco, una toxina, un ligando de afinidad, una sonda de detección, o una combinación de los mismos.

30 En cualquiera de los aspectos anteriores, el resto de aminoácido es CAAX, XXCC, XCXC o CXX, en los que C representa cisteína, A representa un aminoácido alifático y X representa un aminoácido que determina una especificidad de sustrato de la isoprenoide transferasa.

35 En cualquiera de los aspectos anteriores, el resto de aminoácido se une covalentemente al agente activo a través de al menos un grupo conector. El grupo conector puede ser un derivado de isoprenilo que puede ser reconocido por la isoprenoide transferasa.

El grupo conector puede representarse mediante la siguiente fórmula (I):



40 en la que,

45 P₁ e Y son independientemente un grupo que contiene un primer grupo funcional (FG1), seleccionándose el FG1 del grupo que consiste en: acetileno, azida, aldehído, hidroxilamina, hidrazina, cetona, nitrobenzofurazano (NBD), dansilo, fluoresceína, biotina y rodamina,

L₁ es (CH₂)_rX_q(CH₂)_p,

50 X es oxígeno, azufre, -NR₁-, -C(O)NR₁-, -NR₁C(O)-, -NR₁SO₂-, -SO₂NR₁-, - (CH=CH)- o acetileno,

R₁ es hidrógeno, alquilo C₁₋₆, alquil C₁₋₆-arilo o alquil C₁₋₆-heteroarilo,

55 r y p son independientemente un número entero de 0 a 6,

q es un número entero de 0 a 1, y

n es un número entero de 1 a 4.

60 El agente activo puede unirse a un grupo que contiene un segundo grupo funcional (FG2) que puede reaccionar con el FG1. FG2 puede ser un acetileno, una hidroxilamina, una azida, un aldehído, una hidrazina, una cetona o una

amina. Además, el agente activo puede unirse al grupo que contiene un FG2 a través de $-(CH_2)_rX_q(CH_2)_p-$ o $-[ZCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2Z]-$, en el que

X es oxígeno, azufre, $-NR_1-$, $-C(O)NR_1-$, $-NR_1C(O)-$, $-NR_1SO_2-$ o $-SO_2NR_1-$,

Z es oxígeno, azufre o NR_1 ,

R_1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -arilo o alquil C_{1-6} -heteroarilo,

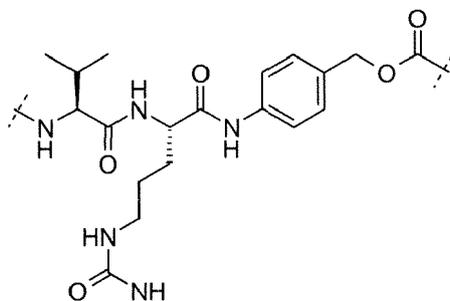
r y p son independientemente un número entero de 0 a 6,

q es un número entero de 0 a 1, y

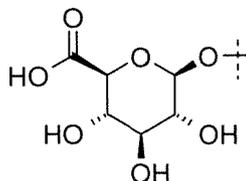
m es un número entero de 0 a 6.

Aún más, el $-(CH_2)_rX_q(CH_2)_p-$ o $-[ZCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2Z]-$ puede unirse a (i) un(os) péptido(s) que puede(n) escindirse por catepsina B o (ii) un glucurónido que puede escindirse por β -glucuronidasa.

El péptido que puede escindirse por catepsina B puede ser



El glucurónido que puede escindirse por β -glucuronidasa puede ser



Se describen también en el presente documento métodos para preparar cualquiera del conjugado de proteína-agente activo descrito en el presente documento. Los métodos pueden implicar expresar una proteína que tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa. Los métodos pueden implicar hacer reaccionar enzimáticamente, con la isoprenoide transferasa, la proteína expresada y al menos un isosustrato que tiene un primer grupo funcional (FG1), produciendo de ese modo una proteína funcionalizada. Los métodos pueden implicar unir un segundo grupo funcional (FG2) a un agente activo, produciendo de ese modo un agente activo funcionalizado. Los métodos pueden implicar, hacer reaccionar la proteína funcionalizada con el agente activo funcionalizado, produciendo de ese modo el conjugado de proteína-agente activo.

El resto de aminoácido puede estar en el extremo carboxilo terminal de la proteína.

El resto de aminoácido puede ser CAAX, XXCC, XCXC o CXX, en los que C representa cisteína, A representa un aminoácido alifático, y X representa un aminoácido que determina la especificidad de sustrato de la isoprenoide transferasa.

El resto de aminoácido puede ser CAAX, y en el que el método puede comprender adicionalmente retirar AAX del resto de aminoácido después de la etapa (b).

El FG2 puede unirse al agente activo mediante al menos un grupo conector.

La reacción entre la proteína funcionalizada y el agente activo funcionalizado puede ser una reacción de química clic o una formación de hidrazona y/u oxima. El FG1 puede ser un grupo azida y el FG2 puede ser un grupo acetileno. El FG1 puede ser un grupo acetileno y el FG2 puede ser un grupo azida. El FG1 puede ser un grupo aldehído o cetona y el FG2 puede ser una hidrazina o hidroxilamina. El FG1 es hidrazina o hidroxilamina y el FG2 puede ser un

aldehído o una cetona.

Se describen también en el presente documento métodos para preparar cualquier conjugado de proteína-agente activo descrito en el presente documento, y los métodos implican expresar una proteína que tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa. Los métodos pueden implicar unir un isosustrato de una isoprenoide transferasa a un agente activo. Los métodos pueden implicar hacer reaccionar enzimáticamente, con la isoprenoide transferasa, la proteína expresada y el agente activo unido al isosustrato.

El resto de aminoácido puede estar en el extremo carboxilo terminal de la proteína.

El resto de aminoácido puede ser CAAX, XXCC, XCXC o CXX, en los que C representa cisteína, A representa un aminoácido alifático, y X representa un aminoácido que determina la especificidad de sustrato de la isoprenoide transferasa.

El isosustrato puede unirse al agente activo mediante al menos un grupo conector.

Se describen también en el presente documento composiciones que contienen cualquiera de los conjugados de proteína-agente activo descritos en el presente documento. La composición puede ser una mezcla homogénea del conjugado de proteína-agente activo. La proteína puede ser un anticuerpo o un fragmento de un polipéptido antigénico.

Se describen también en el presente documento métodos para administrar un agente activo a una célula diana en un sujeto. Los métodos pueden implicar administrar al menos uno de los conjugados de proteína-agente activo o las composiciones descritos en el presente documento. La célula diana puede ser una célula cancerosa.

Se describen también en el presente documento métodos para tratar a un sujeto que lo necesita (es decir, que necesita el agente activo). Los métodos pueden implicar administrar al menos uno de los conjugados de proteína-agente activo o las composiciones descritos en el presente documento. El sujeto puede tener cáncer. El sujeto puede tener una infección con un agente patógeno. El agente patógeno puede ser un virus, una bacteria, un hongo o un parásito.

En los conjugados de proteína-agente activo, las composiciones y los métodos anteriormente descritos, el agente activo puede ser un compuesto inmunomodulador, un agente anticancerígeno, un agente antivírico, un agente antibacteriano, un agente antifúngico o un agente antiparasitario.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-HC-GCVIM) preparado insertando GCVIM en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Herceptin.

La figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-LC-GCVIM) preparado insertando GCVIM en el extremo C-terminal de la cadena ligera de Herceptin.

La figura 3 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-HC-G₅CVIM) preparado insertando G₅CVIM en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Herceptin.

La figura 4 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-LC-G₅CVIM) preparado insertando G₅CVIM en el extremo C-terminal de la cadena ligera de Herceptin.

La figura 5 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-HC-G₇CVIM) preparado insertando G₇CVIM en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Herceptin.

La figura 6 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-LC-G₇CVIM) preparado insertando G₇CVIM en el extremo C-terminal de la cadena ligera de Herceptin.

La figura 7 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-HC-G₁₀CVIM) preparado insertando G₁₀CVIM en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Herceptin.

La figura 8 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-LC-G₁₀CVIM) preparado insertando G₁₀CVIM en el extremo C-terminal de la cadena ligera de Herceptin.

La figura 9 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-HC-G₁₀CVLL) preparado insertando G₁₀CVLL en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Herceptin.

La figura 10 muestra una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo Herceptin modificado (Herceptin-LC-G₁₀CVLL) preparado insertando G₁₀CVLL en el extremo C-terminal de la cadena ligera de Herceptin.

- 5 La figura 11 muestra un gel de SDS-PAGE que analiza un anticuerpo anti-cMet modificado (anti cMET-HC-G₇CVIM) preparado insertando G₇CVIM en el extremo C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo anti-cMet, un anticuerpo anti-cMet modificado (anti cMET-LC-G₇CVIM) preparado insertando G₇CVIM en el extremo C-terminal de la cadena ligera de anticuerpo anti-cMet, un anticuerpo anti-cMet modificado (anti cMET-HC-G₁₀CVIM) preparado insertando G₁₀CVIM en el extremo C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo anti-cMet y un anticuerpo anti-cMet modificado (anti cMET-LC-G₁₀CVIM) preparado insertando G₁₀CVIM en el extremo C-terminal de la cadena ligera de anticuerpo anti-cMet.
- 10 La figura 12 muestra un gel de SDS-PAGE que analiza la prenilación de Herceptin-HC-G_nCVIM usando FTasa y NBD-GPP.
- La figura 13 muestra un gel de SDS-PAGE que analiza la prenilación de Herceptin-LC-G_nCVIM usando FTasa y NBD-GPP.
- 15 La figura 14 muestra un gel de SDS-PAGE que analiza la prenilación de cMET-HC-G_nCVIM usando FTasa y NBD-GPP.
- La figura 15 muestra un gel de SDS-PAGE que analiza la prenilación de cMET-LC-G_nCVIM usando FTasa y NBD-GPP.
- 20 La figura 16 muestra un gel de SDS-PAGE que analiza la prenilación de Herceptin-HC-G₁₀CVLL y Herceptin-LC-G₁₀CVLL usando FTasa/NBD-GPP o GGTasa I/NBD-FPP.
- La figura 17 muestra los resultados del análisis CL/EM de una Herceptin-LC-G₇CVIM prenilada.
- 25 La figura 18 muestra los resultados del análisis CL/EM de una Herceptin-LC-G₁₀CVIM prenilada.
- La figura 19 muestra los resultados del CL/EM y análisis de espectros de masas deconvolucionados de LCB14-0104 (Herceptin-LCG₇CVIM-NC-MMAF-Ome).
- 30 La figura 20 muestra los cromatogramas de HIC-HPLC de Herceptin-LC-G₇CVIM, Herceptin-LC-G₇CVIM prenilada y LCB 14-0101 (Herceptin-LC-G₇CVIM-BG-MMAF).
- La figura 21 muestra los resultados del ensayo antiproliferación de LCB14-0101 (Herceptin-LC-G₇CVIM-BG-MMAF) con líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-468 y SK-BR-3.
- 35 La figura 22 muestra los resultados del ensayo antiproliferación de LCB 14-0102 (Herceptin-LC-G₇CVIM-VC-MMAF-OMe) con líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SK-BR-3.
- 40 La figura 23 muestra los resultados del ensayo antiproliferación de LCB14-0103 (Herceptin-LC-G₇CVIM-BG-MMAE) con líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SK-BR-3.
- La figura 24 muestra un procedimiento de modificación postraduccional de una proteína (CVIM C-terminal).
- 45 La figura 25 muestra un mecanismo de liberación de fármacos activos (excepto el grupo conector que no puede escindirse).
- La figura 26 muestra las estructuras químicas de los conjugados anticuerpo-fármaco LCB 14-0101, LCB14-0102, LCB14-0103 y LCB14-0104.
- 50 La figura 27 es un diagrama esquemático que representa un procedimiento para preparar un conjugado de proteína-agente activo usando una isoprenoide transferasa y un isosustrato de la misma, en el que se alquila la cisteína del resto de CAAX.

55 Descripción detallada de la divulgación

Definiciones

60 Por “agente” o “agente activo” se entiende cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula de ácido nucleico o polipéptido, o fragmentos de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, un fármaco, una toxina, un ligando de afinidad, una sonda de detección o una combinación de los mismos.

65 Por “análogo” se entiende una molécula que no es idéntica, pero que tiene características funcionales o estructurales análogas. Por ejemplo, un análogo de polipéptido retiene la actividad biológica de un polipéptido que se produce de manera natural correspondiente, mientras que tiene ciertas modificaciones bioquímicas que mejoran la función del análogo en relación con un polipéptido que se produce de manera natural. Tales modificaciones

bioquímicas pueden aumentar la resistencia a la proteasa del análogo, la permeabilidad de la membrana o la semivida, sin alterar, por ejemplo, la unión del ligando. Un análogo puede incluir un aminoácido no natural.

5 Por "que contacta con una célula" se entiende en el presente documento que proporciona un agente a una célula, por ejemplo, una célula a tratar en cultivo, *ex vivo*, o en un animal, de manera que el agente puede interactuar con la célula (por ejemplo, la célula que va a tratarse), ser potencialmente absorbida por la célula y tener un efecto sobre la célula. El agente (por ejemplo, un adyuvante) puede administrarse directamente a la célula (por ejemplo, mediante la adición del agente al medio de cultivo o mediante la inyección en la célula o el tejido de interés), o mediante la administración al organismo por vía de administración tópica o parenteral para el suministro a la célula por medios vasculares, linfáticos u otros medios. Un experto en la materia comprenderá fácilmente que la administración de los conjugados de proteína-agente activo descritos en el presente documento a un sujeto implica poner en contacto el conjugado de proteína-agente activo con una célula del sujeto.

15 Por "enfermedad" se entiende cualquier estado o trastorno que daña o interfiere la función normal de una célula, un tejido o un órgano.

20 El término "cantidad eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz", "dosis eficaz", o "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a esa cantidad de un agente para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo pretendido. Por ejemplo, la cantidad farmacológicamente eficaz da como resultado la prevención o el retraso del inicio de la enfermedad, o bien en un individuo o bien en la frecuencia de la enfermedad en una población. Puede requerirse más de una dosis para proporcionar una dosis eficaz. Se entiende que una dosis eficaz en una población puede o no ser suficiente en todas las poblaciones. Por tanto, en relación con la administración de un agente o composición inmunógeno, el agente o composición inmunógeno es "eficaz contra" una enfermedad o un estado cuando la administración de una manera clínicamente apropiada da como resultado un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente significativa de sujetos, tales como la prevención del inicio de la enfermedad, la mejora de los síntomas, una cura, una reducción de los signos o síntomas de la enfermedad, la extensión de la vida, la mejora de la calidad de vida u otro efecto generalmente reconocido como positivo por los médicos familiarizados con el tratamiento del tipo particular de enfermedad o estado.

30 Por "mejora" se entiende una alteración positiva de al menos el 10%, el 25%, el 50%, el 75%, el 100%, o cualquier número entre los mismos.

35 Por "fragmento" se entiende una porción de un polipéptido o una molécula de ácido nucleico. Esta porción contiene, preferiblemente, al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de la longitud completa de la molécula de ácido nucleico o el polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 1000 nucleótidos o aminoácidos.

40 "Obtención" se entiende en el presente documento como fabricación, compra, síntesis, aislamiento, purificación o de cualquier otra forma de estar en posesión de.

45 La expresión "portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable" se reconoce en la técnica e incluye un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, adecuado para administrar compuestos tal como se describe en el presente documento a mamíferos. Tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de EE. UU., la Farmacopea Europea u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en mamíferos, por ejemplo, seres humanos.

50 Por "reduce" se entiende una alteración negativa de al menos el 10%, el 25%, el 50%, el 75%, el 100%, o cualquier número entre los mismos.

Por "referencia" se entiende una condición patrón o de control.

55 Una "muestra" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material biológico que se aísla de su entorno (por ejemplo, sangre o tejido de un animal, células o medios condicionados del cultivo de tejidos). Se puede sospechar que la muestra contiene, o se sabe que contiene un analito, tal como una proteína de interés (por ejemplo, anticuerpo, citoquina y similares). Una muestra también puede ser una fracción parcialmente purificada de un tejido o un líquido corporal. Una muestra de referencia puede ser una muestra "normal", de un líquido del donante que no tiene la enfermedad o el estado, o de un tejido normal en un sujeto que tiene la enfermedad o el estado, o un sujeto no tratado (por ejemplo, un sujeto no tratado con la vacuna). También puede tomarse una muestra de referencia en un "punto de tiempo cero" antes de poner en contacto la célula o el sujeto con el agente o la intervención terapéutica que va a analizarse.

65 Por "se une específicamente" se entiende reconocimiento y unión a una diana (por ejemplo, polipéptido, célula, y similares), pero que no reconoce y se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica.

Un "sujeto" tal como se usa en el presente documento se refiere a un organismo vivo. El organismo vivo puede ser un animal. El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto puede ser un mamífero domesticado o un primate, incluido un primate no humano. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cerdos, cabras, ovejas y pájaros. Un sujeto también puede denominarse paciente.

Un sujeto "que padece de o se sospecha que padece de" una enfermedad, un estado o síndrome específico tiene una cantidad suficiente de factores de riesgo o presenta una cantidad o combinación suficiente de signos o síntomas de la enfermedad, el estado o síndrome de manera que se diagnostica al individuo o se sospecha que el sujeto padece la enfermedad, el estado o síndrome. Los métodos para la identificación de sujetos que padecen o se sospecha que padecen una enfermedad o un estado están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Los sujetos que padecen y se sospecha que padecen una enfermedad, un estado o síndrome específico no son necesariamente dos grupos distintos. Un experto en la materia también comprenderá fácilmente que un sujeto que necesita un agente activo también puede ser un sujeto que padece o se sospecha que padece una enfermedad, un estado o síndrome específico.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "que trata", "tratamiento", y similares se refieren a reducir o aliviar un trastorno y/o síntomas asociados al mismo (por ejemplo, cáncer o síntomas asociados al cáncer). Se apreciará que, aunque no se excluye, tratar un trastorno o estado no requiere que el trastorno, estado o los síntomas asociados con el mismo se eliminen completamente.

Los intervalos proporcionados en el presente documento se entienden como abreviatura de todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, un intervalo de 1 a 50 se entiende que incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50.

A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente puede entenderse como dentro del 10%, el 9%, el 8%, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2%, el 1%, el 0,5%, el 0,1%, el 0,05% o el 0,01% del valor indicado.

1. Métodos para preparar conjugados de proteína-agente activo

A continuación, se proporcionan métodos de ejemplo, que se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Método de ejemplo 1

Un método para preparar un conjugado de proteína-agente activo tal como se describe en el presente documento comprende: (a) expresar una proteína que tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa; (b) hacer reaccionar enzimáticamente, usando la isoprenoide transferasa, la proteína expresada y al menos un isosustrato que tiene un primer grupo funcional (FG1), produciendo de ese modo una proteína funcionalizada; (c) unir un segundo grupo funcional (FG2) a un agente activo, produciendo de ese modo un agente activo funcionalizado; y (d) hacer reaccionar la proteína funcionalizada con el agente activo funcionalizado, produciendo de ese modo el conjugado de proteína-agente activo.

El término "proteína" usado en el presente documento se entiende como dos o más aminoácidos naturales o no naturales independientemente seleccionados unidos por un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico). Un péptido puede incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos naturales o no naturales unidos por enlaces peptídicos. Los polipéptidos tal como se describen en el presente documento incluyen proteínas de longitud completa (por ejemplo, proteínas completamente procesadas) así como secuencias de aminoácidos más cortas (por ejemplo, fragmentos de proteínas que se producen de manera natural o fragmentos de polipéptidos sintéticos).

Una proteína se refiere a un oligopéptido o polipéptido que contiene al menos un extremo C-terminal y al menos un extremo N-terminal. El término se usa en el presente documento para incluir un oligopéptido o polipéptido intacto, una forma modificada del mismo, un fragmento del mismo y análogos del mismo. Por ejemplo, el término puede referirse a un oligopéptido o polipéptido, o un oligopéptido o polipéptido modificado uniendo al mismo una secuencia de aminoácidos que pueda ser reconocido por una isoprenoide transferasa. El término "fragmento" usado en el presente documento se refiere a una porción de la secuencia de aminoácidos que consiste en un oligopéptido o polipéptido. El término se usa en el presente documento para incluir una porción de la secuencia de aminoácidos que tiene la especificidad de sustrato del oligopéptido o polipéptido. El término "análogo" se refiere a un oligopéptido o polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70% o el 75%, al menos el 80% o el 85%, al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, o el 95%, o al menos el 96%, el 97%, el 98% o el 99% con un oligopéptido o polipéptido de referencia.

El término "proteína" usado en el presente documento también incluye un anticuerpo, un fragmento de un polipéptido antigénico, o un análogo o derivado de los mismos. El término "anticuerpo" significa una molécula de

inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, un polipéptido, un péptido, un hidrato de carbono, un polinucleótido, un lípido, o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y Fv), mutantes Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos multiespecíficos como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno siempre que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), según la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea involucrada en el reconocimiento altamente específico y la unión de un único determinante antigénico, o epítipo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos. El término "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab)₂, Fd, Fv), mutantes de cadena sencilla (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a tales anticuerpos elaborados de varias maneras, que incluyen, pero sin limitarse a, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son cadenas de inmunoglobulina, inmunoglobulinas quiméricas o fragmentos específicos de las mismas que contienen secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, murinas). Típicamente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo, hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332: 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science*, 239: 1534-1536) En algunos casos, los residuos de la región marco Fv (FR) de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos correspondientes en un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de un residuo adicional en la región de entramado Fv y/o dentro de los residuos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos o tres dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana, mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente el de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen en la patente estadounidense 5.225.539.

El término "anticuerpo humano" significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano producido usando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada y/o ligera tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende cadena ligera murina y polipéptidos de cadena pesada humana.

El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se deriva de dos o más especies. Típicamente, la región variable de las cadenas ligeras y pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en los anticuerpos derivados de otro (generalmente humano) para evitar provocar una respuesta inmune en esa especie.

Los términos "epítipo" o "determinante antigénico" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a esa porción de un antígeno capaz de reconocer y unirse específicamente mediante un anticuerpo particular. Cuando el antígeno es un polipéptido, los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos y

aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente tras la desnaturalización de proteínas, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente tras la desnaturalización de proteínas. Un epítomo incluye típicamente al menos 3, al menos 5, o al menos 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

Que un anticuerpo “se une específicamente” a un epítomo o molécula antigénica significa que el anticuerpo reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración, con mayor afinidad, o con alguna combinación de los anteriores a un epítomo o molécula antigénica que con sustancias alternativas, incluyendo proteínas no relacionadas. puede significar, por ejemplo, que un anticuerpo se une a una proteína con una K_D de aproximadamente 0,1 mM o menos, pero más usualmente menos de aproximadamente 1 μ M. “Se une específicamente” también puede significar que un anticuerpo se une a una proteína a veces con una K_D de al menos aproximadamente 0,1 μ M o menos, y en otras ocasiones al menos aproximadamente 0,01 μ M o menos. Debido a la identidad de secuencia entre proteínas homólogas en diferentes especies, la unión específica puede incluir un anticuerpo que reconoce una proteína particular en más de una especie. Se entiende que un anticuerpo o resto de unión que se une específicamente a una primera diana puede unirse específicamente o no a una segunda diana. Como tal, la “unión específica” no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva, es decir, la unión a una única diana. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión específica.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos/derivados de los mismos y anticuerpos monoclonales, pueden obtenerse usando métodos conocidos en la técnica. (Véanse McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554 (1990); Clackson *et al.*, Nature 352:624-628; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Marks *et al.*, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Waterhouse *et al.*, Nucleic. Acids Res. 21:2265-2266 (1993); Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); Brennan *et al.*, Science 229:81(1985); Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992); Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975); patente estadounidense n.º 4.816.567); Kilpatrick *et al.*, Hybridoma 16(4):381-389 (1997); Wring *et al.*, J. Pharm. Biomed. Anal. 19(5):695-707 (1999); Bynum *et al.*, Hybridoma 18(5):407-411 (1999); Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno. 7:33 (1993); Barbas *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.*, Gene 169:147-155 (1995); Yelton *et al.*, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992), patentes estadounidenses n.ºs 5514548, 5545806, 5569825, 5591669, 5545807; documento WO 97/17852)

Los ejemplos no limitativos del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, muromonab-CD3, abciximab, rituximab, daclizumab, palivizumab, infliximab, trastuzumab, etanercept, basiliximab, gemtuzumab ozogamicina, alemtuzumab, ibritumomab tiuxetán, adalimumab, alefacept, omalizumab, efalizumab, tositumomab-I131, cetuximab, bevacizumab, natalizumab, ranibizumab, panitumumab, ecolizumab, rilonacept, certolizumab pegol, romiplostim, AMG-531, CNTO-148, CNTO-1275, ABT-874, LEA-29Y, belimumab, TACI-Ig, anti-CD20 de 2ª generación, ACZ-885, tocilizumab (atlizumab), mepolizumab, pertuzumab, Humax CD20, CP-675, 206 (ticilimumab), MDX-010, IDEC-114, inotuzumab ozogamicina, HuMax EGFR, aflibercept, VEGF Trap-Eye, HuMax-CD4, Ala-Ala, ChAglyCD3;TRX4, catumaxomab, IGN101, MT-201, pregovomab, CH-14,18, WX-G250, AMG-162, AAB-001, motavizumab, MEDI-524, efumgumab, Aurograb®, raxibacumab, anti-CD20 de 3ª generación, LY2469298, veltuzumab.

Cuando la proteína es un anticuerpo monoclonal, al menos una cadena ligera del anticuerpo monoclonal, al menos una cadena pesada del anticuerpo monoclonal, o ambas pueden comprender una región de aminoácidos que tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa.

El extremo C-terminal de la cadena ligera o pesada puede modificarse. Además, las regiones CH₂ de la región Fc pueden glicosilarse.

Un extremo C-terminal de una proteína (un fragmento, análogo o derivado de la misma) puede unirse a un resto de aminoácido que puede ser reconocido por isoprenoide transferasa. El extremo C-terminal puede modificarse. La modificación puede ser (i) una deleción en el extremo carboxilo terminal de la proteína, (ii) una adición de oligopéptido o polipéptido en el extremo carboxilo terminal de la proteína, o (iii) una deleción en el extremo carboxilo terminal de la proteína y una adición de oligopéptido o polipéptido en el extremo carboxilo terminal de la proteína. La modificación puede unirse al resto de aminoácido.

El término “isoprenoide transferasa” usado en el presente documento se refiere a una enzima que puede reconocer un determinado resto de aminoácido en o cerca de un extremo C-terminal de una proteína y realizar la alquilación selectiva en la(s) posición(es) de tiol de residuo(s) de cisteína del determinado resto de aminoácido añadiendo una(s) unidad(es) de isoprenoide a la proteína que porta el determinado resto de aminoácido.

Los ejemplos de la isoprenoide transferasa incluyen farnesiltransferasa (FTasa) y geranilgeraniltransferasa (GGTasa), que implican la transferencia de un resto farnesilo o un geranil-geranilo a la(s) cisteína(s) C-terminal(es) de la proteína diana, respectivamente. La GGTasa puede clasificarse en GGTasa I y GGTasa II. FTasa y GGTasa I pueden reconocer un resto de CAAX y GGTasa II puede reconocer un resto de XXCC, XCXC o CXX, en los que C representa cisteína, A representa un aminoácido alifático y X representa un aminoácido que determina la especificidad de sustrato de las isoprenoide transferasas (Nature Rev. Cancer 2005, 5(5), págs. 405-12; Nature

Chemical Biology, 2010, 17, págs. 498-506; Lane KT, Bees LS, Structural Biology of Protein of Farnesiltransferase and Geranylgeranyltransferase Type I, Journal of Lipid Research, 47, págs. 681-699 (2006); Patrick J. Kasey, Miguel C. Seabra; Protein Preniltransferases, The Journal of Biological Chemistry, vol. 271, n.º 10, edición del 8 de marzo, págs. 5289-5292 (1996)).

En el presente documento, pueden usarse isoprenoide transferasas de una variedad de fuentes, por ejemplo, seres humanos, animales, plantas, bacterias, virus, y similares. Pueden usarse isoprenoide transferasas que se producen de manera natural. Pueden usarse isoprenoide transferasas modificadas natural o artificialmente. Por ejemplo, una isoprenoide transferasa que tiene al menos una secuencia de aminoácidos cambiada de manera natural (incluyendo modificación postraducciona), una forma natural o artificialmente truncada de una isoprenoide transferasa que se produce de manera natural, una isoprenoide transferasa que se ha modificado mediante al menos una de etiqueta (His), GST, GFP, MBP, CBP, etiqueta lospep, BCCP, etiqueta Myc, etiqueta de calmodulina, etiqueta FLAG, etiqueta HA, etiqueta de proteína de unión a maltosa, etiqueta Nus, etiqueta glutatión-S-transferasa, etiqueta de proteína fluorescente verde, etiqueta de tioredoxina, etiqueta S, Softag 1, Softag 3, etiqueta Strep, etiqueta SBP, etiqueta Ty, y similares.

Las isoprenoide transferasas pueden reconocer un isosustrato así como un sustrato. El isosustrato se refiere a un análogo de sustrato que tiene una modificación en el sustrato. Las isoprenoide transferasas alquilan un determinado resto de aminoácido (por ejemplo, resto de CAAX) en un extremo C-terminal de una proteína (Benjamin P. Duckworth *et al*, ChemBioChem 2007, 8, 98; Uyen T. T. Nguyen *et al*, ChemBioChem 2007, 8, 408; Guillermo R. Labadie *et al*, J. Org. Chem. 2007, 72(24), 9291; James W. Wollack *et al*, ChemBioChem 2009, 10, 2934). Una proteína funcionalizada puede producirse usando una isoprenoide transferasa y un isosustrato a través de alquilación en una(s) cisteína(s) C-terminal(es).

Por ejemplo, el residuo de cisteína de un resto de CAAX C-terminal puede hacerse reaccionar con un isosustrato usando una isoprenoide transferasa. En determinados casos, el AAX puede retirarse luego mediante una proteasa. La cisteína resultante puede metilarse luego en el extremo carboxilo terminal mediante una enzima (Iran M. Bell, J. Med. Chem. 2004, 47(8), 1869).

En el caso de algunas proteínas, pueden producirse la cisteinilación y la glutatiónilación a través de la formación de un enlace de disulfuro debido a la modificación postraducciona. Un enlace disulfuro de este tipo, sin embargo, puede reducirse cuando dicha alquilación se produce mediante isoprenoide transferasas.

Las proteínas descritas en el presente documento pueden fabricarse usando cualquier método de biología molecular o biología celular bien conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse métodos de transfección transitoria. Las secuencias genéticas que codifican para un determinado resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa pueden insertarse en un vector de plásmido conocido usando tecnologías de PCR habituales para expresar una proteína (un fragmento o análogo de la misma) que tiene el determinado resto de aminoácido en un extremo C-terminal del mismo. Como tal, puede expresarse una proteína que tiene al menos un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una transferasa isoprenoide. La proteína expresada puede hacerse reaccionar enzimáticamente con un isosustrato de una isoprenoide transferasa usando la isoprenoide transferasa para producir una proteína funcionalizada. El isosustrato contiene un grupo funcional.

Una vez que se expresa una proteína que tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa, puede hacerse reaccionar enzimáticamente, usando una isoprenoide transferasa y al menos un isosustrato que tiene un primer grupo funcional (FG1), produciendo de ese modo una proteína funcionalizada.

El término "grupo funcional" usado en el presente documento se refiere a un grupo que puede conducir, por ejemplo, a reacciones de cicloadición 1,3 dipolar, reacciones hetero-Diels, reacciones de sustitución nucleófila (por ejemplo, de una reacción de apertura de anillo de un electrófilo heterocíclico tal como epóxido, aziridina, sulfato cíclico y aziridio), reacciones de carbonilo de tipo no aldólico (por ejemplo, formación de éteres de oxima, ureas, tioureas, heterociclos aromáticos, hidrazonas y amidas), adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono, reacciones de oxidación (por ejemplo, epoxidación, aziridinación y adición de haluro de sulfenilo) y química clic. El grupo funcional puede incluir, pero sin limitarse a, una etiqueta fluorescente, un triazol, una maleimida y un radioisótopo (Angew Chem Int. Ed. 2001, 40, 2004-2021; Drug Discovery Today, 2003, 8 (24), 1128-1137; Chem Rev. 2008, 108, 2952-3015) El grupo funcional puede ser un grupo acetileno y un grupo azida.

El grupo funcional puede unirse a una proteína o un agente activo a través de al menos un grupo conector. El grupo conector puede ser un grupo conector lineal. El grupo conector puede ser un grupo conector ramificado. Cuando el enlace es un grupo conector ramificado, los agentes activos pueden unirse a todas las ramas. Cada rama puede tener los mismos o diferentes agentes activos. El grupo conector puede ser escindible. También puede no ser escindible.

Puede producirse un agente activo funcionalizado uniendo un segundo grupo funcional (FG2) a un agente activo. Los ejemplos de agentes activos incluyen, pero no se limitan a, un fármaco, una toxina, un ligando de afinidad, una

sonda de detección o una combinación de los mismos.

Los ejemplos de fármacos incluyen, pero no se limitan a, erlotinib (TARCEVA; Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE; MilleniumPharm.), fulvestrant (FASLODEX; AstraZeneca), Sunitinib (SU11248; Pfizer), letrozol (FEMARA; Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC; Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin; Sanofi), 5-fluorouracilo (5-FU, leucovorina, rapamicina (Sirolimus, RAPAMUNE; Wyet), lapatinib (TYKERB, GSK572016; GlaxoSmithKline), lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006; Bayer Labs.), gefitinib (IRESSA; Astrazeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbococina, meturedopa, y uredopa; etilenimina y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente, bullatacina y bullatacinona); camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (e.g. caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma1 I y caliqueamicina omegal 1 (véase, por ejemplo, Angew Chem Int Ed. ingl., 33: 183-186 (1994)) y dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonato tal como clodronato; esperamicina, cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de enediina de cromoproteínas relacionados, aclacinomisininas, actinomicina, antramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carninomicina, carzinoflina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRLIMYCIN®, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, doxorubicina liposomal y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, pepomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptomigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina y zorrubicina; anti-metabolitos tales como 5-fluorouracil(5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina y tiguana; análogo de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxilfluridina, encitabina y floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano y testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano y trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epitolona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidaina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ('Ara-C'); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) ABRAXANE™, formulación de nanopartículas modificadas por ingeniería genética de albúmina libres de cremóforo de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumber, Ill.), y doxetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; análogos de platino tales como cisplatino, carboplatino; vinblastina; platino; etopósido, ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; NAVELBINE® vinorelbina; Novantrone; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; Celoda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilmitina (DFMO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales, solvatos, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los fármacos adicionales incluyen, pero no se limitan a, (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), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno FAREATON®; (ii) inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regulan la producción de estrógeno en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, letrozol FEMARA® y anastrozol ARIMIDEX®; (iii) antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo de citosina nucleósido de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de aromatasas; (v) inhibidores de proteína cinasas de; (vi) inhibidores de cinasa lipídica; (vii) oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en proliferación celular aberrante, tal como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras; (viii) ribozima, por ejemplo, inhibidor de VEGF tal como ribozima ANGIOZYME e inhibidores de expresión de HER2; (ix) vacunas tales como vacuna de terapia génica; vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN y vacuna VAXID; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de topoisomerasa 1LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; (x) un agente antigogénico tal como bevacizumab (AVASTIN, Genentech); y (xi) sales, solvatos, ácidos, o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Las citoquinas pueden usarse como fármaco. Las citoquinas son pequeñas moléculas de proteína de señalización

celular que son secretadas por numerosas células y son una categoría de moléculas de señalización usadas ampliamente en la comunicación intercelular. Incluyen monoquinas, limpoquinas, hormonas polipeptídicas tradicionales y similares. Los ejemplos de citoquinas incluyen, pero no se limitan a, hormona de crecimiento tal como hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento humana N-metionil y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como la hormona foliculoestimulante (FSH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF- α y TNF- β ; y otros factores de polipéptidos incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citoquina también incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término "toxina" se refiere a una sustancia venenosa producida dentro de células u organismos vivos. Las toxinas pueden ser moléculas pequeñas, péptidos o proteínas que son capaces de producir enfermedades en contacto con o mediante la absorción por parte del tejido corporal que interactúa con macromoléculas biológicas como receptores celulares o de enzimas. Las toxinas incluyen toxinas vegetales y toxinas animales. Los ejemplos de toxinas animales incluyen, pero no se limitan a, antitoxina diftérica, toxina botulínica, antitoxina tetánica, toxina de disentería, toxina del cólera, tetrodotoxina, brevetoxina, ciguatoxina. Los ejemplos de toxinas vegetales incluyen, pero no se limitan a, ricina y toxina AM.

Los ejemplos de toxinas de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, auristatina, geldanamicina (Kerr *et al.*, 1997, Bioconjugate Chem. 8 (6): 781-784), maitansinoides (documento EP 1391213, ACR 2008, 41, 98-107), caliqueamicina (documento US 2009105461, Cancer Res. 1993, 53, 3336-3342), daunomicina, doxorubicina, metotrexato, vindesina, SG2285 (Cancer Res. 2010, 70 (17), 6849-6858), dolastatina, auristatina de análogo de dolastatina (documento US563548603), criptoficina, camptotecina, derivados de rizoxina, análogos o derivados de CC-1065, duocarmicina, antibióticos de enediina, esperamicina, epotilona y toxoides. Las toxinas pueden presentar citotoxicidad y actividad inhibidora del crecimiento celular mediante la unión de tubulina, unión de ADN, supresión de topoisomerasa, y similares.

El término "ligando" se refiere a una molécula que puede formar un complejo con una biomolécula diana. Un ejemplo de un ligando es una molécula que se une a una posición predeterminada de una proteína seleccionada como diana y transmite una señal. Puede ser un sustrato, un inhibidor, un agente estimulante, un neurotransmisor o un radioisótopo.

"Resto detectable" o un "marcador" se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, radiactivos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ^{32}P , ^{35}S , colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, tal como se usa comúnmente en un ensayo de ELISA), biotina-estreptavidina, dioxigenina, haptenos y proteínas para los que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales, o moléculas de ácido nucleico con una secuencia complementaria a una diana. El resto detectable a menudo genera una señal medible, como una señal radiactiva, cromogénica o fluorescente, que puede usarse para cuantificar la cantidad de resto detectable unido en una muestra. La cuantificación de la señal se logra mediante, por ejemplo, recuento de centelleo, densitometría, citometría de flujo, ELISA o análisis directo por espectrometría de masas de péptidos intactos o posteriormente digeridos (puede evaluarse uno o más péptidos). Las personas expertas en la técnica están familiarizadas con las técnicas para marcar compuestos de interés y los medios para la detección. Dichas técnicas y métodos son convencionales y bien conocidos en la técnica.

El término "sonda" tal como se usa en el presente documento se refiere a un material que puede (i) proporcionar una señal detectable, (ii) puede interactuar con una primera sonda o una segunda sonda para modificar una señal detectable proporcionada por la primera o segunda sonda, tal como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), (iii) estabilizar la interacción con un antígeno o un ligando o aumentar la afinidad de unión; (iv) afectar la movilidad de la electroforesis o la actividad de intrusión celular por un parámetro físico como carga, hidrofobia, etc., o (v) controlar la afinidad del ligando, la unión antígeno-anticuerpo o la formación de complejos iónicos.

Una vez que se producen la proteína funcionalizada y el agente activo funcionalizado, se hacen reaccionar entre sí, produciendo de ese modo el conjugado de proteína-agente activo. La reacción entre la proteína funcionalizada y el agente activo funcionalizado puede ser una reacción de química clic o mediante una formación de hidrazona y/u oxima. El FG1 puede ser un grupo azida y el FG2 puede ser un grupo acetileno, o viceversa. El FG1 puede ser un

grupo aldehído o cetona y el FG2 puede ser una hidrazina o hidroxilamina, o viceversa.

5 Las reacciones de química clic se llevan a cabo en una condición suave, lo que hace posible manejar fácilmente las proteínas. La reacción de química clic muestra una especificidad de reacción muy alta. Por tanto, incluso si una proteína tiene otros grupos funcionales (por ejemplo, residuos de la cadena lateral o en un extremo C-terminal o extremo N-terminal), estos grupos funcionales no se ven afectados por la reacción de química clic. Por ejemplo, puede producirse una reacción de química clic entre un grupo acetileno y un grupo azida de una proteína, mientras que otros grupos funcionales de la proteína no se ven afectados por la reacción de química clic. Además, una reacción de química clic puede producirse específicamente sin verse afectada por la clase de ligando involucrado.

10 En algunos casos, el ligando puede seleccionarse para mejorar la eficiencia de reacción global. Por ejemplo, la química clic de azida-acetileno puede producir un triazol con un alto rendimiento (Rhiannon K. Iha *et al*, Chem. Rev. 2009, 109, 5620; Morten Meldal y Christian Wenzel Tornøe, Chem Rev., 2008, 108, 2952; Hartmuth C. Kolb *et al*, Angew. Chemie Int. Ed. ingl., 2001, 40, 2004).

15 Los grupos azida y acetileno son grupos funcionales que no existen en las secuencias de aminoácidos de las proteínas que se producen de manera natural. Si se produce una reacción de conjugación utilizando estos grupos funcionales, ninguno de los residuos de la cadena lateral y ninguno de los grupos funcionales N-terminal o C-terminal se ven afectados por la reacción de química clic. Por consiguiente, puede producirse un conjugado de proteína-agente activo en el que se conjuga un agente activo en una posición o posiciones diana.

20 Cuando la proteína es un anticuerpo, todo o una parte del anticuerpo puede reducirse a una cadena única durante la alquilación mediante una isoprenoide transferasa. La cadena única puede oxidarse para formar un anticuerpo de forma H₂L₂ debido a un oxidante usado en la reacción de química clic.

25 Como el anticuerpo tiene 4 cadenas (2H + 2L), puede realizarse la alquilación en las posiciones 1-4 por anticuerpo. El número de agentes activos puede ser más de 4 ya que pueden unirse una pluralidad de los agentes activos a un grupo conector.

30 Cuando el resto de aminoácido que puede ser reconocido por la isoprenoide transferasa es CAAX, el método puede incluir además retirar el AAX. El método puede incluir además un grupo metilo en el extremo C-terminal después de retirar AAX (Journal of Lipid Research, 2006, 47, 681-699).

Ejemplo de Método 2

35 Un método para preparar un conjugado de proteína-agente activo tal como se describe en el presente documento comprende: (a) expresar una proteína que tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa; (b) unir un isosustrato de una isoprenoide transferasa a un agente activo; y (c) hacer reaccionar enzimáticamente, usando la isoprenoide transferasa, la proteína expresada con el agente activo unido al isosustrato.

40 En el presente documento, una vez que se expresa una proteína que tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa, se hace reaccionar la proteína con un agente activo unido a un isosustrato de la isoprenoide transferasa. En este caso, puede producirse la conjugación de tiol-maleimida. Sin embargo, incluso si se produce la conjugación de tiol-maleimida, los agente activos se conjugan en las posiciones seleccionadas como diana solo según la presente divulgación. Por consiguiente, se evita un problema asociado con la técnica anterior, que se produzca una mezcla no homogénea.

45

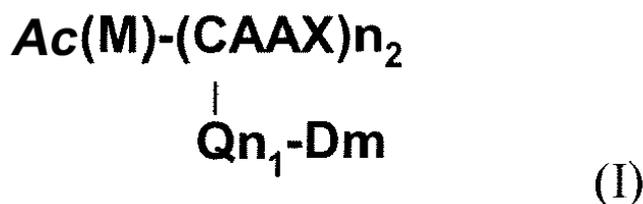
2. Conjugados de proteína-agente activo

50 Se describe también en el presente documento un conjugado de proteína-agente activo que comprende una proteína que tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa, en el que el agente activo se une covalentemente a la proteína en el resto de aminoácido.

55 Un experto habitual en la técnica es capaz de seleccionar fácilmente una proteína que se una de manera selectiva a una diana de interés (por ejemplo, una célula diana en un sujeto). Los ejemplos de proteína incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos o fragmentos de un antígeno que se unen específicamente a la diana de interés.

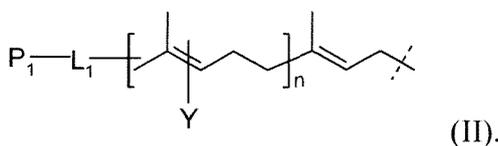
Proteína CAAX (anticuerpo CAAX)

60 Un ejemplo de un conjugado de proteína-agente activo preparado mediante un método tal como se describe en el presente documento está representado por la siguiente fórmula (I), en la que la proteína es un anticuerpo (fragmento o análogo del mismo) (Ac), el agente activo es un fármaco (D), y el resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa es CAAX.



5 Ac(M) representa que el anticuerpo o fragmento del mismo puede comprender una modificación. La modificación puede ser (i) una delección en el extremo carboxilo terminal del anticuerpo o fragmento del mismo; (ii) una adición de oligopéptido o polipéptido en el extremo carboxilo terminal del anticuerpo o fragmento del mismo; y (iii) una delección en el extremo carboxilo terminal del anticuerpo o fragmento del mismo y una adición de oligopéptido o polipéptido en el extremo carboxilo terminal del anticuerpo o fragmento del mismo. Q representa un grupo conector. El grupo conector puede ser un grupo conector lineal o un grupo conector ramificado. El grupo conector puede incluir un primer grupo funcional (FG1). n_1 , n_2 y m pueden determinarse de manera apropiada dependiendo del anticuerpo, el resto de aminoácido, el grupo conector, el agente activo, etc. Preferiblemente, n_1 y n_2 son independientemente un número entero de 1 a 4 y m es un número entero de 1 a 16.

10 El grupo conector puede representarse mediante la siguiente fórmula (II):



15 P_1 e Y son independientemente un grupo que contiene un primer grupo funcional (FG1). El FG1 puede seleccionarse del grupo que consiste en: acetileno, azida, aldehído, hidroxilamina, hidrazina, cetona, nitrobenzofurazano (NBD), dansilo, fluoresceína, biotina y rodamina. L_1 es $(\text{CH}_2)_r\text{X}_q(\text{CH}_2)_p$, en la que X es oxígeno, azufre, $-\text{NR}_1-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_1-$, $-\text{NR}_1\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}_1\text{SO}_2-$, $-\text{SO}_2\text{NR}_1-$, $-(\text{CH}=\text{CH})-$ o acetileno; R_1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -arilo o alquil C_{1-6} -heteroarilo; r y p son independientemente un número entero de 0 a 6; q es un número entero de 0 a 1; y n es un número entero de 1 a 4.

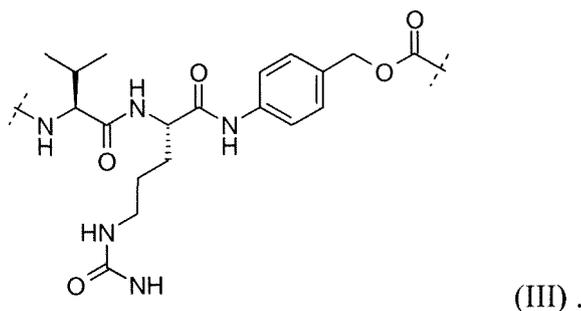
20 El fármaco (D) puede unirse al grupo conector a través de un grupo que contiene un segundo grupo funcional (FG2) que puede reaccionar con el FG1. El FG2 puede seleccionarse del grupo que consiste en: acetileno, hidroxilamina, azida, aldehído, hidrazina, cetona y amina.

25 El fármaco (D) puede unirse al grupo que contiene un FG2 a través de $-(\text{CH}_2)_r\text{X}_q(\text{CH}_2)_p-$ o $-\text{[ZCH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_w\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Z]}-$, en el que X es oxígeno, azufre, $-\text{NR}_1-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_1-$, $-\text{NR}_1\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}_1\text{SO}_2-$ o $-\text{SO}_2\text{NR}_1-$; Z es oxígeno, azufre o NR_1 ; R_1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -arilo o alquil C_{1-6} -heteroarilo; r y p son independientemente un número entero de 0 a 6; q es un número entero de 0 a 1; y w es un número entero de 0 a 6.

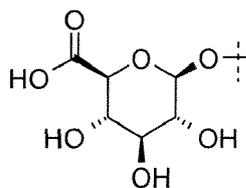
30 (i) Un(os) péptido(s) que puede(n) escindirse por catepsina B o (ii) un glucurónido que puede escindirse por β -glucuronidasa puede unirse al $-(\text{CH}_2)_r\text{X}_q(\text{CH}_2)_p-$ o $-\text{[ZCH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_w\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Z]}-$.

35 Un grupo no autoinmolativo o un grupo autoinmolativo puede unirse a (i) el/los péptido(s) que puede(n) escindirse por catepsina B o (ii) el glucurónido que puede escindirse por β -glucuronidasa. Los ejemplos no limitativos del grupo autoinmolativo pueden ser aminofenilmetiloxycarbonilo y hidroxifenilmetiloxycarbonilo.

40 El péptido que puede escindirse por catepsina B puede representarse mediante la siguiente fórmula (III):



45 El glucurónido que puede escindirse por β -glucuronidasa puede representarse mediante la siguiente fórmula (IV):



(IV).

3. Composiciones

5 Se describen también en el presente documento composiciones que comprenden un conjugado de proteína-agente activo descrito en el presente documento. Las composiciones pueden usarse para administrar un agente activo a una célula diana en un sujeto. Las composiciones pueden usarse para tratar a un sujeto que lo necesita (es decir, que necesita el agente activo).

10 La preparación de tales composiciones se conoce por un experto en la técnica, y tales composiciones pueden administrarse *in vivo* a un sujeto.

15 En aspectos, las composiciones se preparan en una forma inyectable, o bien como una disolución líquida o como una suspensión. Las formas sólidas adecuadas para inyección también pueden prepararse como emulsiones, o con los polipéptidos encapsulados en liposomas. Los conjugados de proteína-agente activo pueden combinarse con un portador farmacéuticamente aceptable, que incluye cualquier portador que no induce la producción de anticuerpos dañinos para el sujeto que recibe el portador. Los portadores adecuados normalmente comprenden grandes macromoléculas que se metabolizan lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados lipídicos, y similares. Tales portadores son bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 Las composiciones tal como se describen en el presente documento también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol. También pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias de tamponamiento de pH, y similares. Pueden formularse proteínas en la vacuna como formas neutras o de sal. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral, mediante inyección; tal inyección puede ser o bien por vía subcutánea o bien por vía intramuscular. Las formulaciones adicionales son adecuadas para otras formas de administración, tales como mediante supositorio o por vía oral. Las composiciones orales pueden administrarse como una disolución, una suspensión, un comprimido, una píldora, una cápsula, o una formulación de liberación sostenida.

25 Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosis. La composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del conjugado de proteína-agente activo. Por una cantidad terapéuticamente eficaz se entiende una dosis única, o una composición administrada en un esquema de dosis múltiples, que es eficaz para el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno. La dosis administrada variará, dependiendo del sujeto que va a tratarse, la salud y el estado físico del sujeto, el grado de protección deseado y otros factores relevantes. Las cantidades precisas del principio activo requerido dependerán del juicio del médico.

4. Métodos de uso de conjugados de proteína-agente activo y composiciones

40 Se describe también en el presente documento un método para administrar un agente activo a una célula diana en un sujeto, comprendiendo el método administrar el conjugado de proteína-agente activo o la composición. En todavía un aspecto adicional, también se describe en el presente documento un método de tratamiento de un sujeto que lo necesita (es decir, un sujeto que necesita el agente activo), comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del conjugado de proteína-agente activo o una composición que comprende el conjugado al sujeto.

45 Un conjugado de proteína-agente activo (por ejemplo, conjugado anticuerpo-fármaco) o una composición que comprende el conjugado en una cantidad terapéuticamente eficaz puede administrarse a un paciente que padece de un cáncer o tumor para tratar el cáncer o tumor.

50 Un conjugado de proteína-agente activo (por ejemplo, conjugado anticuerpo-fármaco) o una composición que comprende el conjugado en una cantidad terapéuticamente eficaz puede administrarse a un paciente para tratar o prevenir una infección mediante un agente patógeno (por ejemplo, un virus, una bacteria, un hongo, un parásito, y similares). Tales métodos incluyen la etapa de administración al mamífero de una cantidad terapéutica o profiláctica de una cantidad del conjugado suficiente para tratar la enfermedad o el trastorno o el síntoma del mismo, en condiciones tales que se previene o trata la enfermedad o el trastorno.

55 El conjugado de proteína-agente activo o la composición puede administrarse en forma de una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable sal o solvato del mismo. Puede administrarse con un portador farmacéuticamente

aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un aditivo farmacéuticamente aceptable. La cantidad farmacéuticamente eficaz y el tipo de sal o solvato, excipiente y aditivo farmacéuticamente aceptable puede determinarse usando métodos habituales (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18ª edición, 1990).

5 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" con respecto a un cáncer o tumor significa una cantidad que puede disminuir el número de células cancerosas; disminuye el tamaño de las células cancerosas; impide que las células cancerosas se introduzcan en los sistemas periféricos o disminuye la intrusión; impide que las células cancerosas se propaguen a otros sistemas o disminuye la propagación; impide que las células cancerosas crezcan; y/o alivia al menos un síntoma relacionado con el cáncer. En el tratamiento de un cáncer, la eficacia de un fármaco puede evaluarse por el tiempo con respecto a la progresión tumoral (TTP) y/o la tasa de respuesta (RR).

10 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" con respecto a la infección mediante un agente patógeno significa una cantidad que puede prevenir, tratar o reducir los síntomas asociados con la infección.

15 El término "sales farmacéuticamente aceptables" usado en el presente documento incluye sales orgánicas y sales inorgánicas. Los ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, pantonato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucoronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilénbis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede incluir otra molécula (por ejemplo, iones acetato, iones succinato y otros contraiones, etc.). También puede incluir al menos un átomo cargado. También puede incluir al menos un contraión.

20 Los solvatos de ejemplo que pueden usarse para solvatos farmacéuticos aceptables de los compuestos tal como se describen en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, etilacetato, ácido acético y etanolamina.

30 Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no pretenden limitar a la misma.

Ejemplo 1: preparación de Ac(M)-CAAX

35 1-1. Construcción, expresión y purificación de Herceptin-CAAX

Se generaron anticuerpos Herceptin modificados usando tecnología de ADN recombinante y protocolos de clonación de PCR convencionales con plásmido de HC pNATABH::Herceptin o plásmido de LCpNATABL::Herceptin. Los plásmidos recombinantes se expresaron en una línea celular HEK293E mediante transfección transitoria. Los anticuerpos se separaron y se purificaron mediante cromatografía en columna de afinidad a la proteína A.

Construcción de Herceptin-HC-GCVIM y Herceptin-LC-GCVIM

45 Se generaron anticuerpos Herceptin modificados usando protocolos de clonación de PCR convencionales. De manera general, los plásmidos de Herceptin-HC-GCVIM y Herceptin-LC-GCVIM se construyeron insertando una secuencia de ADN que codifica para un resto de CAAX (por ejemplo, GCVIM, G₅CVIM, G₇CVIM, G₁₀CVIM o G₁₀CVLL), al extremo C-terminal de la cadena pesada o cadena ligera codificada en el plásmido de HC pNATABH::Herceptin o de LC pNATABL::Herceptin.

50 Por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de SacII está presente en el aminoácido 172 en el extremo C-terminal de la región IgG1-Fc humana. Por consiguiente, se diseñó un cebador directo para unir el sitio de SacII en la región Fc. La secuencia de ADN que va a insertarse (por ejemplo, la secuencia de 5 residuos de GCVIM que codifica para 15 residuos) se añadió a un cebador inverso específico para el extremo C-terminal de Fc. Los cebadores directo e inverso se usaron para amplificar un producto de PCR, y el producto resultante se purificó usando un kit de purificación de PCR. Cuando el cebador inverso contenía un sitio XhoI, se digirió el producto de PCR con SacII y XhoI. De la misma manera, se digirió el plásmido de HC de pNATABH::Herceptin con SacII y XhoI. La estructura principal digerida se purificó usando un kit de purificación en gel y se ligó con el producto de PCR digerido. El ligamiento se realizó ajustando de manera apropiada la razón del vector con respecto al inserto, y el producto de ligadura se transformó en células bacterianas competentes para cribado. Los plásmidos Herceptin-HC-GCVIM y Herceptin-LC-GCVIM se prepararon a partir de clones secuenciados.

60 Las secuencias de aminoácidos de los plásmidos resultantes se muestran en las figuras 1-10. Las secciones 1-4 y 1-7 a continuación proporcionan una descripción detallada de cada uno de los constructos.

65

Expresión y purificación de Herceptin-HC-GCVIM y Herceptin-LC-GCVIM

Se cultivaron células E HEK293 en medio DMEM/FBS al 10% en placas de 150 mm (n.º 430599, Corning EE.UU.) hasta una confluencia del 70~80%. Se mezclaron 13 µg de ADN y 26 µg de PEI (n.º 23966, Polisciences, EE.UU.) en una razón de 1:2, se incubaron a TA durante aproximadamente 20 minutos, y luego se añadieron a las células HEK193E. Después de 16-20 horas, se reemplazó el medio con medio sin suero (DMEM sin FBS (n.º SH30243.01, Hyclone Thermo., EE.UU.)) y se recogió el sobrenadante cada dos o tres días.

Los sobrenadantes se filtraron con un filtro superior de 0,22 µm (n.º PR02890, Millipore, EE.UU.) y luego se unieron a 500 µl de perla de proteína A (n.º 17-1279-03, GE healthcare Suecia) empaquetada en una columna de 5 ml. Usando una bomba peristáltica, se realizó la unión durante la noche a 0,9 ml/min a 4°C. Se lavó la columna con 100 ml o más de PBS (n.º 70011, Gibco, EE.UU.). Luego se eluyó la proteína unida con glicina-HCl 0,1 M (n.º G7126, Sigma, EE.UU.) en 6 fracciones y se neutralizó con Tris 1 M (n.º T-1503, Sigma, EE.UU.) (pH 9,0). Se cuantificó la proteína. Se recogieron 2 ó 3 fracciones que contenían la proteína y se concentraron con unidades de filtro Amicon Ultra (n.º UFC805024, Millipore, EE.UU.). Se cambió el tampón aproximadamente 10 veces con PBS 1x (n.º 70011, Gibco, EE.UU.). Se confirmó que el producto de proteína era Herceptin-HC-GCVIM o Herceptin-LC-GCVIM mediante inmunotransferencia de tipo Western. Para identificar una banda de proteína que contenía Herceptin, se usó anti-IgG Fc humana de cabra (n.º 31413, Pierce, EE.UU.) conjugada con peroxidasa ImmunoPure. Tras la purificación, se obtuvieron 1-2 mg de Herceptin-HC-GCVIM o Herceptin-LC-GCVIM a partir de 1 l de medio de cultivo celular.

Los productos Herceptin-HC-GCVIM y Herceptin-LC-GCVIM se analizaron también con un bioanalizador Agilent. De manera breve, se analizaron 8 µl de muestra de proteína purificada (aproximadamente 1 mg/ml) usando el kit Protein 230 de Agilent (5067-1515 Agilent Technologies, EE.UU.). Se separó la muestra de proteína en 2 fracciones (4 µl cada una). Se añadieron 2 µl de tampón no reductor o de tampón reductor a cada muestra. Se calentó la muestra a 95-100°C durante 5 minutos y se enfrió con hielo hasta 4°C. Después de la centrifugación, se añadieron 84 µl de agua desionizada a la muestra y se temporizó y se agitó con vórtex. Después, se cargó la muestra y se analizó con el kit según las instrucciones del fabricante.

1-2. Construcción, expresión y purificación de anti cMET-CAAX

Se prepararon también anticuerpos anti cMET-CAAX modificados mediante los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, se generaron anticuerpos anti cMET-CAAX modificados usando tecnología de ADN recombinante y protocolos de clonación de PCR convencionales con plásmido pPMC-C1A5. Se expresaron los plásmidos recombinantes en una línea celular HEK293T mediante transfección transitoria. Se separaron y se purificaron los anticuerpos mediante cromatografía en columna de afinidad a la proteína A.

1-3. Herceptin-HC-G_nCVIM

Se prepararon anticuerpos Herceptin-HC-GCVIM, Herceptin-HC-G₅CVIM, Herceptin-HC-G₇CVIM y Herceptin-HC-G₁₀CVIM. Los anticuerpos, respectivamente, tienen una secuencia de (GCVIM) de 5 residuos, (G₅CVIM) de 9 residuos, (G₇CVIM) de 11 residuos o (G₁₀CVIM) de 14 residuos en el extremo C-terminal de la cadena pesada (figuras 1, 3, 5 y 7).

1-4. Herceptin-LC-G_nCVIM

Se prepararon anticuerpos Herceptin-LC-GCVIM, Herceptin-LC-G₅CVIM, Herceptin-LC-G₇CVIM y Herceptin-LC-G₁₀CVIM. Los anticuerpos, respectivamente, tienen una secuencia de (GCVIM) de 5 residuos, (G₅CVIM) de 9 residuos, (G₇CVIM) de 11 residuos o (G₁₀CVIM) de residuos en el extremo C-terminal de la cadena ligera (figuras 2, 4, 6 y 8).

1-5. Herceptin-HC-G₁₀CVLL

Se preparó un anticuerpo Herceptin-HC-G₁₀CVLL. El anticuerpo tiene una secuencia de (G₁₀CVLL) de 14 residuos en el extremo C-terminal de la cadena pesada (figura 9).

1-6. Herceptin-LC-G₁₀CVLL

Se preparó un anticuerpo Herceptin-LC-G₁₀CVLL. El anticuerpo tiene una secuencia de (G₁₀CVLL) de 14 residuos en el extremo C-terminal de la cadena ligera (figura 10).

1-7. Anti cMET-HC-G_nCVIM

Se prepararon anticuerpos anti cMET-HC-G₇CVIM y anti cMET-HC-G₁₀CVIM. Los anticuerpos, respectivamente, tienen una secuencia de (G₇CVIM) de 11 residuos o (G₁₀CVIM) de 14 residuos en el extremo C-terminal de la cadena pesada (no mostrada). La figura 11 muestra un gel de SDS-PAGE que analiza los anticuerpos anti cMET-

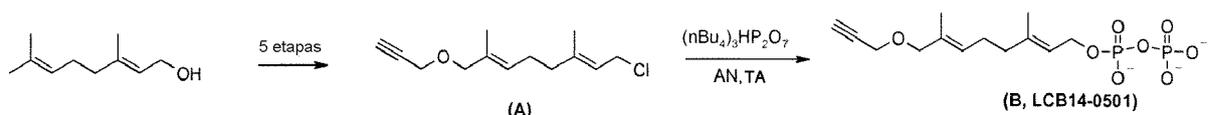
HC-G₇CVIM y anti cMET-HC-G₁₀CVIM

1-8. Anti cMET-LC-G_nCVIM

- 5 Se prepararon anticuerpos anti cMET-LC-G₇CVIM y anti cMET-LC-G₁₀CVIM. Los anticuerpos, respectivamente, tienen una secuencia de (G₇CVIM) de 11 residuos o (G₁₀CVIM) de 14 residuos en el extremo C-terminal de la cadena ligera (no mostrada). La figura 11 muestra un gel de SDS-PAGE que analiza los anticuerpos anti cMET-LC-G₇CVIM y anti cMET-LC-G₁₀CVIM.

10 Ejemplo 2: funcionalización de AC(M)-CAAX

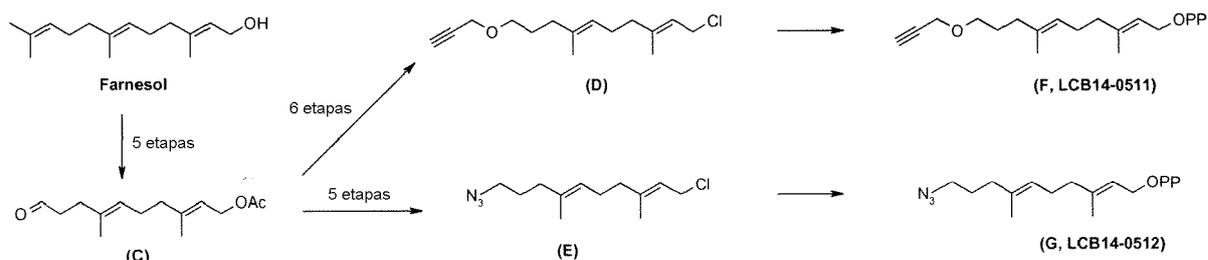
2-1. Difosfato de alquino geranilo (B, LCB14-0501)



- 15 Se preparó el compuesto referenciado anteriormente en 6 etapas con geraniol como material de partida mediante un método similar al método descrito en ChemBioChem 207, 8, 98-105.

(B): ¹H RMN (600 MHz, D₂O) δ 5,38 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 5,30 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 4,31 (s a, 2H), 3,96 (m, 2H), 3,84 (s, 2H), 2,70 (s a, 1H), 2,07 (m, 2H), 1,98 (m, 2H), 1,56 (s, 3H), 1,48 (s, 3H)

20 2-2. Difosfato de decadienilo propargil éter de (F, LCB14-0511) y difosfato de azida de decadienilo (G, LCB14-0512)



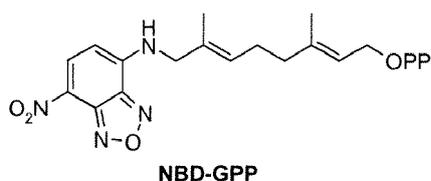
- 25 Se preparó aldehído de acetoxidodecadienilo (C) a partir de farnesol en 5 etapas. A partir del compuesto (C), se prepararon los compuestos (D) y (E) en 6 etapas y 5 etapas, respectivamente. A partir de los compuestos (D) y (E), se prepararon los compuestos referenciados anteriormente (F) y (G) mediante un método similar al método descrito en la sección 2-1 anterior. Los compuestos (C), (D) y (E) se prepararon mediante un método similar al método descrito en JOC 2007, 72 (24), 9291-9297.

30 (F): ¹H RMN (600 MHz, D₂O) δ 5,44 (t, J = 6 Hz, 1H), 5,22 (t, J = 6 Hz, 1H), 4,46 (t, J = 8,4 Hz, 2H), 4,16 (t, J = 2,4 Hz, 2H), 3,55 (m, 2H), 2,85 (m, 1H), 2,15 (m, 2H), 2,09 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,03 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,70-1,65 (m, 5H), 1,60 (s, 3H)

35 (G): ¹H RMN (600 MHz, D₂O) δ 5,43 (t, J = 6,6 Hz, 1H), 5,23 (t, J = 6,6 Hz, 1H), 4,40 (t, J = 6 Hz, 2H), 3,26 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 2,15 (m, 2H), 2,10-2,04 (m, 4H), 1,70~1,65 (m, 5H), 1,60 (s, 3H)

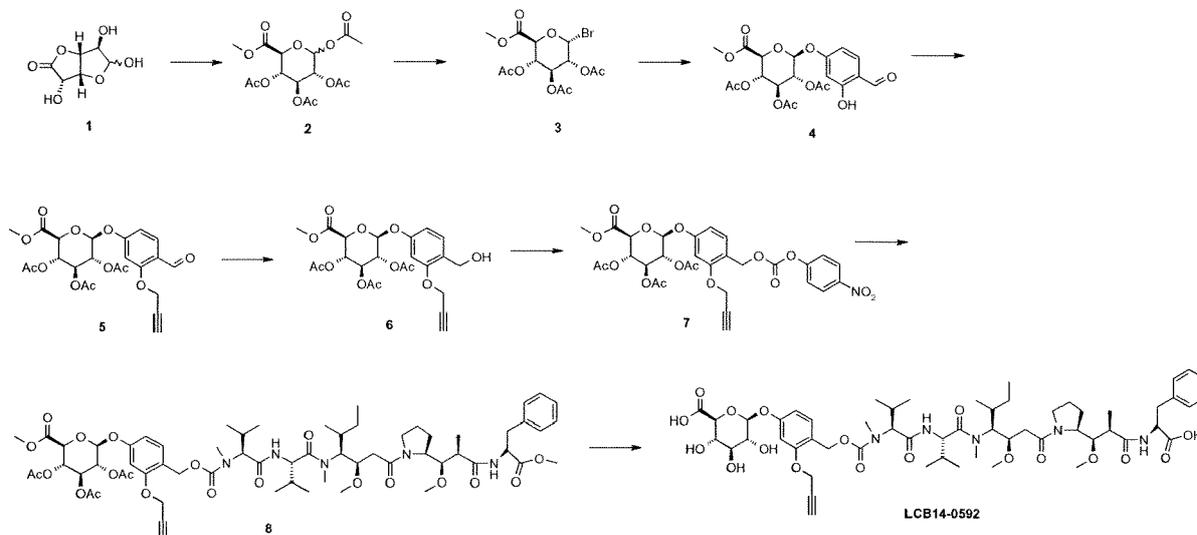
2-3. NBD-GPP

- 40 Se preparó [3,7-dimetil-8-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ilamino)-octa-2,6-dieno-1]pirofosfato de tris-amonio (NBD-GPP) mediante un método similar al método descrito en JACS 2006, 128, 2822-2835.



45 ¹H RMN (600 MHz, D₂O) δ 8,51 (d, J = 9 Hz, 1H), 6,37 (d, J = 9 Hz, 1H), 5,50 (t, J = 6,6 Hz, 1H), 5,42 (t, J = 6,6 Hz, 1H), 4,43 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 4,08 (s, 2H), 2,22 (m, 2H), 2,10 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,69 (s, 6H)

2-4. Grupo conector de glucurónido-MMAF (LCB14-0592)

5 Compuesto 2

A una disolución de D-glucurono-6,3-lactona (19 g, 107,88 mmol) en metanol (250 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se le añadió lentamente una disolución de NaOH (100 mg) en metanol (100 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Se añadió una disolución de NaOH (200 mg) en metanol (15 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas. Se retiró el metanol a presión reducida. A 10°C o menos, se añadieron de manera secuencial piridina (50 ml) y anhídrido acético (Ac₂O, 54 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de completarse la reacción, se concentró la mezcla resultante a presión reducida, y se sometió a cromatografía en columna para dar el compuesto 2 (20 g, 50%) como un sólido.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 5,77 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 5,31 (t, J= 9,6 Hz, 1H), 5,24 (t, J= 9,6 Hz, 1H), 5,14 (m, 1H), 4,17 (d, J= 9 Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,12 (s, 3H), 2,04 (m, 9H)

Compuesto 3

Se añadió el compuesto 2 (5 g, 13,28 mmol) a una disolución de HBr al 33% en AcOH (20 ml) a 0°C. Se agitó la mezcla resultante durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, se diluyó la mezcla resultante mediante tolueno (50 ml). Se concentró la mezcla resultante a presión reducida. Se añadieron acetato de etilo (100 ml) y disolución de NaHCO₃ saturada (100 ml) para extraer una fase orgánica. Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro para dar el compuesto 3 (5,27 g, 100%).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 6,64 (d, J= 3,6 Hz, 1H), 5,61 (t, J= 3,6 Hz, 1H), 5,24 (t, J= 3,6 Hz, 1H), 4,85 (m, 1H), 4,58 (d, J= 10,2 Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,05 (s, 3H)

Compuesto 4

Se trató de manera secuencial una disolución del compuesto 3 (4 g, 10,07 mmol) y 2,4-dihidroxibenzaldehído (1,67 g, 12,084 mmol) en acetonitrilo (30 ml) con tamiz molecular (5 g) y Ag₂O (9,33 g, 40,28 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, se separó por filtración el sólido y se concentró el filtrado a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 4 (2 g, 43,5%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 11,38 (s, 1H), 9,77 (s, 1H), 7,48 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 6,61 (dd, J= 8,4, 2,0 Hz, 1H), 6,53 (d, J= 2,0 Hz, 1H), 5,36-5,25 (m, 4H), 4,23 (m, 1H), 3,73 (s, 1H), 2,06 (s, 9H)

40 Compuesto 5

Se trató una disolución del compuesto 4 (1 g, 2,20 mmol) en acetona (10 ml) con carbonato de potasio (760 mg, 5,50 mmol) y bromuro de propargilo al 80% en tolueno (735 μl, 6,60 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 45°C durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 5 (930 mg, 87%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 10,33 (s, 1H), 7,83 (d, $J=9$ Hz, 1H), 6,75 (d, $J=1,8$ Hz, 1H), 6,67 (dd, $J=9, 1,8$ Hz, 1H), 5,39~5,34 (m, 2H), 5,31~5,26 (m, 2H), 4,79 (d, $J=2,4$ Hz, 2H), 4,23 (m, 2H), 3,72 (s, 3H), 2,59 (t, $J=2,4$ Hz, 1H), 2,07 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,05 (s, 3H)

5 Compuesto 6

Se trató de manera secuencial una disolución del compuesto 5 (930 mg, 1,88 mmol) en alcohol isopropílico (2 ml) y cloroformo (10 ml) a 0°C con gel de sílice (5 g) y NaBH_4 (178 mg, 4,79 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se separó por filtración el gel de sílice. Se extrajo la reacción con diclorometano (100 ml) y agua destilada (100 ml), se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a vacío. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 6 (610 mg, 65%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,23 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 6,72 (d, $J=2,4$ Hz, 1H), 6,61 (dd, 8,4, 2,4 Hz, 1H), 5,35~5,32 (m, 2H), 5,27 (m, 1H), 5,13 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 4,72 (d, $J=2,4$ Hz, 2H), 4,63 (d, $J=5,4$ Hz, 2H), 4,17 (m, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,04 (s, 3H)

15 Compuesto 7

Se trató una disolución del compuesto 6 (250 mg, 0,50 mmol) en dimetilformamida (0,5 ml) con carbonato de bis(4-nitrofenilo) (308 mg, 100 mmol) y diisopropiletilamina (DIPEA, 132 μl , 0,75 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se concentró la reacción a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 7 (310 mg, 94%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 8,26 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7,37 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7,34 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 6,77 (d, $J=1,8$ Hz, 1H), 6,64 (dd, 7,8, 2,4 Hz, 1H), 5,37~5,33 (m, 2H), 5,30~5,27 (m, 3H), 5,17 (d, $J=7,2$ Hz, 1H), 4,74 (d, $J=2,4$ Hz, 2H), 4,18 (m, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,54 (t, $J=2,4$ Hz, 1H), 2,07 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,04 (s, 3H)

25 Compuesto 8

30 A una disolución del compuesto 7 (150 mg, 0,227 mmol), MMAF-OMe (169,6 mg, 0,227 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol anhidro (HOBT, 6,2 mg, 0,0454 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se le añadieron piridina (0,8 ml) y diisopropiletilamina (40 μl , 0,227 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 8 (146 mg, 50%).

35 IE-EM m/z: 1067(M^+)

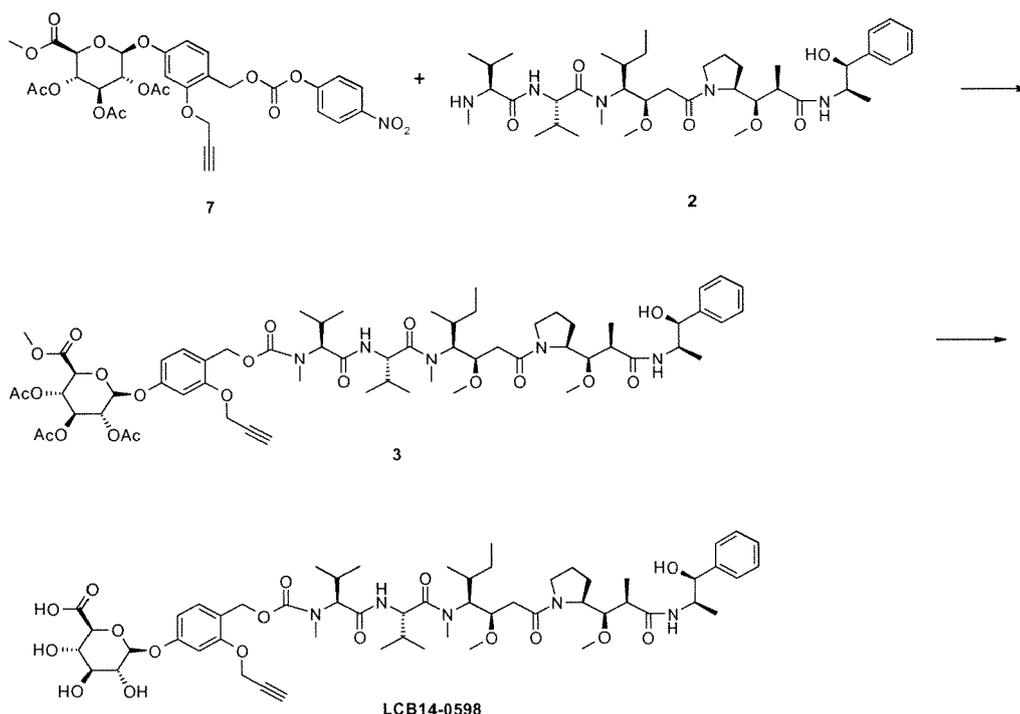
40 Se preparó MMAF-OMe según los métodos descritos en el documento US61/483.698, ChemPharmBull, 1995, 43 (10), 1706-1718, el documento US7423116, el documento US7498298 y el documento WO2002/088172.

LCB14-0592

45 Se trató una disolución del compuesto 8 (85 mg, 0,067 mmol) en metanol (2 ml) a 0°C con una disolución de LiBH_4 (28,2 mg, 0,670 mmol) en agua destilada (1 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se retiró el metanol a presión reducida. Se disolvió el residuo en agua destilada (50 ml) y se acidificó con ácido acético hasta $\text{pH} = 3$. Se extrajo la reacción tres veces con diclorometano (3 x 50 ml). Se concentró la fase orgánica combinada a presión reducida para dar un sólido que se lavó con dietil éter (50 ml) para proporcionar el compuesto LCB14-0592 (62 mg, 83%).

50 IE-EM m/z: 1112(M^+)

2-5. Grupo conector de glucurónido-MMAE (LCB14-0598)

**Compuesto 3**

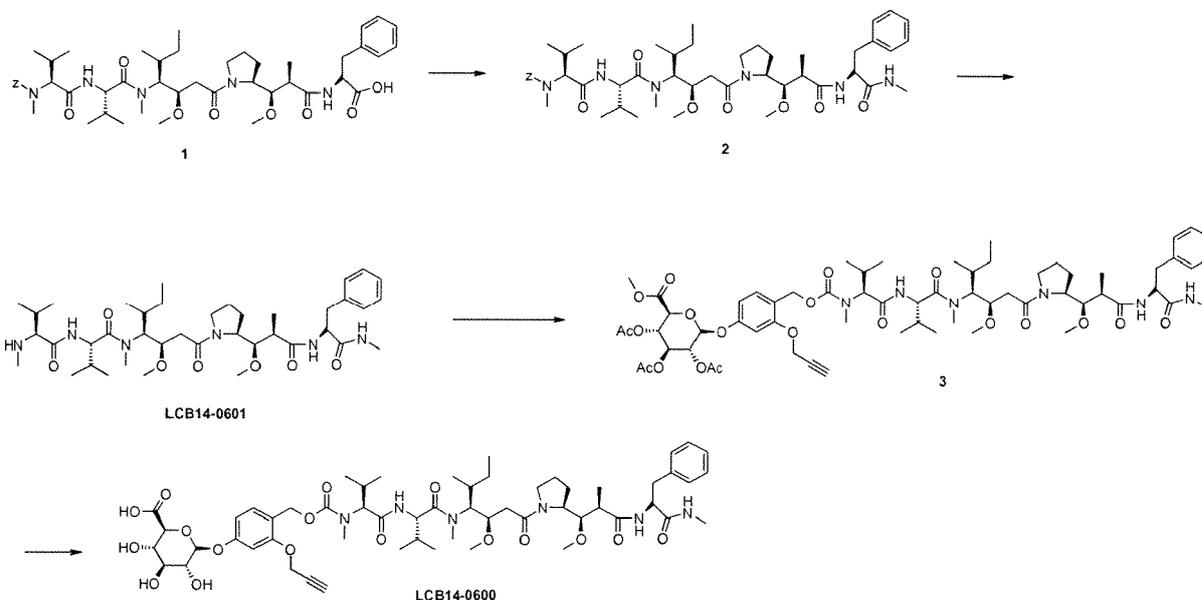
- 5 Se trató una disolución del compuesto 7 del ejemplo 2-4 (150 mg, 0,227 mmol), MMAE (163 mg, 0,227 mmol; ChemPharm- Bull, 1995, 43 (10), 1706-1718, documento US7423116, documento WO2002/088172) y 1-hidroxibenzotriazol anhidro (HOBt, 6,2 mg, 0,0454 mmol) en dimetilformamida (3 ml) con piridina (0,8 ml) y diisopropiletilamina (40 μ l, 0,227 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 24 horas. Después de completarse la reacción, se diluyó la mezcla resultante con acetato de etilo (100 ml), HCl 0,5 N (10 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 3 (30 mg, 10%).

IE-EM m/z: 1238(M⁺)**15 LCB 14-0598**

- 20 Se trató una disolución del compuesto 3 (30 mg, 0,024 mmol) en metanol (3 ml) a 0°C con LiOH (10 mg, 0,24 mmol) en agua destilada (0,5 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, se retiró el disolvente orgánico a presión reducida. Se diluyó el producto resultante con agua destilada (50 ml) y se acidificó con HCl 0,5 N hasta pH = 3. La extracción con diclorometano (50 ml) seguida por concentración a presión reducida dieron el compuesto LCB14-0598 (21 mg, 79%).

IE-EM m/z: 1098(M⁺)

- 25 2-6. Grupo conector de glucurónido-MMAF-metil amida (LCB14-0600)



Compuesto 2

- 5 Se trató una disolución del compuesto 1 (Z-MMAF, 558 mg, 0,644 mmol, ChemPharmBull, 1995, 43 (10), 1706-1718) en dimetilformamida (5 ml) con clorhidrato de metilamina (130 mg, 1,932 mmol), dietilcianofosfonato (DEPC, 144 mg, 0,966 mmol) y trietilamina (270 μ l, 1,932 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 2 (490 mg, 86%).

IE-EM m/z: 879(M⁺)

LCB14-0601 (MMAF-metilamida)

- 15 Se disolvió el compuesto 2 (470 mg, 0,53mM) en *terc*-butanol (^tBuOH, 8 ml) y agua destilada (0,8 ml). A 0°C, se añadió Pd al 10%/C (50 mg). Se agitó la mezcla resultante en gas H₂ durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se filtró el Pd/C usando Celite. Se concentró la disolución filtrada resultante a presión reducida para dar el compuesto LCB14-0601 (340 mg, 85%).

20 IE-EM m/z: 745(M⁺)

Compuesto 3

- 25 Se trató una disolución del compuesto 7 del ejemplo 2-4 (133 mg, 0,20 mmol), LCB14-601 (150 mg, 0,20 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol anhidro (HOBt, 5,44 mg, 0,04 mmol) en dimetilamida (3 ml) con piridina (0,8 ml) y diisopropiletilamina (DIPEA, 35 μ l, 0,20 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y disolución de HCl 0,5 N (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 3 (123 mg, 48%).

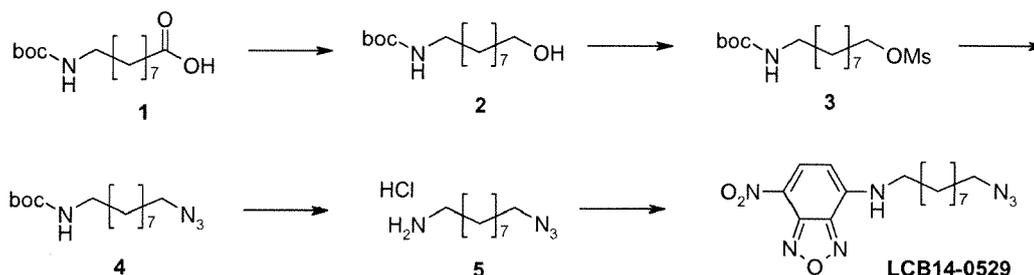
30 IE-EM m/z: 1265(M⁺)

LCB 14-0600 (grupo conector de glucurónido-MMAF-metilamida)

- 35 Se trató una disolución del compuesto 3 (60 mg, 0,047 mmol) en metanol (3 ml) a 0°C con LiOH (20 mg, 0,47 mmol) en agua destilada (0,5 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se eliminó el disolvente orgánico a presión reducida. Se diluyó el residuo con agua destilada (50 ml) y se acidificó con HCl 0,5 N hasta pH = 3. La extracción con diclorometano (50 ml) seguida por
- 40 concentración a presión reducida dieron el compuesto LCB 14-0600 (25 mg, 47%).

IE-EM m/z: 1125(M⁺)

2-7. Azida-grupo conector-NBD: LCB14-0529

5 Compuesto 2

Se trató lentamente una disolución del compuesto 1 (4 g, 12,67 mmol) y N-metilmorfolina (1,6 ml, 14,57 mmol) en tetrahidrofurano (30 ml) con isobutilclorofornato (1,8 ml, 13,94 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno a -15°C . Se agitó la mezcla resultante a la misma temperatura durante 30 minutos. Se añadió a través de un filtro lentamente la mezcla resultante a una disolución de borohidruro de sodio (959 mg, 25,34 mmol) en tetrahidrofurano/metanol (36 ml/12 ml) a -78°C con agitación eficaz. Se calentó lentamente el reactivo hasta temperatura ambiente mientras se agitaba durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se añadió ácido acético (4 ml) y se agitó durante 15 minutos. Se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 2 (3,69g, 96,5%).

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4,50 (s, 1H), 3,64 (q, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,11 (m, 2H), 1,56 (m, 2H), 1,44 (m, 11H), 1,29 (m, 10H)

20 Compuesto 3

Se trató lentamente una disolución del compuesto 2 (450 mg, 1,73 mmol) y N-metilmorfolina (381 μl , 3,46 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) con anhídrido metanosulfónico (363 mg, 2,07 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno a 0°C . Se calentó lentamente la mezcla resultante hasta temperatura ambiente mientras se agitaba durante 1 hora. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 3 como un sólido blanco (520 mg, 89%).

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4,50 (s, 1H), 4,22 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H), 3,11 (m, 2H), 3,01 (s, 3H), 1,74 (m, 2H), 1,44-1,36 (m, 13H), 1,29 (m, 8H)

30 Compuesto 4

Se trató una disolución del compuesto 3 (520 mg, 1,54 mmol) en dimetilformamida (5 ml) con azida de sodio (120 mg, 1,85 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno y se agitó la mezcla resultante a 70°C durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para dar el compuesto 4 en forma líquida (430 mg, 98%).

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4,49 (s, 1H), 3,26 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 3,09-3,12 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,44 (m, 11H), 1,33 (m, 10H)

40 Compuesto 5

Se trató una disolución del compuesto 4 (430 mg, 1,51 mmol) en diclorometano (6 ml) con HCl 4 M en 1,4-dioxano (4 ml) bajo atmósfera de nitrógeno a 0°C . Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas y se concentró a presión reducida para dar el compuesto 5 (330 mg, 99%).

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8,29 (s, 2H), 3,26 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 2,98 (m, 2H), 1,46 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,31-1,39 (m, 10H)

50 LCB 14-0529

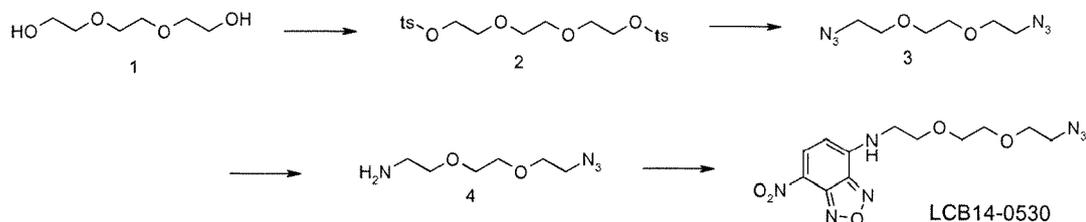
Se trató una disolución del compuesto 5 (326 mg, 1,47 mmol) en un disolvente de mezcla (10 ml) de acetonitrilo y 25 mmol de bicarbonato de sodio con 4-cloro-7-nitrobenzofurazano (442 mg, 2,20 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el

residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto LCB 14-0529 (250 mg, 49%).

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8,48 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 6,16 (d, 8,4 Hz, 1H), 3,47 (q, 6,6 Hz, 2H), 3,24 (t, 6,9 Hz, 2H), 1,79 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,42-1,48 (m, 2H), 1,20-1,37 (m, 8H)

5

2-8. Azida-grupo conector-NBD: LCB14-0530



10 Compuesto 2

Se trató una disolución de tri(etilen)glicol (5 g, 33,29 mmol) en diclorometano (30 ml) con cloruro de p-toluenosulfonilo (13,96 g, 73,24 mmol) e hidróxido de potasio (8,96 g, 159,79 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno a 0°C . Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas a 0°C . Se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 2 (13,2 g, 86,5%) como un sólido blanco.

15

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7,79 (m, 4H), 7,35 (m, 4H), 4,14 (m, 4H), 3,65 (m, 4H), 3,53 (s, 4H), 2,44 (s, 6H)

20 Compuesto 3

Se trató una disolución del compuesto 2 (4,5 g, 9,81 mmol) en dimetilformamida (20 ml) con azida de sodio (1,6 g, 24,52 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó la mezcla resultante a 65°C durante 10 horas. Se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 3 (1,96 g, 99%).

25

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 3,68-3,66 (m, 8H), 3,37 (t, $J=4,8$ Hz, 4H)

30 Compuesto 4

Se añadió lentamente a lo largo de 5 minutos una disolución de trifetilfosfina (655 mg, 2,49 mmol) en dietil éter (3,5 ml) a una disolución del compuesto 3 (500 mg, 2,49 mmol) en 6,6 ml de un disolvente mixto de dietil éter, tetrahidrofurano y HCl 1 N (V:V:V=3:0,6:3). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 5 horas. Se diluyó la mezcla resultante con acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml) y se neutralizó con disolución de NaOH 1 N. Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 4 (370 mg, 85%).

35

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 3,69-3,63 (m, 6H), 3,52 (t, $J=5,1$ Hz, 2H), 3,40 (t, $J=4,8$ Hz, 2H), 2,87 (t, $J=5,1$ Hz, 2H)

40

LCB14-0530

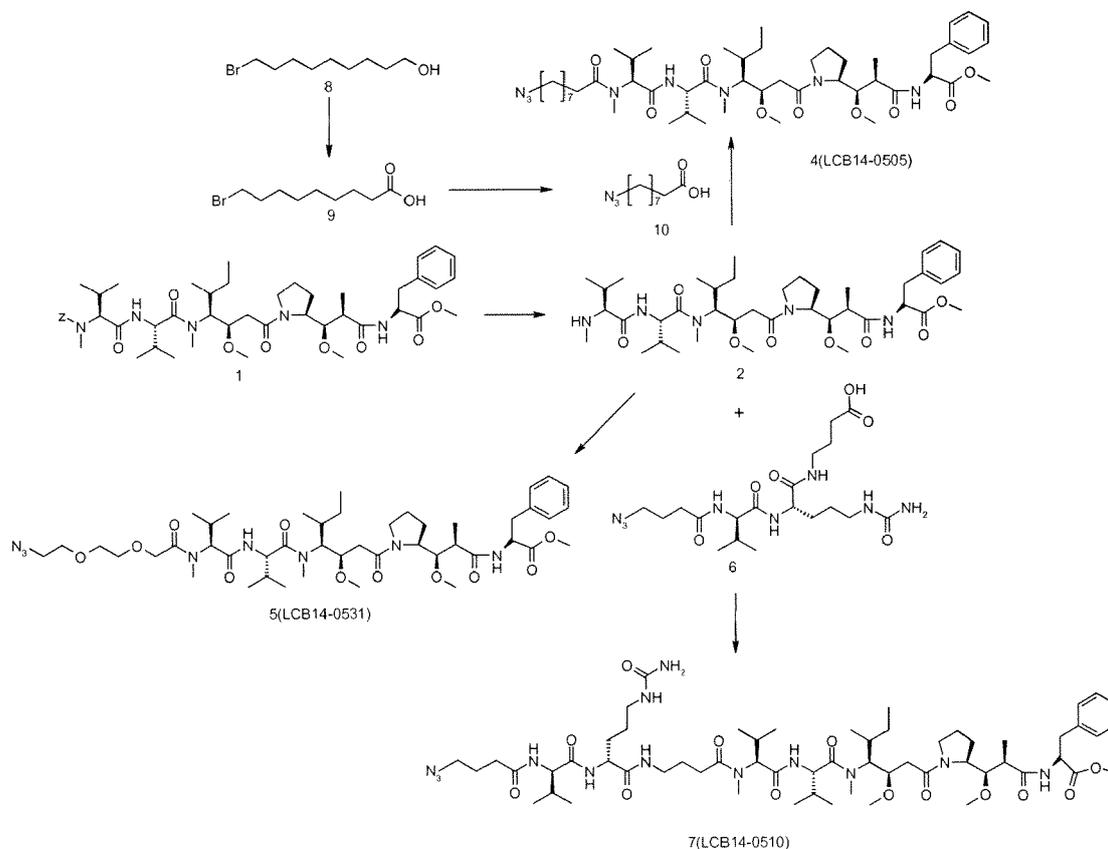
Se trató de manera secuencial una disolución del compuesto 4 (200 mg, 1,14 mmol) en tetrahidrofurano (4 ml) con trietilamina (320 μl , 2,28 mmol) y una disolución de 4-cloro-7-nitrobenzofurazano (442 mg, 2,20 mmol) en tetrahidrofurano (1 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto LCB14-0530 (305 mg, 78,8%).

45

50

$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 8,47 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,17 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 3,86 (t, $J=4,8$ Hz, 2H), 3,66-3,73 (m, 8H), 3,41 (t, $J=4,8$ Hz, 2H)

2-9. Azida-grupo conector-fármaco: LCB14-0505, 0531 y 0510

5 Compuesto 2

Se preparó el compuesto 1 con referencia al método descrito en ChemPharmBull, 1995, 43 (10), 1706-1718. Se agitó una disolución del compuesto 1 (0,50 g, 0,57 mmol) en *tert*-butanol (6 ml) y agua (0,6 ml) durante 4 horas bajo atmósfera de hidrógeno con Pd/C (6 mg, 0,06 mmol). Se filtró la disolución de reactivos a través de un lecho de Celite y se concentró el filtrado a presión reducida para dar el compuesto 2 (0,42g) como un sólido blanco.

IE-EM m/z: 747(M⁺)

Compuesto 9

Se disolvió trióxido de cromo (VI) (CrO₃, 7 g, 0,07 mol) en agua destilada (10 ml) a 0°C. Se añadió secuencialmente a la disolución H₂SO₄ 18 M (6,1 ml, 0,11 mol) y agua destilada (20 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 5 minutos (=reactivo de Jones). Se trató lentamente una disolución de 9-bromo-1-nonanol (5 g, 22,4 mmol) en acetona (250 ml) con el reactivo de Jones (18 ml) a -5°C. Después de agitar la mezcla resultante durante 3 horas a temperatura ambiente, se separó por filtración el sólido verdoso y se concentró el filtrado. Se extrajo el residuo con dietil éter (100 ml) y agua (50 ml). Se secó el extracto orgánico con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. Se sometió el residuo a cromatografía ultrarrápida en columna para dar el compuesto 9 (4,95 g, 93%).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 3,40 (t, J= 6,6 Hz, 2H), 2,35 (t, J= 7,2 Hz, 2H), 1,85 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,41 (m, 2H), 1,32 (m, 6H)

Compuesto 10

Se trató una disolución del compuesto 9 (4 g, 16,86 mmol) en N,N-dimetilformamida (15 ml) con azida de sodio (1,64 g, 25,29 mmol). Se calentó la mezcla resultante hasta 80°C durante 6 horas con agitación. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se separó la fase orgánica así obtenida, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. Se sometió el residuo a cromatografía ultrarrápida en columna para dar el compuesto 10 (3,3 g, 98%).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 3,26 (t, J=7,2 Hz, 2H), 2,35 (t, J=7,2 Hz, 2H), 1,64-1,57 (m, 4H), 1,35-1,32 (m, 8H)

LCB14-0505

Se trató una disolución del compuesto 2 (0,16 g, 0,21 mmol) y el ácido 9-azido-nonanoico (10) (47 mg, 0,24 mmol) en cloruro de metileno (3 ml) con DIPEA (0,06 ml, 0,32 mmol) y PyBOP (0,15g, 0,28 mmol) a 0°C. Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas. Se extrajo la mezcla resultante con cloruro de metileno (100 ml) y agua (20 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto LCB14-0505 (0,12 g, 59%) como un sólido blanco.

IE-EM m/z: 928(M⁺)

LCB14-0531

Se preparó el compuesto LCB 14-0531 (65%) mediante un método similar al método descrito anteriormente.

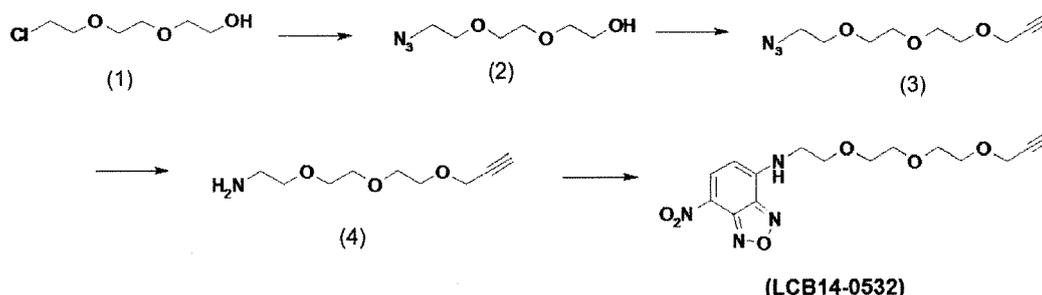
IE-EM m/z: 917(M⁺)

LCB14-0510

Se preparó el compuesto 6 usando los métodos descritos en BioconjugateChem. 2002, 13, 855-869 y el documento US2005238649. Se trató una disolución del compuesto 6 (69 mg, 0,15 mmol) y el compuesto 2 (100 mg, 0,13 mmol) en DMF (2 ml) con DIPEA (0,04 ml, 0,2 mmol) y PyBOP (0,09g, 0,17 mmol) a 0°C. Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas. Se usaron acetato de etilo (100 ml) y agua (30 ml) para extraer una fase orgánica, que se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con cloruro de metileno y metanol para dar el compuesto LCB14-0510 (94 mg, 64%) como un sólido marrón.

IE-EM m/z: 1199(M⁺)

2-10. Acetileno-grupo conector-NBD: LCB14-0532

Compuesto 2

Se trató una disolución del compuesto 1 (1 g, 5,93 mmol) en 10 ml de dimetilformamida con azida de sodio (578 mg, 8,89 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó la mezcla resultante a 80°C durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para dar el compuesto 2 (1,03 g, 99%).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 3,75 (m, 2H), 3,69 (m, 6H), 3,62 (m, 2H), 3,41 (t, J=3,5 Hz, 2H), 2,30 (m, 1H)

Compuesto 3

A una suspensión de hidruro de sodio (55% en aceite mineral, 250 mg, 5,7 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) a 0°C se le añadió una disolución del compuesto 2 (500 mg, 2,85 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 1 hora. Luego se calentó la mezcla resultante hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas. Se añadió bromuro de propargilo (al 80% en tolueno, 800 µl, 7,12 mmol) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 12 horas. Se añadieron disolución de cloruro de amonio (20 ml) y dietil éter (30 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para dar el compuesto 3 (530 mg, 86,6%).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 4,21 (d, J=2,4 Hz, 2H), 3,66-3,72 (m, 10H), 3,39 (t, J=5,1 Hz, 2H), 2,43 (t, J=2,4 Hz, 1H)

Compuesto 4

Se trató lentamente una disolución del compuesto 3 (250 mg, 1,17 mmol) en 3 ml de una disolución de mezcla de tetrahidrofurano y agua destilada (V:V=2:1) con trifetilfosfina (461 mg, 1,75 mmol) en tetrahidrofurano (1 ml) a lo

largo de 5 minutos. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, se añadieron dietil éter (30 ml) y agua destilada (30 ml). Se acidificó la mezcla resultante con HCl 1 N y se separó la fase orgánica. Se diluyó la fase acuosa con diclorometano (50 ml) y se neutralizó con disolución de NaOH 1 N. Se separó la fase orgánica así obtenida, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para dar el compuesto 4 (200 mg, 91,3%) de color amarillo.

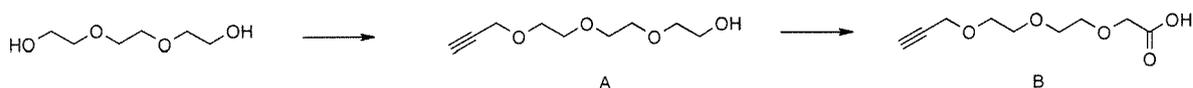
^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 4,18 (d, J= 2,4 Hz, 2H), 3,59-3,69 (m, 8H), 3,48 (t, J=5,4 Hz, 2H), 2,84 (s, 2H), 2,40 (m, 1H)

LCB14-0532

Se trató una disolución del compuesto 4 (195 mg, 1,04 mmol) en tetrahidrofurano (4 ml) con trietilamina (290 μl , 2,08 mmol). Se añadió una disolución de 4-cloro-7-nitrobenzofurazano (270 mg, 1,35 mmol) en tetrahidrofurano (1 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida para dar el compuesto LCB 14-0532 (280 mg, 77%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 8,50 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 6,99 (s, 1H), 6,19 (d, J=8,4 Hz, 1H), 4,19 (d, J=2,4 Hz, 2H), 3,89 (t, J=5,1 Hz, 2H), 3,68-3,75 (m, 10H), 2,41 (t, J=2,4 Hz, 1H)

2-11. Acetileno-grupo conector-MMAF-OMe (LCB14-0536)



Compuesto A

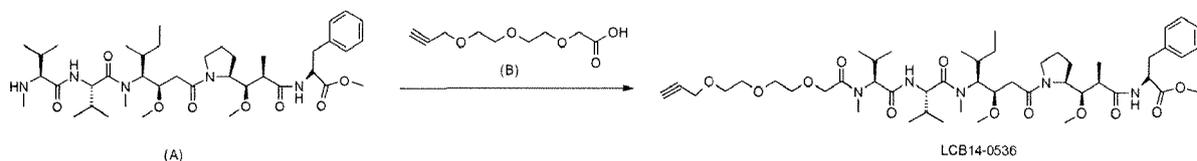
A una suspensión de NaH (55% en aceite mineral, 390 mg, 16,25 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno se le añadió lentamente una disolución de trietilenglicol (4 g, 26,63 mmol) en tetrahidrofurano (20 ml). Se añadió lentamente bromuro de propargilo al 80% en tolueno (1,97 g, 13,31 mmol). Se agitó la mezcla resultante a la misma temperatura durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron diclorometano (100 ml) y agua (100 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida y se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar compuesto (A) (1 g, 43%) en forma acuosa.

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 4,21-4,20 (m, 2H), 3,74-3,66 (m, 10H), 3,62-3,61 (m, 2H), 2,43 (t, J=2,4 Hz, 1H)

Compuesto B

A una disolución del compuesto A (1 g, 5,31 mmol) en acetona bajo atmósfera de nitrógeno a -5°C se le añadieron lentamente 5,3 ml de reactivo de Jones. Se agitó la mezcla resultante, mientras se calentaba lentamente hasta temperatura ambiente, durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua (100 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida para dar compuesto (B) (886 mg, 82%) como un líquido amarillo.

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 4,21 (d, J=2,4, 2H), 4,18-4,17 (m, 2H), 3,78-3,77 (m, 2H), 3,74-3,70 (m, 6H), 2,44 (t, J=2,4 Hz, 1H)

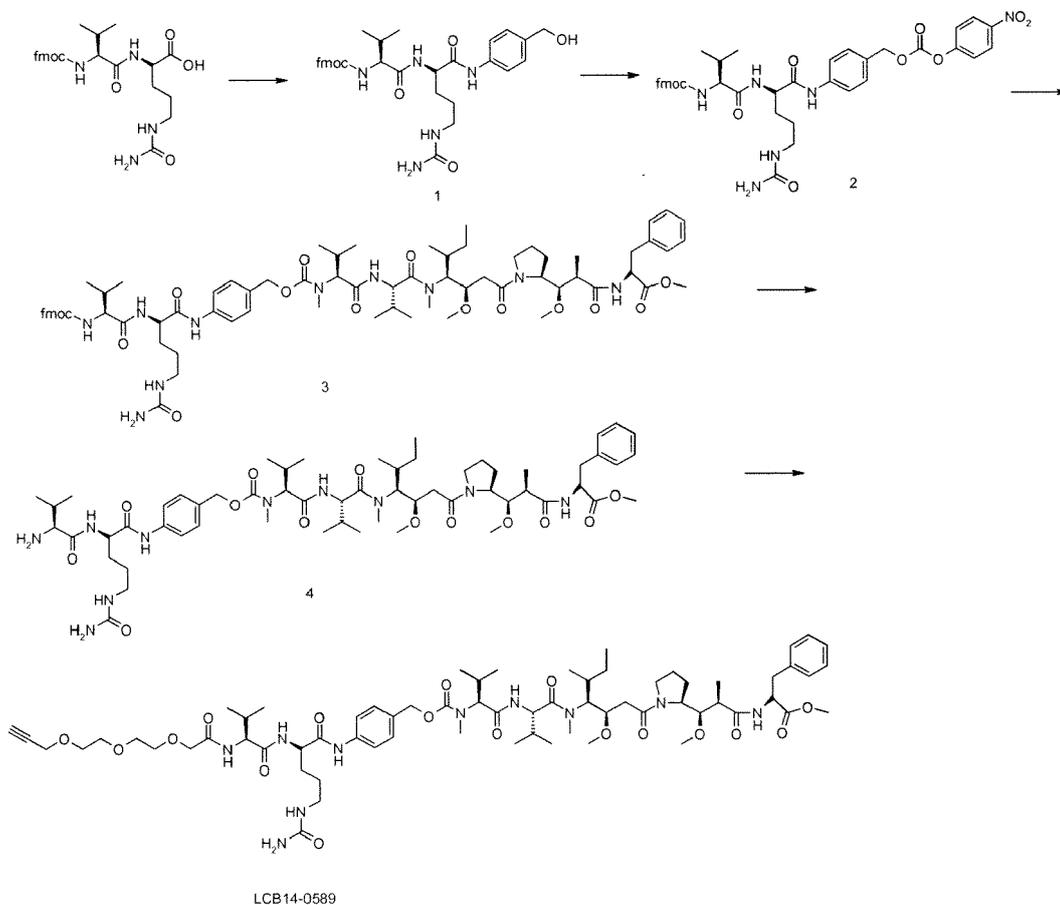


LCB14-0536

A una disolución del compuesto (A) (MMAF-OMe, 100 mg, 0,13 mmol) en acetonitrilo (2 ml) a temperatura ambiente se le añadieron el compuesto (B) (27 mg, 0,13 mmol), PyBOP (104 mg, 0,19 mmol) y DIPEA (0,03 ml, 0,19 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua (20 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con diclorometano y metanol para dar el compuesto LCB14-0536 (82 mg, 68%) como un sólido amarillo.

IE-EM m/z: 930(M^+)

2-12. Acetileno-grupo conector(secuencia peptídica)-MMAF-OMe (LCB14-0589)

5 Compuesto 1 (Fmoc-Val-Cit-PAB)

Se preparó Fmoc-Val-Cit-OH según el método descrito en el documento WO2007/008603. A una disolución de Fmoc-Val-Cit-OH (4,89 g, 9,85 mmol) en diclorometano (50 ml) y metanol (20 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se le añadieron para-aminobencílicoalcohol (2,43 g, 19,70 mmol) y 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (1,98 g, 19,7 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, se concentró el disolvente. Se lavó el sólido resultante con dietil éter múltiples veces para dar el compuesto 1 (4,12 g, 70%) como un sólido amarillo.

¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,00 (s, 1H), 8,12 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,89 (d, J=7,8 Hz, 2H), 7,75-7,72 (m, 2H), 7,55 (d, J=7,8 Hz, 2H), 7,44-7,41 (m, 2H), 7,33-7,31 (m, 2H), 7,23 (d, J=8,4 Hz, 2H), 6,02 (s a, 1H), 5,41-5,38 (m, 2H), 5,09 (s a, 1H), 4,42 (s a, 2H), 4,30-4,28 (m, 1H), 4,24-4,23 (m, 2H), 3,94-3,91 (m, 1H), 3,02-2,99 (m, 1H), 2,94-2,93 (m, 1H), 2,00-1,99 (m, 1H), 1,7 (s a, 1H), 1,60 (s a, 1H), 1,43 (s a, 1H), 1,36 (s a, 1H), 0,88-0,84 (m, 6H)

Compuesto 2 (Fmoc-Val-Cit-PABC-PNA)

Se trató de manera secuencial una disolución del compuesto 1 (2 g, 3,32 mmol) en DMF (8 ml) con carbonato de bis(4-nitrofenilo) (2,02 g, 6,64 mmol) y diisopropiletilamina (0,647 ml, 4,98 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. Se agitó la mezcla resultante durante 12 horas a temperatura ambiente. Después de completarse la reacción, se añadió dietil éter para la solidificación. Se lavó el sólido resultante con dietil éter y agua múltiples veces para dar el compuesto 2 (1,52 g, 60%) como un sólido amarillo.

¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,19 (s, 1H), 8,31 (d, J=9,6 Hz, 2H), 8,15 (d, J=7,8 Hz, 1H), 7,89 (d, J=7,2 Hz, 2H), 7,75-7,72 (m, 2H), 7,66 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,57 (d, J=9,0 Hz, 2H), 7,43-7,39 (m, 4H), 7,32 (t, J=7,2 Hz, 2H), 6,05-6,04 (m, 1H), 5,42 (m, 2H), 5,24 (s, 2H), 4,42 (m, 1H), 4,30-4,28 (m, 1H), 4,25-4,23 (m, 2H), 3,94-3,91 (m, 1H), 3,01-3,00 (m, 1H), 2,96-2,94 (m, 1H), 2,00-1,99 (m, 1H), 1,70 (m, 1H), 1,59 (m, 1H), 1,45 (m, 1H), 1,37 (m, 1H), 0,89-0,83 (m, 6H).

IE-EM m/z: 767(M⁺)

Compuesto 3 (Fmoc-Val-Cit-PABC-MMAF-OMe)

Se trató una disolución del compuesto 2 (200 mg, 0,261 mmol) y MMAF-OMe (194 mg, 0,261 mmol) en DMF (2 ml) con HOBt (7,1 mg, 0,052 mmol), piridina (1 ml) y DIPEA (0,045 ml, 0,261 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se usaron acetato de etilo (30 ml), agua (30 ml) y solución salina (30 ml) para extraer una fase orgánica. Se concentró la fase orgánica así obtenida y se sometió a cromatografía en columna para dar el compuesto 3 (153 mg, 42%) como un sólido amarillo.

IE-EM m/z: 1375(M⁺)

Compuesto 4 (Val-Cit-PABC-MMAF-OMe)

A una disolución del compuesto 3 (153 mg, 0,112 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) a temperatura ambiente se le añadió piperidina (0,2 ml). Se agitó la mezcla resultante a la misma temperatura durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se realizó la recristalización con éter y hexano para dar el compuesto 4 (85 mg, 66%) como un sólido de color amarillo claro.

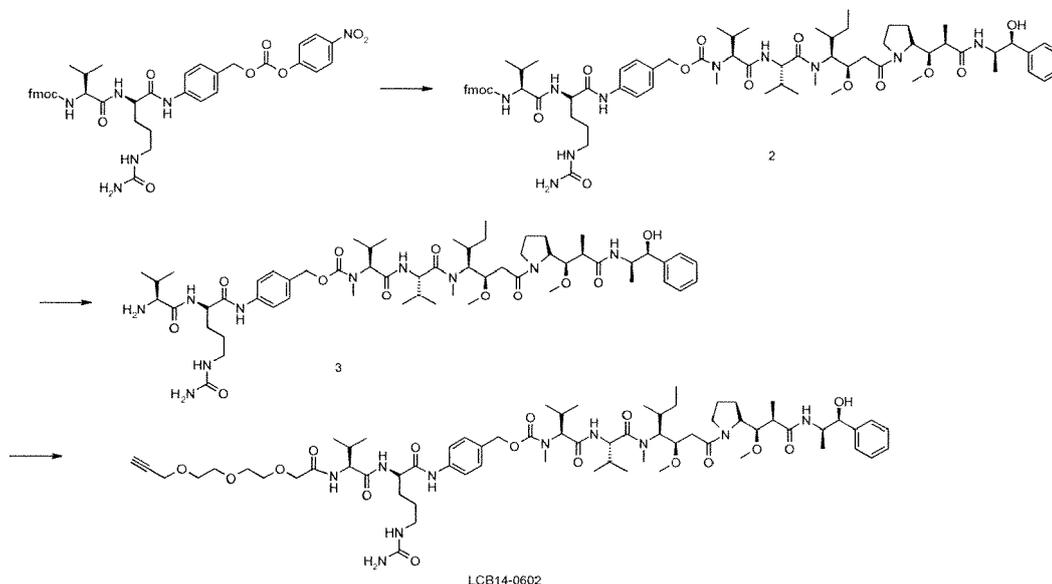
IE-EM m/z: 1152(M⁺)

LCB14-0589 (grupo conector de acetileno-Val-Cit-PABC-MMAF-OMe)

A una disolución del compuesto 4 (85 mg, 0,074 mmol) y el compuesto B del ejemplo 2-11 (18 mg, 0,088 mmol) en DMF (2 ml) se le añadieron DIPEA (0,03 ml, 0,148 mmol) y PyBOP (58 mg, 0,111 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 5 horas. Después de completarse la reacción, se realizó la extracción con acetato de etilo (20 ml) y agua (20 ml). Se sometió el producto bruto resultante a cromatografía en columna para dar el compuesto LCB14-0589 (35,4 mg, 36%) como un sólido blanco.

IE-EM m/z: 1336(M⁺)

2-13. Acetileno-grupo conector-Val-Cit-PABC- MMAE (LCB14-0602)

Compuesto 2 (Fmoc-Val-Cit-PABC-MMAE)

A una disolución de Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP (200 mg, 0,261 mmol) y MMAE (187 mg, 0,261 mmol) en DMF (2 ml) se le añadieron HOBt (7,1 mg, 0,052 mmol), piridina (1 ml) y DIPEA (0,045 ml, 0,261 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se usaron acetato de etilo (30 ml), agua (30 ml) y solución salina (30 ml) para extraer una fase orgánica. Se concentró la fase orgánica así obtenida y se sometió a cromatografía en columna para dar el compuesto 2 (50 mg, 14,3%) como un sólido amarillo.

IE-EM m/z: 1346(M⁺)

Compuesto 3 (Val-Cit-PABC-MMAE)

A una disolución del compuesto 2 (50 mg, 0,037 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) a temperatura ambiente se le

añadió piperidina (0,1 ml). Se agitó la mezcla resultante a la misma temperatura durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se realizó la recrystalización con éter y hexano para dar el compuesto 3 (37 mg, 89%) como un sólido de color amarillo claro.

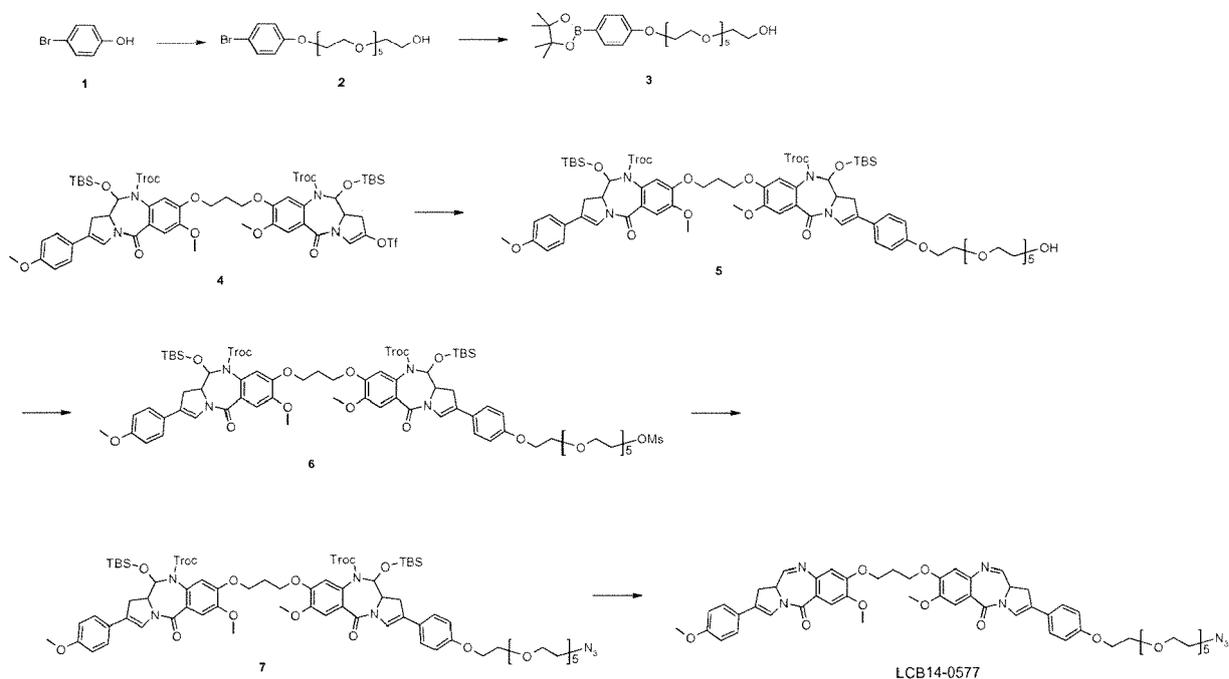
5 IE-EM m/z: 1124(M⁺)

LCB14-0602 (grupo conector de acetileno-Val-Cit-PABC-MMAE)

10 A una disolución del compuesto 3 (35 mg, 0,031 mmol) y el compuesto B del ejemplo 2-11 (7,6 mg, 0,037 mmol) en DMF (2 ml) a temperatura ambiente se le añadieron DIPEA (0,011 ml, 0,062 mmol) y PyBOP (24 mg, 0,47 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 5 horas. Después de completarse la reacción, se realizó la extracción con acetato de etilo (20 ml) y agua (20 ml). Se sometió el producto bruto resultante a cromatografía en columna para dar el compuesto LCB14-0602 (28,5 mg, 70%) como un sólido blanco.

15 IE-EM m/z: 1308(M⁺)

2-14. Grupo conector de azida-dímero de PBD (pirrolobenzodiazepina) (LCB14-0577)



20

Compuesto 2

25 A una disolución del compuesto 1 (1,22 g, 7,08 mmol), trifenilfosfina (TPP, 2,23 g, 8,50 mmol) y hexaetilenglicol (2 g, 7,08 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno se le añadió diisopropilazodicarbonato (DIAD, 1,67 ml, 8,50 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 1 hora. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 2 (1,4g, 45%).

30 ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 7,35 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 6,80 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 4,09 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 3,84 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 3,72 (t, J= 4,8 Hz, 4H), 3,68~3,65 (m, 14H), 3,60 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 2,85 (s a, 1H)

Compuesto 3

35 A una disolución del compuesto 2 (300 mg, 0,68 mmol) en 1,4-dioxano (5 ml) se le añadieron de manera secuencial acetato de potasio (200 mg, 2,04 mmol), PdCl₂ (dppf) (28 mg, 0,034 mmol) y bis(pinacolato)diboro (174 mg, 0,68 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 70°C durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 3 (300 mg, 90%).

40

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 7,73 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 6,90 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 4,15 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 3,86 (t, J= 4,8

Hz, 2H), 3,73~3,72 (m, 4H), 3,68~3,64 (m, 14H), 3,60 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 1,33 (s, 12H)

Compuesto 4

5 Se preparó el compuesto 4 según los métodos descritos en los documentos WO2006/111759 A1, WO2010/043880 A1 y WO2010/010347 A1.

10 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,35 (s, 1H), 7,29 (d, J= 9 Hz, 2H), 7,27 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 6,89 (d, J= 9 Hz, 2H), 6,77 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 5,91 (m, 2H), 5,23 (d, J= 9 Hz, 2H), 5,21 (d, J= 9 Hz, 2H), 4,29 (m, 2H), 4,17~4,13 (m, 4H), 3,96~3,91 (m, 8H), 3,82 (s, 3H), 3,33 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 2,44 (m, 2H), 0,90 (2s, 18H), 0,27 (2s, 12H)

Compuesto 5

15 Se disolvieron de manera secuencial el compuesto 4 (83 mg, 0,059 mmol), carbonato de sodio (10 mg, 0,089 mmol) y $\text{Pd}(\text{TPP})_4$ (3,4 mg, 0,003 mmol) en un disolvente de mezcla de etanol/tolueno/agua destilada (0,3 ml/0,3 ml/0,3 ml). Se añadió una disolución del compuesto 3 (31,6 mg, 0,065 mmol) en tolueno (3 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 5 (79 mg, 74%).

20 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,35 (m, 2H), 7,31~7,27 (m, 6H), 6,92~6,89 (m, 4H), 6,78 (s, 2H), 5,90 (d, J= 9 Hz, 2H), 5,23 (d, J= 12,6 Hz, 2H), 4,30 (m, 2H), 4,16~4,13 (m, 6H), 3,97~3,94 (m, 8H), 3,87 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,74~3,64 (m, 18H), 3,61 (m, 2H), 3,34 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 0,90 (s, 18H), 0,25 (2s, 12H)

Compuesto 6

25 A una disolución del compuesto 5 (250 mg, 0,155 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml) a 0°C se le añadieron 4-metilmorfolina (34,2 μl , 0,310 mmol) y anhídrido metanosulfónico (Ms_2O , 32,5 mg, 0,186 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 6 (220 mg, 84%).

30 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,33 (m, 2H), 7,28~7,23 (m, 6H), 6,89~6,86 (m, 4H), 6,76 (s, 2H), 5,88 (d, J= 9 Hz, 2H), 5,21 (d, J= 12,6 Hz, 2H), 4,35 (m, 2H), 4,26 (m, 2H), 4,13~4,11 (m, 6H), 3,92 (s, 6H), 3,84 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,74~3,60 (m, 20H), 3,31 (m, 2H), 3,06 (s, 3H), 2,80 (m, 2H), 2,43 (m, 2H), 0,88 (s, 18H), 0,23 (2s, 12H)

Compuesto 7

35 A una disolución del compuesto 6 (100 mg, 0,059 mmol) en dimetilformamida (2 ml) se le añadió azida de sodio (NaN_3 , 4,6 mg, 0,071 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 55°C durante 4 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 7 (85 mg, 88%).

40 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,33 (s, 2H), 7,28~7,24 (m, 6H), 6,89~6,87 (m, 4H), 6,76 (s, 2H), 5,88 (d, J= 9 Hz, 2H), 5,21 (d, J= 12,6 Hz, 2H), 4,26 (m, 2H), 4,13~4,11 (m, 6H), 3,92 (m, 8H), 3,84 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 3,80 (s, 3H), 3,71 (m, 2H), 3,67~3,64 (m, 16H), 3,36 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 3,31 (m, 2H), 2,80 (m, 2H), 2,43 (m, 2H), 0,88 (s, 18H), 0,23 (2s, 12H)

LCB14-0577

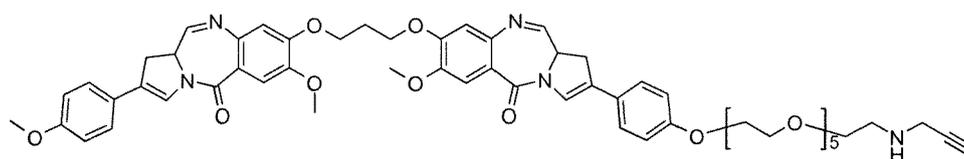
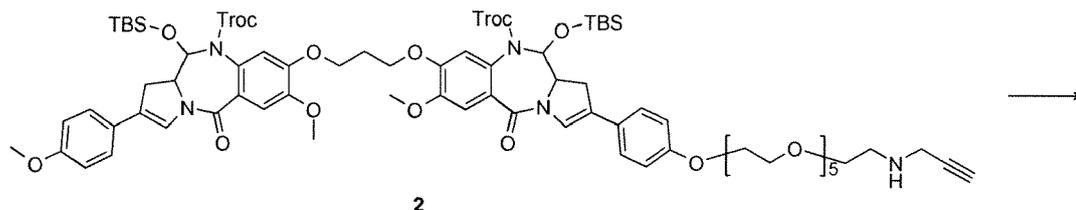
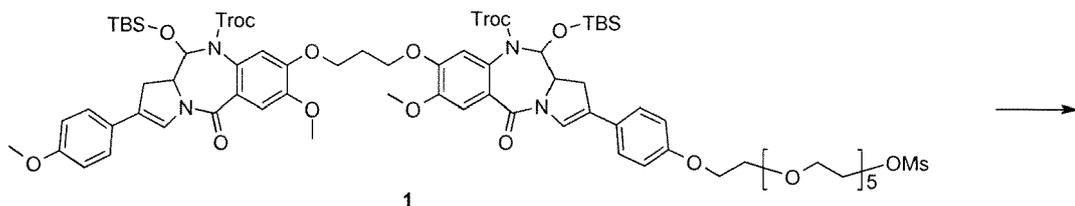
45 A una disolución del compuesto 7 (80 mg, 0,049 mmol) en tetrahidrofurano (1,5 ml) se le añadieron acetato de amonio 1 N (1 ml) y una pareja de cadmio al 10%/plomo (120 mg). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron diclorometano (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto LCB 14-0577 (9 mg, 18%).

50 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,86 (d, J= 4,2 Hz, 2H), 7,36 (m, 2H), 7,31~7,23 (m, 6H), 6,89~6,80 (m, 6H), 4,34~4,22 (m, 6H), 4,11 (m, 2H), 3,92 (m, 6H), 3,84~3,77 (m, 5H), 3,71 (m, 2H), 3,67~3,63 (s, 18H), 3,36 (m, 2H), 3,03 (m, 2H), 2,44~2,40 (m, 2H)

55 IE-EM m/z: 1017(M^+)

65

2-15. Acetileno-grupo conector-dímero de PBD (LCB14-0578)



LCB14-0578

5 Compuesto 2

A una disolución del compuesto 6 del ejemplo 2-14 (95 mg, 0,056 mmol) en acetonitrilo (1 ml) se le añadió una disolución de carbonato de sodio (18 mg, 0,168 mmol) en propargilamina (18 μ l, 0,28 mmol) y agua destilada (500 μ l). Se agitó la mezcla resultante at 40°C durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 2 (45 mg, 48%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,35 (m, 2H), 7,30~7,27 (m, 6H), 6,91~6,89 (m, 4H), 6,78 (s, 2H), 5,91 (d, J= 9 Hz, 2H), 5,23 (d, J= 11,4 Hz, 2H), 4,30 (m, 2H), 4,16~4,11 (m, 6H), 3,94 (s, 6H), 3,87 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,73 (m, 2H), 3,69~3,60 (m 18H), 3,45 (d, J= 2,4 Hz, 2H), 3,33 (m, 2H), 2,87 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 2,82 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 2,22 (t, J= 4,4 Hz, 1H), 0,90 (s, 18H), 0,24 (2s, 12H)

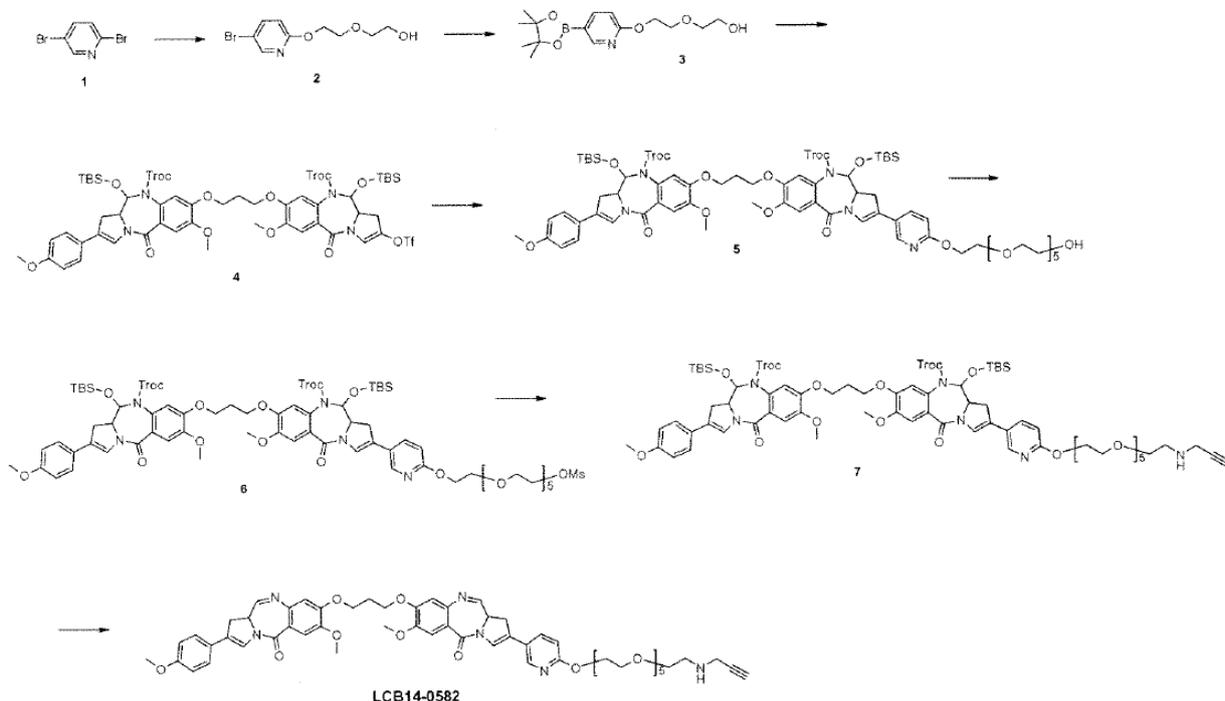
LCB14-0578

A una disolución del compuesto 2 (40 mg, 0,024 mmol) en tetrahidrofurano (750 μ l) se le añadieron acetato de amonio 1 N (0,5 ml) y una pareja de cadmio al 10%/plomo (70 mg). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 4 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron diclorometano (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto LCB14-0578 (13 mg, 52%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,88 (d, J= 4,2 Hz, 2H), 7,38 (m, 2H), 7,33~7,28 (m, 6H), 6,91~6,86 (m, 6H), 4,38~4,20 (m, 6H), 4,13 (m 2H), 3,94 (s, 6H), 3,88~3,80 (m, 5H), 3,73 (m, 2H), 3,69~3,61 (m, 16H), 3,46 (d, J= 2,4 Hz, 2H), 3,39 (m, 2H), 3,30 (m, 2H), 2,88 (t, J= 4,8 Hz, 2H), 2,43 (m, 2H), 2,23 (t, J= 4,4 Hz, 1H)

IE-EM m/z: 1028(M^+)

2-16. Acetileno-grupo conector-dímero de PBD (versión de piridina) (LCB14-0582)

5 Compuesto 2

A una suspensión de NaH (55% en aceite mineral, 184 mg, 4,22 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) a 0°C bajo atmósfera de nitrógeno se le añadió hexaetilenglicol (2,4g, 8,44 mmol) en tetrahidrofurano (3 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 10 minutos a 0°C. Se añadió lentamente una disolución de mezcla preparada disolviendo el compuesto 1 (1 g, 4,22 mmol) en dimetilformamida (0,5 ml) y tetrahidrofurano (0,5 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se agitó a 70°C durante 12 horas. Después de enfriar la mezcla resultante a 0°C, se añadió agua destilada (2 ml). Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se sometió la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 2 (1,5 g, 81%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 8,13 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,61 (dd, $J = 8,4, 2,4$ Hz, 1H), 6,67 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 4,41 (m, 2H), 3,81 (m, 2H), 3,70~3,61 (m, 18H), 3,58 (m, 2H), 2,71 (s a, 1H)

20 Compuesto 3

Se trató de manera secuencial una disolución del compuesto 2 (500 mg, 1,14 mmol) en dimetilformamida (5 ml) con acetato de potasio (336 mg, 3,42 mmol), PdCl_2 (dppf) (46,5 mg, 0,057 mmol) y bis(pinacolato)diboro (318 mg, 1,25 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 70°C durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 3 (250 mg, 45%).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 8,50 (s, 1H), 7,90 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6,74 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 4,50 (t, $J = 4,8$ Hz, 2H), 3,84 (m, 2H), 3,74-3,70 (m, 20H), 1,33 (s, 12H)

Compuesto 5

Se disolvieron de manera secuencial el compuesto 4 (245 mg, 0,175 mmol), carbonato de sodio (28 mg, 0,262 mmol) y $\text{Pd}(\text{TPP})_4$ (10 mg, 0,009 mmol) en una disolución de mezcla de etanol/tolueno/agua destilada (1,5 ml/1,5 ml/1,5 ml). Se añadió una disolución del compuesto 3 (94 mg, 0,192 mmol) en tolueno (1,5 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 5 (100 mg, 35,5%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 8,02 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,66 (m, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,29 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,27 (m, 2H), 6,89 (d, J = 9 Hz, 2H), 6,80 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 6,78 (s, 2H), 5,90 (d, J = 9 Hz, 2H), 5,23 (dd, J = 11,4, 4,2 Hz, 2H), 4,47 (m, 2H), 4,29 (m, 2H), 4,17~4,12 (m, 2H), 3,4 (m, 8H), 3,86 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 3,82 (m, 4H), 3,74~3,65 (m, 18H), 3,61 (m, 2H), 3,33 (m, 2H), 2,83 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 0,90 (s, 18H), 0,25 (2s, 12H)

5

Compuesto 6

A una disolución del compuesto 5 (180 mg, 0,11mM) en tetrahidrofurano (3 ml) a 0°C se le añadieron 4-metilmorfolina (NMM, 61,5 μl , 0,55 mM) y anhídrido metanosulfónico (Ms_2O , 22 mg, 0,121mM). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml) para extraer una fase orgánica. Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para preparar el compuesto 6 (80 mg, 43%).

10

15

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 8,03 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,66 (dd, J = 7,8, 2,4 Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,30 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,27 (m, 2H), 6,89 (d, J = 9 Hz, 2H), 6,80 (d, J = 9 Hz, 1H), 6,78 (s, 2H), 5,90 (d, J = 9 Hz, 2H), 5,22 (dd, J = 12, 4,2 Hz, 2H), 4,47 (m, 2H), 4,38 (m, 2H), 4,30 (m, 2H), 4,15 (m, 3H), 3,99~3,93 (m, 7H), 3,86 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,76 (m, 2H), 3,71 (m, 2H), 3,69~3,63 (m, 16H), 3,34 (m, 2H), 3,08 (s, 3H), 2,83 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 0,90 (2s, 18H), 0,25 (2s, 12H)

20

Compuesto 7

A una disolución del compuesto 6 (80 mg, 0,047 mmol) en acetonitrilo (4 ml) se le añadió una disolución de carbonato de sodio (20 mg, 0,141 mmol) en propargilamina (30 μl , 0,47 mmol) y agua destilada (500 μl). Se agitó la mezcla resultante a 50°C durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 7 (25 mg, 32%).

25

30

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 8,03 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,66 (dd, J = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 7,38 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,28 (m, 2H), 6,89 (d, J = 9 Hz, 2H), 6,79 (d, J = 9 Hz, 1H), 6,78 (s, 2H), 5,90 (d, J = 9 Hz, 2H), 5,22 (dd, J = 12, 4,2 Hz, 2H), 4,47 (m, 2H), 4,30 (m, 2H), 4,17~4,14 (m, 3H), 3,98~3,93 (m, 7H), 3,86 (m, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,72 (m, 2H), 3,69~3,60 (m, 18H), 3,45 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,34 (m, 2H), 2,87 (t, J = 4,8 Hz, 2H), 2,83 (m, 2H), 2,45 (m, 2H), 2,22 (m, 1H), 0,90 (2s, 18H), 0,25 (2s, 12H)

35

LCB14-0582

A una disolución del compuesto 7 (25 mg, 0,015 mmol) en tetrahidrofurano (750 μl) se le añadieron acetato de amonio 1 N (0,5 ml) y una pareja de cadmio al 10%/plomo (50 mg). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron dimetilclorometano (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto LCB14-0582 (6 mg, 38,4%).

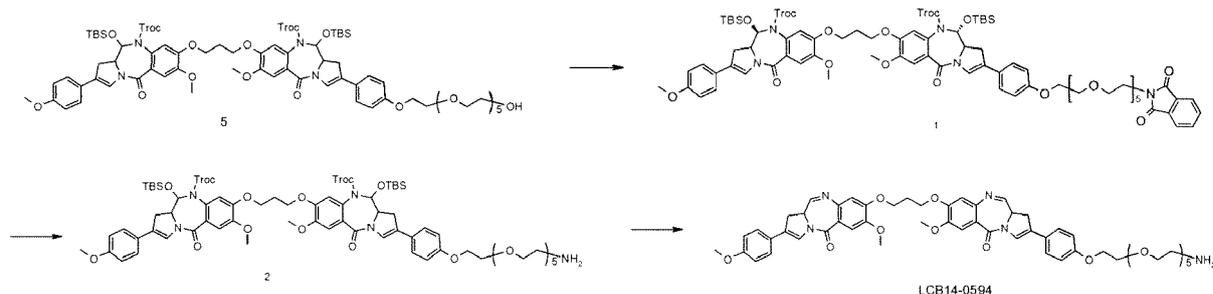
40

45

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 8,00 (m, 1H), 7,88 (m, 2H), 7,60 (m, 1H), 7,41~7,28 (m, 6H), 6,90~6,71 (m, 5H), 4,46 (m, 2H), 4,35~4,24 (m, 4H), 3,95~3,79 (m, 11H), 3,70 (m, 2H), 3,68~3,61 (m, 18H), 3,47 (m, 2H), 3,38 (m, 2H), 3,04 (m, 2H), 2,89 (t, J = 5,4 Hz, 2H), 2,40 (m, 2H), 2,23 (s, 1H)

IE-EM m/z: 1029(M^+)**2-17. Amino-Peg5-dímero de PBD (LCB14-0594)**

50



Compuesto 1

A una disolución del compuesto 5 del ejemplo 2-14 (456 mg, 0,284 mmol) en tetrahidrofurano se le añadieron trifetilfosfina (108 mg, 0,411 mmol) y ftalimida (50 mg, 0,341 mmol). Se añadió lentamente DIAD (0,058 ml, 0,340 mmol) a 0°C. Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se realizó la extracción con diclorometano (40 ml) y agua (40 ml). Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 1 (492 mg, cuantitativo) como un sólido amarillo.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 7,84-7,82 (m, 2H), 7,70-7,69 (m, 2H), 7,34 (m, 2H), 7,29-7,25 (m, 6H), 6,90 (d, J=7,2, 4H), 6,78 (s, 2H), 5,92 (d, J=9,0, 2H), 5,21 (d, J=12,6, 2H), 4,28 (m, 2H), 4,19-4,10 (m, 4H), 3,93 (m, 6H), 3,89-3,87 (m, 2H), 3,86-3,84 (m, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,74-3,71 (m, 4H), 3,67-3,66 (m, 2H), 3,63-3,62 (m, 6H), 3,59-3,58 (m, 6H), 3,33 (m, 2H), 2,85-2,82 (m, 2H), 2,42 (m, 2H), 0,91 (s, 18H), 0,27 (2s, 12H)

Compuesto 2

A una disolución del compuesto 1 (492 mg, 0,283 mmol) en alcohol etílico (2 ml) y tetrahidrofurano (2 ml) se le añadió hidrazina monohidratada (0,07 ml, 1,417 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 60°C durante 5 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron 2 ml de acetato de etilo. Se separó por filtración el sólido. Se concentró el filtrado y se sometió a cromatografía en columna para dar el compuesto 2 (380 mg, 83%) como un sólido amarillo.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 7,35 (s a, 2H), 7,29-7,26 (m, 6H), 6,92-6,88 (m, 4H), 6,79 (s a, 2H), 5,92 (d, J=8,4, 2H), 5,21 (d, J=12, 2H), 4,29-4,28 (m, 2H), 4,19-4,17 (m, 6H), 3,93-3,90 (m, 6H), 3,89-3,87 (m, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,75-3,73 (m, 2H), 3,69-3,63 (m, 12H), 3,35-3,31 (m, 2H), 2,96 (s a, 2H), 2,85 (d, J=16,8, 2H), 2,43 (m, 2H), 0,91 (s, 18H), 0,27 (2s, 12H).

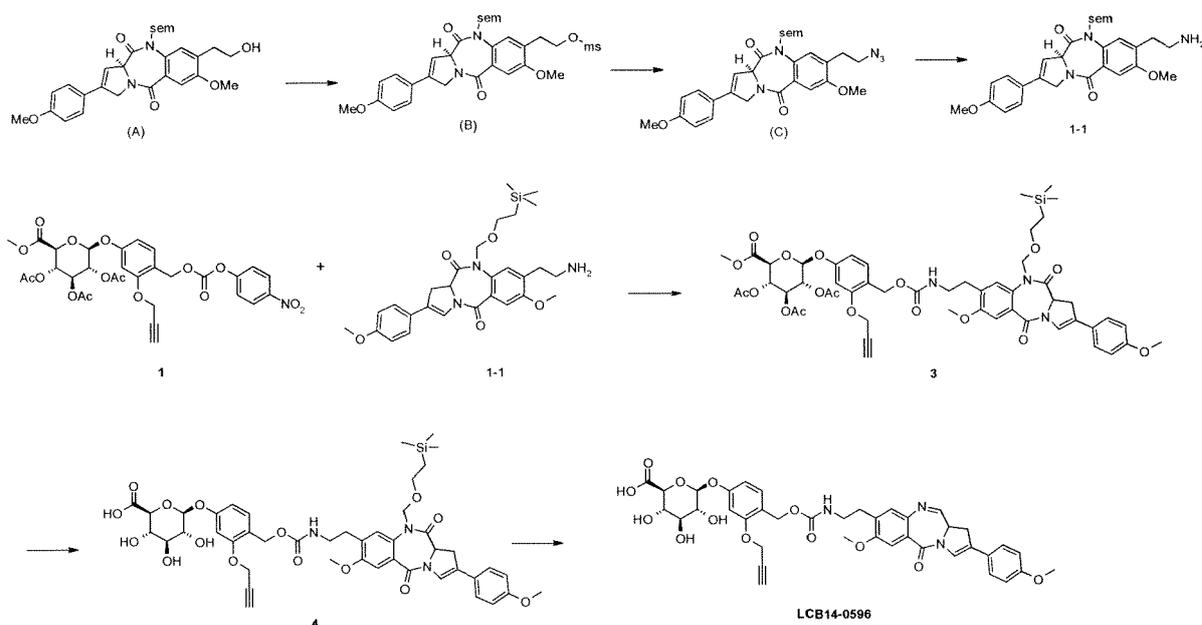
IE-EM m/z: 1606(M⁺)

LCB 14-0594

Se añadieron acetato de amonio 1 N (0,4 ml) y una pareja de cadmio al 10%/plomo (40 mg) a una disolución del compuesto 2 (25 mg, 0,015 mmol) en tetrahidrofurano (1 ml) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla resultante a la misma temperatura durante 12 horas. Después de completarse la reacción, se filtró la mezcla resultante con diclorometano. Se concentró la disolución filtrada y se sometió a cromatografía en columna para dar LCB 14-0594 (4 mg, 26%) como un sólido amarillo.

IE-EM m/z: 990(M⁺)

2-18. Glucurónido-grupo conector-monómero de PBD (LCB14-0596)



Compuesto (B)

A una disolución del compuesto (A) (300 mg, 0,57 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) a temperatura ambiente se le añadieron N-metilmorfolina (0,16 ml, 1,43 mmol) y anhídrido metanosulfónico (120 mg, 0,69 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 4 horas. Se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua (50 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto (B) (330 mg, 96%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7,53 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,39-7,37 (m, 2H), 7,33 (t, J = 1,8 Hz, 1H), 6,90-6,89 (m, 2H), 5,47 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 4,81 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 4,62 (dd, J = 7,2, 3,0 Hz, 1H), 4,49-4,41 (m, 2H), 3,97-3,93 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,76-3,72 (m, 1H), 3,68-3,64 (m, 1H), 3,17-3,10 (m, 3H), 2,96 (s, 3H), 0,98 (t, J = 8,4 Hz, 2H), 0,02 (s, 9H).

IE-EM m/z: 603(M^+)

Compuesto (C)

A una disolución del compuesto (B) (330 mg, 0,55 mmol) en DMF (3 ml) a temperatura ambiente se le añadió azida de sodio (43 mg, 0,66 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 60°C durante 3 horas. Se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua (50 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto (C) (307 mg, 99%) como un sólido amarillo.

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7,54 (s, 1H), 7,38-7,37 (m, 3H), 7,34 (t, J = 1,8 Hz, 1H), 6,90-6,88 (m, 2H), 5,49 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 4,76 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 4,63 (dd, J = 7,2, 3,0 Hz, 1H), 3,96-3,93 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,79-3,75 (m, 1H), 3,69-3,65 (m, 1H), 3,52-3,50 (m, 2H), 3,16-3,12 (m, 1H), 3,03-2,99 (m, 1H), 2,96-2,91 (m, 1H), 0,99 (t, J = 8,4 Hz, 2H), 0,02 (s, 9H).

IE-EM m/z: 550(M^+)

Compuesto (1-1)

A una disolución del compuesto (C) (500 mg, 0,91 mmol) en tetrahidrofurano (2 ml) y agua destilada (0,5 ml) a temperatura ambiente se le añadió trifetilfosfina (285 mg, 1,09 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 40°C durante 13 horas. Se añadieron acetato de etilo (200 ml) y agua (100 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto (1-1) (435 mg, 93%) como un sólido amarillo.

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7,50 (s, 1H), 7,38-7,36 (m, 3H), 7,33 (t, J = 1,8 Hz, 1H), 6,90-6,88 (m, 2H), 5,47 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 4,81 (d, J = 9,6 Hz, 1H), 4,67 (dd, J = 7,2, 3,0 Hz, 1H), 3,95-3,92 (m, 1H), 3,91 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,76-3,72 (m, 1H), 3,68-3,64 (m, 1H), 3,15-3,10 (m, 2H), 3,06-2,96 (m, 2H), 2,94-2,88 (m, 1H), 2,86-2,80 (m, 1H), 0,98 (t, J = 8,4 Hz, 2H), 0,02 (s, 9H).

IE-EM m/z: 524(M^+)

Compuesto 3

A una disolución del compuesto 7 del ejemplo 2-4 (126 mg, 0,190 mmol) y el compuesto (1-1) (100 mg, 0,190 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se le añadió trietilamina (TEA, 80 μl , 0,57 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 3 (178 mg, 89%).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 7,46 (s, 1H), 7,37 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,34 (m, 2H), 7,22 (m, 1H), 6,87 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,71 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 6,60 (m, 1H), 5,44 (d, J = 10,4 Hz, 1H), 5,34 (m, 2H), 5,27 (m, 1H), 5,16 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,07 (s, 2H), 4,82~4,77 (m, 2H), 4,68 (d, J = 2,0 Hz, 2H), 4,60 (m, 1H), 4,19 (d, J = 9,2 Hz, 1H), 3,93 (m, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,72~3,61 (m, 5H), 3,45 (m, 2H), 3,11 (m, 1H), 2,93~2,84 (m, 2H), 2,51 (s, 1H), 2,05 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 2,03 (s, 3H), 0,97 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 0,01 (s, 9H)

Compuesto 4

A una disolución del compuesto 3 (100 mg, 0,094 mmol) en metanol (5 ml) a 0°C se le añadió hidróxido de litio (40 mg, 1,880 mmol) en agua destilada (2 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se retiró el metanol a presión reducida. Se diluyó el residuo con agua destilada (50 ml) y se acidificó lentamente con ácido acético hasta pH = 3. Se realizó la extracción tres veces con

diclorometano (3 x 50 ml). Se concentró el producto resultante a presión reducida para proporcionar un compuesto sólido. Se lavó el compuesto sólido con dietil éter (50 ml) para dar el compuesto 4 (86,5 mg, 100%).

^1H RMN (600 MHz, CD_3OD) δ 7,43 (s, 1H), 7,41 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7,30 (d, $J=10,2$ Hz, 2H), 7,14 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 6,90 (d, $J=9$ Hz, 2H), 6,86 (m, 1H), 6,66 (m, 1H), 5,22 (m, 2H), 4,98~4,94 (m, 3H), 4,71~4,67 (m, 3H), 3,96 (m, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 3,75 (m, 1H), 3,59~3,47 (m, 5H), 3,36 (m, 2H), 3,25 (m, 1H), 3,13 (m, 1H), 2,90 (s, 1H), 2,85 (m, 2H), 0,83 (m, 2H), 0,01 (s, 9H)

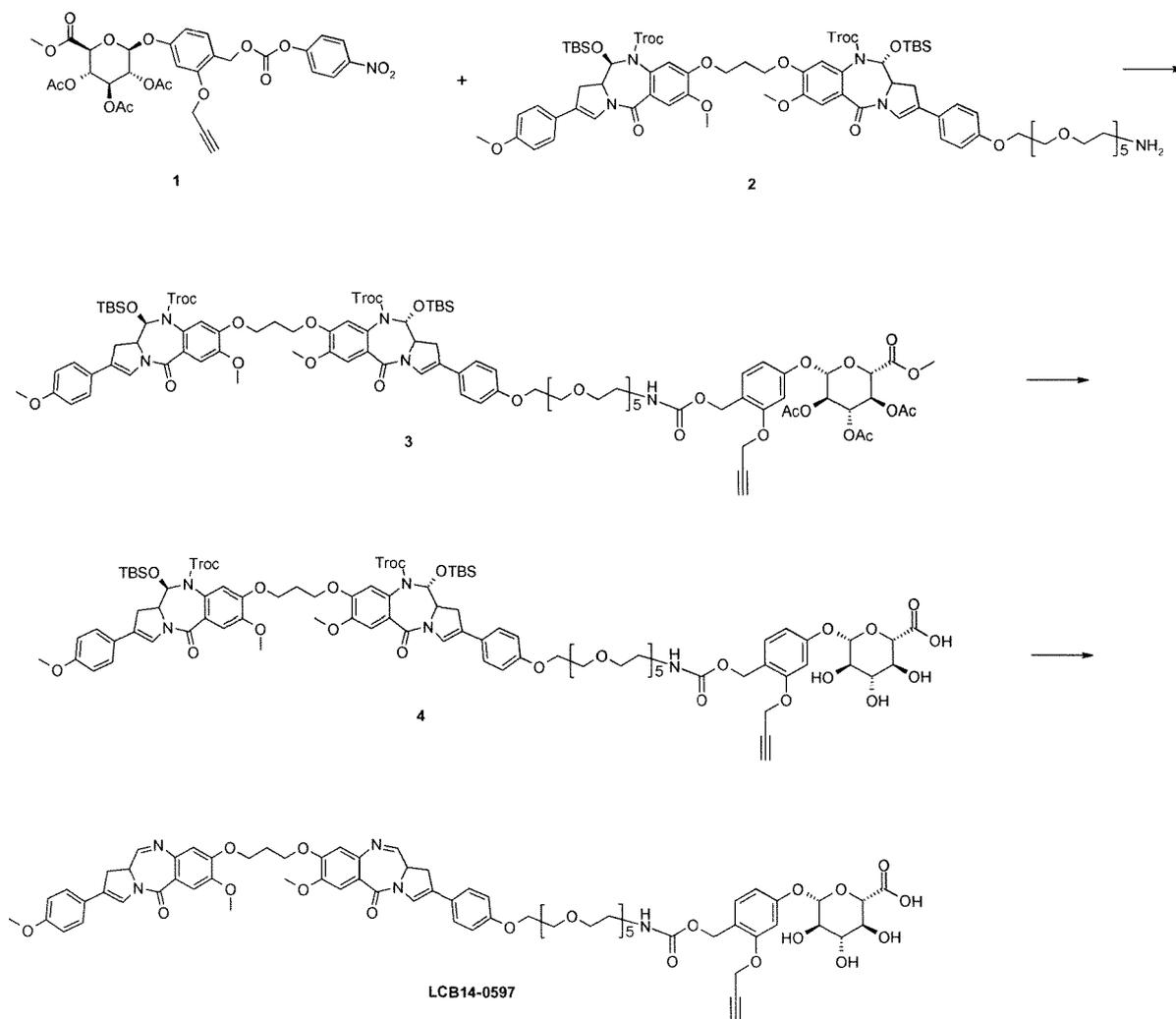
IE-EM m/z: 904(M^+)

LCB14-0596

A una disolución del compuesto 4 (86,5 mg, 0,094 mmol) en tetrahidrofurano (1 ml) y etanol (1 ml) a 0°C se le añadió una disolución de tetrahidrofurano 2 M en borohidruro de litio (940 ml, 1,88 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 12 horas. Se añadió disolución adicional de tetrahidrofurano 2 M en borohidruro de litio (1,41 ml, 2,82 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 5 horas y se enfrió hasta 0°C . Se extinguió la reacción mediante la adición de disolución ácido fórmico al 1% (33 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se realizó la extracción con agua destilada (50 ml) y una disolución de mezcla de acetato de etilo (20 ml) y metanol (10 ml). Se sometió el residuo a cromatografía en columna usando cloroformo/metanol/ácido fórmico (V:V:V=9:1:0,05) para dar el compuesto LCB14-0596 (50 mg, 69%).

IE-EM m/z: 756(M^+)

2-19. Grupo conector de glucurónido-dímero de PBD (LCB14-0597)



Compuesto 3

A una disolución del compuesto 7 del ejemplo 2-4 (150 mg, 0,220 mmol) y el compuesto 2 del ejemplo 2-17 (365 mg, 0,220 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se le añadió trietilamina (95 μ l, 0,66 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (100 ml) y agua destilada (100 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 3 (310 mg, 64%).

^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,35 (m, 2H), 7,30~7,25 (m, 7H), 6,90 (m, 4H), 6,78 (s, 2H), 6,73 (d, $J=2,4$ Hz, 1H), 6,60 (dd, 8,4, 1,8 Hz, 1H), 5,90 (d, $J=2,4$ Hz, 2H), 5,36~5,32 (m, 2H), 5,27 (m, 2H), 5,22 (m, 2H), 5,13 (d, $J=7,2$ Hz, 1H), 5,09 (s, 2H), 4,69 (d, $J=2,4$ Hz, 2H), 4,29 (m, 2H), 4,17~4,13 (m, 6H), 3,94 (m, 8H), 3,85 (t, $J=4,8$ Hz, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,71 (m, 2H), 3,67~3,59 (m, 14H), 3,54 (t, $J=4,8$ Hz, 2H), 3,39~3,31 (m, 4H), 2,82 (m, 2H), 2,52 (t, $J=2,4$ Hz, 1H), 2,44 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 2,04 (s, 3H), 0,91 (s, 18H), 0,26 (2s, 12H)

Compuesto 4

A una disolución del compuesto 3 (100 mg, 0,047 mmol) en metanol (3 ml) y tetrahidrofurano (1,5 ml) a 0°C se le añadió hidróxido de litio (20 mg, 0,47 mmol) en agua destilada (1,5 ml). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se retiró el disolvente orgánico a presión reducida. Se diluyó el residuo con agua destilada (50 ml) y se acidificó lentamente con disolución de HCl 0,5 N hasta pH = 3. Se realizó la extracción tres veces con diclorometano (3 x 50 ml). Se concentró el extracto a presión reducida para dar el compuesto 4 (93,4 mg, 100%).

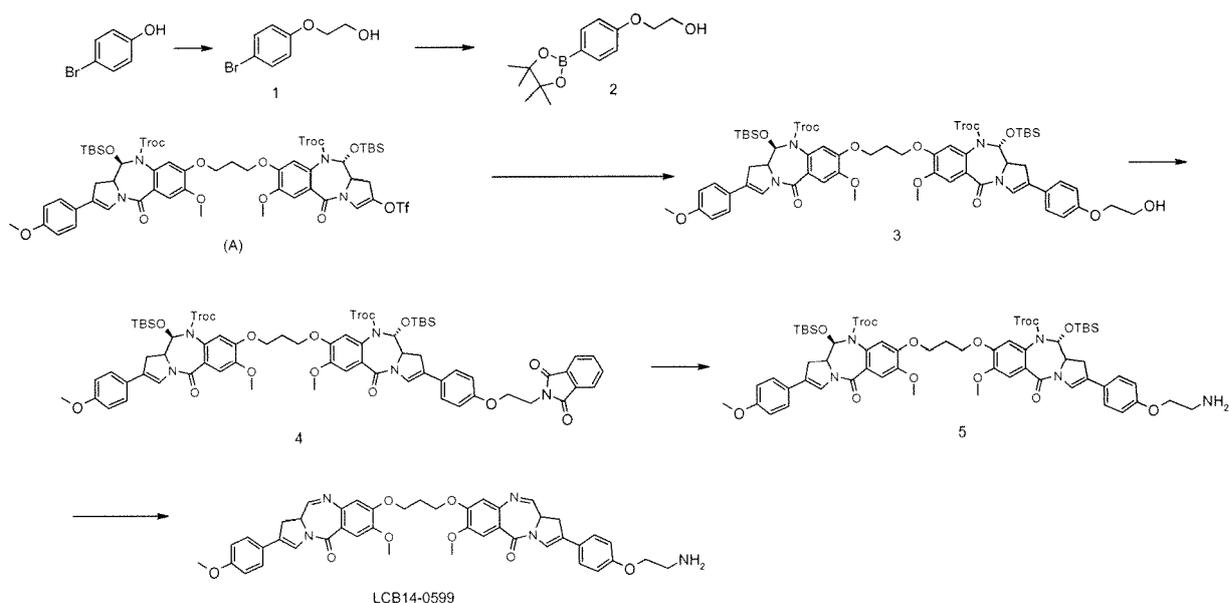
^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 7,35 (m, 2H), 7,30~7,24 (m, 7H), 4,89 (m, 4H), 6,78 (m, 3H), 6,64 (m, 1H), 5,91 (m, 2H), 5,65 (m, 1H), 5,21 (m, 2H), 5,07 (m, 2H), 4,89 (m, 1H), 4,67 (m, 2H), 4,28 (m, 2H), 4,18~4,12 (m, 6H), 3,93 (m, 8H), 3,85~3,82 (m, 5H), 3,72 (m, 2H), 3,65~3,54 (m, 20H), 3,34~3,32 (m, 4H), 2,82 (m, 2H), 2,56 (m, 1H), 2,44 (m, 2H), 0,90 (2s, 18H), 0,25 (2s, 12H)

LCB 14-0597

A una disolución del compuesto 4 (90 mg, 0,045 mmol) en tetrahidrofurano (1,5 ml) se le añadieron acetato de amonio 1 N (1,2 ml) y una pareja de cadmio al 10% /plomo (120 mg). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron acetato de etilo (50 ml) y agua destilada (50 ml). Se secó la fase orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto LCB14-0597 (16,4 mg, 26%).

IE-EM m/z: 1371(M^+)

2-20. Amino-PegI-dímero de PBD (LCB14-0599)

Compuesto 1

A una disolución de 4-bromofenol (4,0g, 23,1 mmol) en etanol (18 ml) a temperatura ambiente se le añadieron

hidróxido de sodio (1,0 g, 25,40 mmol) y 2-bromoetanol (1,7 ml, 23,10 mmol). Se añadieron acetato de etilo (500 ml) y agua (200 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto 1 (4,3 g, 86%) en forma líquida.

5 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7,39-7,36 (m, 2H), 6,81-6,78 (m, 2H), 4,05-4,03 (m, 2H), 3,95 (t, $J = 4,2$ Hz, 2H), 2,18 (s a, 1H).

Compuesto 2

10 A una disolución del compuesto 1 (0,3 g, 1,38 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml) a temperatura ambiente se le añadieron bis(pinacolato)diboro (0,35 g, 1,38 mmol), acetato de potasio (0,41 g, 4,14 mmol) y $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (56 mg, 0,07 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 70°C durante 12 horas, y luego se concentró a presión reducida. Se realizó la filtración con acetato de etilo. Se concentró la disolución filtrada a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto 2 (0,36g, 97%).

15 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7,76-7,75 (m, 2H), 6,92-6,91 (m, 2H), 4,11 (t, $J = 4,2$ Hz, 2H), 3,97-3,96 (m, 2H), 1,99 (s a, 1H), 1,33 (s, 12H).

Compuesto 3

20 Se añadieron carbonato de sodio (17 mg, 0,16 mmol), agua destilada (1 ml) y etanol (1 ml) a una disolución del compuesto (A) (85 mg, 0,11 mmol), que se preparó según los métodos descritos en los documentos WO2006/111759, WO2010/043880 y WO2010/010347, y el compuesto 2 (35 mg, 0,13 mmol) en tolueno (2 ml). Después de que se agitó la mezcla resultante durante 5 minutos, se añadió $\text{Pd}(\text{TPP}_3)_4$ (22 mg, 0,02 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Se añadieron acetato de etilo (10 ml) y agua (10 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto 3 (79 mg, 53%) como un sólido amarillo.

25 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7,36-7,35 (m, 2H), 7,32-7,25 (m, 6H), 6,92-6,89 (m, 4H), 6,78 (s, 2H), 5,92 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 5,22 (d, $J = 12,0$ Hz, 2H), 4,30-4,28 (m, 2H), 4,17-4,10 (m, 6H), 3,98-3,94 (m, 4H), 3,94 (s, 6H), 3,83 (s, 3H), 3,37-3,32 (m, 2H), 2,85-2,82 (m, 2H), 2,46-2,44 (m, 2H), 1,98 (s a, 1H), 0,91 (s, 18H), 0,26 (2s, 12H).

IE-EM m/z: 1387(M^+)

Compuesto 4

35 A una disolución del compuesto 3 (77 mg, 0,06 mmol) en tetrahidrofurano (2 ml) a temperatura ambiente se le añadieron de manera secuencial trifenilfosfina (18 mg, 0,07 mmol), ftalimida (10 mg, 0,07 mmol) y DIAD (13 μl , 0,07 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 12 horas. Se añadieron acetato de etilo (10 ml) y agua (10 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto 4 (72 mg, 87%) como un sólido amarillo.

40 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7,88-7,86 (m, 2H), 7,77-7,75 (m, 2H), 7,39-7,36 (m, 2H), 7,30-7,24 (m, 6H), 6,90-6,86 (m, 4H), 6,78 (d, $J = 1,8$ Hz, 2H), 5,92- 5,88 (m, 2H), 5,24-5,22 (m, 2H), 4,28-4,24 (m, 4H), 4,17-4,11 (m, 6H), 3,98-3,90 (m, 8H), 3,83 (s, 3H), 3,36-3,29 (m, 2H), 2,85-2,78 (m, 2H), 2,47-2,43 (m, 2H), 0,91 (d, $J = 1,8$ Hz, 18H), 0,27-0,24 (m, 12H).

IE-EM m/z: 1516(M^+)

Compuesto 5

50 Se trató una disolución del compuesto 4 (70 mg, 0,05 mmol) en etanol (2 ml) a temperatura ambiente con hidrazina monohidratada (12 μl , 0,23 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 60°C durante 5 horas. Se separó por filtración el sólido usando acetato de etilo (10 ml). Se concentró el filtrado a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con diclorometano y metanol para dar el compuesto 5 (64 mg, 63%).

55 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ : 7,36-7,35 (m, 2H), 7,32-7,25 (m, 6H), 6,92-6,89 (m, 4H), 6,78 (s, 2H), 5,92 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H), 5,22 (d, $J = 12,0$ Hz, 2H), 4,30-4,28 (m, 2H), 4,17-4,10 (m, 6H), 3,98-3,94 (m, 4H), 3,94 (s, 6H), 3,83 (s, 3H), 3,37-3,32 (m, 2H), 2,85-2,82 (m, 2H), 2,46-2,44 (m, 2H), 1,98 (s a, 1H), 0,91 (s, 18H), 0,26 (2s, 12H).

60 IE-EM m/z: 1386(M^+)

LCB14-0599

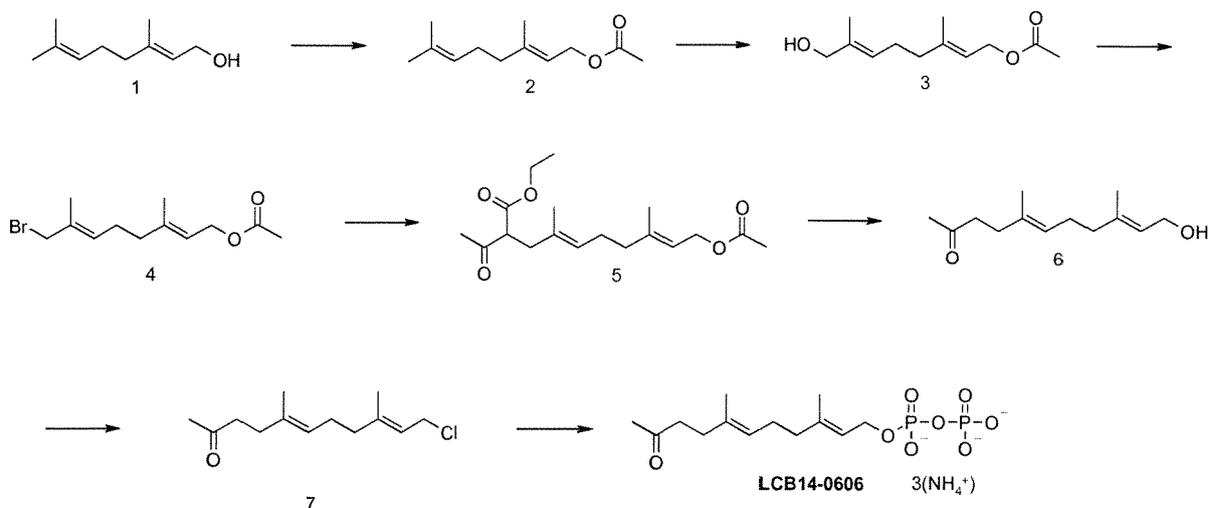
65 A una disolución del compuesto 5 (30 mg, 0,02 mmol) en tetrahidrofurano (2 ml) a temperatura ambiente se le

añadieron disolución de acetato de amonio 1 N (0,6 ml) y una pareja de cadmio al 10% /plomo (60 mg). Se agitó la mezcla resultante durante 4 horas. Se separó por filtración el sólido usando acetato de etilo (10 ml). Se concentró el filtrado a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con diclorometano y metanol para dar el compuesto LCB14-0599 (9,0 mg, 60%) como un sólido amarillo.

5 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3 , CD_3OD _1 gota) δ : 7,54-7,49 (m, 3H), 7,35-7,30 (m, 5H), 7,26 (s, 1H), 6,93-6,86 (m, 5H), 6,51 (s, 1H), 6,29 (s, 1H), 4,67-4,59 (m, 2H), 4,28-4,09 (m, 6H), 3,85 (s, 9H), 3,31-3,27 (m, 1H), 3,07-3,03 (m, 2H), 2,92-2,89 (m, 1H), 2,39-2,30 (m, 2H), 2,05-2,03 (m, 2H).

10 IE-EM m/z: 770(M^+)

2-21. Derivado de GPP modificado que incluye grupo carbonilo (LCB14-0606)



15 **Compuesto 2**

A una disolución del compuesto 1 (3 g, 19,45 mmol) en piridina a temperatura ambiente se le añadió anhídrido acético (7,9 ml, 77,8 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Se añadieron éter de petróleo (100 ml) y HCl 0,1 N (100 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida para dar el compuesto 2 (3,81 g, 100%) en forma acuosa.

20 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 5,35-5,33 (m, 1H), 5,08-4,58 (m, 1H), 4,59 (d, $J=6,6$ Hz, 2H), 2,11-2,03 (m, 4H), 2,05 (s, 3H), 1,70 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,60 (s, 3H)

25 **Compuesto 3**

A una disolución del compuesto 2 (3,81g, 19,41m ml) en diclorometano (30 ml) a temperatura ambiente se le añadieron de manera secuencial dióxido de selenio (65 mg, 0,58 ml) y *tert*-butilhidroperóxido al 70% (6,72 ml, 48,52 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 20 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron diclorometano (100 ml) y agua (100 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto 3 (1,8 g, 43%) como un líquido.

35 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 5,38-5,30 (m, 2H), 4,59 (d, $J=7,2$ Hz, 2H), 4,00-3,99 (d, $J=6$ Hz, 2H), 2,18-2,15 (m, 2H), 2,10-2,06 (m, 2H), 2,05 (s, 3H), 1,70 (s, 3H), 1,66 (s, 3H)

Compuesto 4

40 A una disolución del compuesto 3 (1,8 g, 8,48 mmol) en diclorometano (18 ml) a 0°C se le añadieron trifetilfosfina (3,33 g, 12,72 mmol) y tetrabromuro de carbono (3,37 g, 10,18 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 0°C durante 4 horas. Se añadieron diclorometano (100 ml) y agua (100 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto 4 (2,33 g, 100%) en forma líquida.

45 ^1H RMN (600 MHz, CDCl_3) δ 5,57-5,55 (m, 1H), 5,35-5,32 (m, 2H), 4,59 (d, $J=7,2$ Hz, 2H), 3,96 (s, 2H), 2,18-2,15 (m, 2H), 2,10-2,07 (m, 2H), 2,05 (s, 3H), 1,75 (s, 3H), 1,70 (s, 3H)

Compuesto 5

A una disolución de hidruro de sodio (348 mg, 8,71 mmol) en tetrahidrofurano (35 ml) a 0°C se le añadió gota a gota una disolución de etilacetato (1,85 ml, 14,52 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml). Después de que se agitó la mezcla resultante a 0°C durante 30 minutos, se añadió lentamente el compuesto 4 (2 g, 7,26 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (5 ml) a 0°C. Se agitó la mezcla resultante a 80°C durante 4 horas. Se añadieron acetato de etilo (80 ml) y agua (80 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna con acetato de etilo y hexano para dar el compuesto 5 (1,56 g, 66%) como un sólido blanco.

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 5,34-5,31 (m, 1H), 5,17-5,14 (m, 1H), 4,60-4,58 (m, 2H), 4,20-4,16 (m, 2H), 3,61 (t, J=7,2 Hz, 2H), 2,55-2,51 (m, 2H), 2,22 (s, 3H), 2,12-2,02 (m, 4H), 2,06 (s, 3H), 1,27 (t, J=7,2 Hz, 3H)

Compuesto 6

A una disolución del compuesto 5 (1,56 g, 4,81 mmol) en etanol (20 ml) se le añadió hidróxido de potasio (2,16 g, 38,47 mmol) con etanol (20 ml). Se agitó la mezcla resultante a 100°C durante 4 horas, se diluyó con etil éter (100 ml) y disolución de HCl 0,1 N (50 ml), y luego se neutralizó con disolución de Na₂CO₃. Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida. Se sometió el residuo a cromatografía en columna para dar el compuesto 6 (819 mg, 81%).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 5,39-5,37 (m, 1H), 5,09-5,07 (m, 1H), 4,15 (d, J=6,6 Hz, 2H), 2,53-2,51 (m, 2H), 2,27-2,24 (m, 2H), 2,13 (s, 3H), 2,12-2,09 (m, 2H), 2,04-2,01 (m, 2H), 1,66 (s, 3H), 1,60 (s, 3H)

Compuesto 7

A una disolución de N-clorosuccinimida (210 mg, 1,57 mmol) en diclorometano (10 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se le añadió lentamente sulfuro de dimetilo (126 µl, 1,71 mmol). Se agitó la mezcla resultante a 0°C durante 5 minutos. Se añadió una disolución del compuesto 6 (300 mg, 1,43 mmol) disuelto en diclorometano (5 ml) a 30°C. Se agitó la mezcla resultante a 0°C durante 2 horas. Después de completarse la reacción, se añadieron n-pentano (100 ml) y agua (100 ml). Se concentró la fase orgánica así obtenida a presión reducida para dar el compuesto 7 (325 mg, 99%).

¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ 5,42 (m, 2H), 5,09 (m, 2H), 4,11 (d, J= 8,4 Hz, 2H), 2,52 (m, 2H), 2,24 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 2,11 (m, 2H), 2,05 (m, 2H), 1,71 (s, 3H), 1,60 (s, 3H).

LCB 14-0606

Se preparó el compuesto LCB 14-0606 según el método similar descrito en JACS, 2010, 132 (12), 4281. A una disolución del compuesto 7 (320 mg, 1,40 mmol) en 7 ml de acetonitrilo a temperatura ambiente se le añadió lentamente una disolución de tris(tetrabutilamonio) hidrógeno pirofosfato (2,25 g, 2,80 mmol) en acetonitrilo (7 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 1 hora. Después de completarse la reacción, se concentró la mezcla resultante a presión reducida por debajo de 25°C. Se sometió el residuo a cromatografía en columna (resina empaquetada BioRad AG 50W-X8, forma de hidrógeno, 15 g) con agua amoniacal:agua diluida (V:V=3:1) y bicarbonato de amonio 25 mM:alcohol isopropílico (V:V=50:1) para dar el compuesto LCB 14-0606 (585 mg, 99%).

¹H RMN (600 MHz, D₂O) δ 5,42 (m, 1H), 5,16 (m, 1H), 4,46 (t, J= 6,6 Hz, 2H), 2,66 (t, J= 7,2 Hz, 2H), 2,25 (t, J= 7,2 Hz, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,14 (m, 2H), 2,06 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,60 (s, 3H)

Ejemplo 3: prenilación de Ac(M)-CAAX

3-1. Métodos de prenilación

Se realizó la prenilación de Ac(M)-CAAX usando NBD-GPP ([3,7-dimetil-8-(7-nitro-benzo[1,2,5]oxadiazol-4-ilamino)-octa-2,6-dieno-1]pirofosfato de tris-amonio) y FTasa (n.º 344146, Calbiochem, EE.UU.) o NBD-FPP (n.º LI-013, Jena Bioscience, Alemania) y GGTasa I (n.º 345852, Calbiochem, EE.UU.).

Se realizó la reacción de prenilación a 30°C durante 3 horas usando una disolución tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) que contenía MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 10 µM y DTT 5 mM. Después de completarse la reacción, se llevó a cabo un análisis de SDS-PAGE. Se usó un analizador de imagen (ChemiDoc XRS+, BioRad, EE.UU.) para identificar la(s) banda(s) de proteína fluorescente para confirmar que la reacción de prenilación había ocurrido.

3-2. Prenilación de Herceptin-HC-CAAX usando FTasa y NBD-GPP

Se prenilaron anticuerpos Herceptin-HC-GCVIM, Herceptin-HC-G₅CVIM (no mostrado), Herceptin-HC-G₇CVIM y

Herceptin-HCG₁₀CVIM usando NBD-GPP y FTasa en el método descrito anterior. Se detectó fluorescencia sobre la(s) banda(s) de proteína correspondiente(s) a la(s) cadena(s) pesada(s) (aproximadamente 50K dalton) de los respectivos anticuerpos. Este resultado confirmó que podrían prenilarse los anticuerpos Herceptin-HC-CAAX, cada uno teniendo un espaciador con diversas longitudes (figura 12).

5

3-3. Prenilación de Herceptin-LC-CAAX usando FTasa y NBD-GPP

Se prenilaron anticuerpos Herceptin-LC-GCVIM, Herceptin-LC-G₅CVIM, Herceptin-LC-G₇CVIM y Herceptin-LC-G₁₀CVIM usando NBD-GPP y FTasa en el método descrito anterior. Se detectó fluorescencia sobre la(s) banda(s) de proteína correspondiente(s) a la(s) cadena(s) ligera(s) (aproximadamente 25K dalton) de los respectivos anticuerpos. Este resultado confirmó que podrían prenilarse los anticuerpos Herceptin-LC-CAAX, cada uno teniendo un espaciador con diversas longitudes (figura 13).

10

3-4. Prenilación de anti cMET-HC-CAAX usando FTasa y NBD-GPP

Se prenilaron anticuerpos anti cMET-HC-G₇CVIM y anti cMET-HC-G₁₀CVIM usando NBD-GPP y FTasa en el método descrito anterior. Se detectó fluorescencia sobre la(s) banda(s) de proteína correspondiente(s) a la(s) cadena(s) pesada(s) (aproximadamente 50K dalton) de los respectivos anticuerpos. Este resultado confirmó que podrían prenilarse los anticuerpos anti cMET-HC-CAAX, cada uno teniendo un espaciador con diversas longitudes (figura 14).

15

20

3-5. Prenilación de anti cMET-LC-CAAX usando FTasa y NBD-GPP

Se prenilaron anticuerpos anti cMET-LC-G₇CVIM y anti cMET-LC-G₁₀CVIM usando NBD-GPP y FTasa en el método descrito anterior. Se detectó fluorescencia sobre la(s) banda(s) de proteína correspondiente(s) a la(s) cadena(s) ligera(s) (aproximadamente 25K dalton) de los respectivos anticuerpos. Este resultado confirmó que podrían prenilarse los anticuerpos anti cMET-LC-CAAX, cada uno teniendo un espaciador con diversas longitudes (figura 15).

25

30

3-6. Prenilación de Herceptin-HC-CAAX usando GGTasa I y NBD-FPP

Se preniló un anticuerpo Herceptin-HC-G₁₀CVLL usando NBD-FPP y GGTasa I en el método descrito anterior. Se detectó fluorescencia sobre la(s) banda(s) de proteína correspondiente(s) a la(s) cadena(s) pesada(s) (aproximadamente 50K dalton) del anticuerpo que está conectado con el resto de CAAX en el extremo C-terminal por medio del espaciador G₁₀. Este resultado confirmó que podrían prenilarse los anticuerpos Herceptin-HC-CAAX mediante GGTasa I (figura 16).

35

3-7. Prenilación de Herceptin-LC-CAAX usando GGTasa I y NBD-FPP

Se preniló un anticuerpo Herceptin-LC-G₁₀CVLL usando NBD-FPP y GGTasa I en el método descrito anterior. Se detectó fluorescencia sobre la(s) banda(s) de proteína correspondiente(s) a la(s) cadena(s) ligera(s) (aproximadamente 25K dalton) del anticuerpo que está conectado con el resto de CAAX en el extremo C-terminal por medio del espaciador G₁₀. Este resultado confirmó que podrían prenilarse los anticuerpos Herceptin-LC-CAAX mediante GGTasa I (figura 16).

40

45

3-8. Prenilación de Herceptin-LC-CAAX usando FTasa e isosustrato

Herceptin-LC-G₇CVIM

Se preniló un anticuerpo Herceptin-LC-G₇CVIM usando LCB14-0512 y FTasa en el método descrito anterior. En el caso donde el anticuerpo prenilado Herceptin-LC-G₇CVIM se sometió a análisis CL/EM en una condición de reducción sin tratar PNGasa F, se predijo que los pesos moleculares teóricos de la cadena pesada y de la cadena ligera serían de 50.597 dalton y 24.480 dalton, respectivamente. Tal como se muestra en la figura 17, los pesos moleculares experimentales de la cadena pesada y de la cadena ligera que se midieron fueron de 50.600 dalton y 24.479 dalton, respectivamente. La diferencia entre los valores de los pesos moleculares teóricos y los valores de los pesos moleculares teóricos experimentales estaba dentro de un intervalo de error estándar. Este resultado confirmó que el anticuerpo Herceptin-LC-G₇CVIM se preniló mediante FTasa y un isosustrato (LCB14-0512).

50

55

Herceptin-LC-G₁₀CVIM

Se preniló un anticuerpo Herceptin-LC-G₁₀CVIM usando LCB14-0512 y FTasa en el método descrito anterior. En el caso donde el anticuerpo prenilado Herceptin-LC-G₁₀CVIM se sometió a análisis CL/EM en una condición de reducción sin tratar PNGasa F, se predijo que los pesos moleculares teóricos de la cadena pesada y de la cadena ligera serían de 50.596 dalton y 24.651 dalton, respectivamente. Tal como se muestra en la figura 18, los pesos moleculares experimentales de la cadena pesada y de la cadena ligera que se midieron fueron de 50.601 dalton y 24.651 dalton, respectivamente. La diferencia entre los valores de los pesos moleculares teóricos y los valores de

60

65

los pesos moleculares teóricos experimentales estaba dentro de un intervalo de error estándar. Este resultado confirmó que el anticuerpo Herceptin-LC-G₁₀CVIM se preniló mediante FTasa y un isosustrato (LCB 14-0512).

Ejemplo 4: conjugación de fármaco usando química clic

4-1. Reoxidación de Ac(M)-CAAX prenilado

Se realizó diafiltración para retirar el exceso de reactivos en el Herceptin-LC-G₇CVIM prenilado preparado según el método descrito anteriormente. Se reoxidó el anticuerpo usando CuSO₄. Se realizó diafiltración para retirar el CuSO₄.

4-2. Conjugación de fármaco de Ac(M)-CAAX usando química clic y fármaco-grupo conector

Se realizó durante 10 minutos la reacción de química clic entre el Herceptin-LC-G₇CVIM prenilado, reoxidado y el compuesto LCB 14-0536. Se sometió a análisis CL/EM al conjugado resultante (LCB14-0104) (figura 26). En el caso donde el anticuerpo se sometió a análisis CL/EM en una condición de reducción sin tratar PNGasa F, se predijo que los pesos moleculares teóricos de la cadena pesada y de la cadena ligera serían de 49.153 dalton y 25.410 dalton, respectivamente. Tal como se muestra en la figura 19, los pesos moleculares experimentales de la cadena pesada y de la cadena ligera que se midieron fueron de 49.154 dalton y 25.408 dalton, respectivamente. La diferencia entre los valores de los pesos moleculares teóricos y los valores de los pesos moleculares teóricos experimentales estaba dentro de un intervalo de error estándar. Este resultado confirmó que el anticuerpo prenilado Herceptin-LC-G₇CVIM formó un conjugado con un fármaco mediante reacción de química clic.

4-3. Análisis de conjugados Herceptin-LC-CAAX-fármaco

Se sometió a cromatografía líquida de alta resolución-cromatografía de interacción hidrófoba con columna Eter-5PW (7,5 x 75 mm, 10 μm, Tosoh Bioscience, EE.UU.) al conjugado LCB 14-0101. Se usó tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0) que contenía sulfato de amonio 1,5 M como tampón A y se usó tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0) que contenía alcohol isopropílico al 20% como tampón B. Se mantuvo A al 90%/B al 10% durante 5 minutos. Se realizó la elución usando un gradiente lineal desde A al 90%/B al 10% hasta A al 10%/B al 90% durante los siguientes 30 minutos. Se ajustaron la velocidad de flujo y la temperatura a 0,8 ml/min y 25°C, respectivamente. Se siguió la detección tanto a 254 como a 280 nm. Se usaron Herceptin-LC-G₇CVIM sin modificar y Herceptin-LC-G₇CVIM prenilado como controles. Los tiempos de retención del Herceptin-LC-G₇CVIM sin modificar, del Herceptin-LC-G₇CVIM prenilado y del conjugado LCB14-0101 fueron 9,6, 11,7 y 12,4 minutos (figura 20), respectivamente.

Ejemplo 5: antiproliferación de ADC

5-1. Líneas celulares

Se usaron las líneas celulares de cáncer de mama humano comercialmente disponibles MCF-7 (HER2 de negativo a normal), MDA-MB-468 (HER2 negativo) y SK-BR-3 (HER2 positivo). Se cultivaron las líneas celulares según las especificaciones recomendadas proporcionadas con las líneas celulares comercialmente disponibles.

5-2. Muestras de prueba

Como un anticuerpo, se usaron anticuerpo Herceptin comercialmente disponible y Herceptin-LC-G₇CVIM. Como un fármaco, se usaron LCB14-0537 (MMAF), LCB14-0508 (MMAF-OMe) y LCB14-0562 (MMAE). Como un conjugado proteína-agente activo, se usaron LCB14-0101, LCB14-0102 y LCB14-0103 (figura 26). Se preniló el Herceptin-LC-G₇CVIM usando LCB14-0512. Se sometió a reacción clic el Herceptin-LC-G₇CVIM prenilado usando LCB14-0592 para conjugar grupo conector β-glucurónido (BG)-MMAF, preparándose así LCB14-0101. Además, se sometió a reacción clic el Herceptin-LC-G₇CVIM prenilado usando LCB14-0589 para conjugar grupo conector Val-Cit (VC)-MMAF-OMe, preparándose así LCB14-0102. Además, sometió a reacción clic el Herceptin-LC-G₇CVIM prenilado usando LCB14-0598 para conjugar grupo conector β-glucurónido (BG)-MMAE, preparándose así LCB 14-0103.

5-3. Métodos de prueba

Se midieron actividades de antiproliferación de los anticuerpos, fármacos y conjugados con respecto a las líneas celulares de cáncer. Se sembraron en placa las células en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a 1 x 10⁴ células por pocillo. Después de 24 horas de incubación, se añadieron los anticuerpos, fármacos y conjugados en diversas concentraciones. Se contó el número de células viables después de 72 horas usando colorante SRB. Se midió la absorbancia a 540 nm usando un dispositivo SpectraMax 190 (Molecular Devices, EE.UU.).

5-4. Resultados de prueba

LCB 14-0101 (Herceptin-LC-G₇CVIM-BG-MMAF)

5 Herceptin-LC-G₇CVIM tuvo una Cl₅₀ de 10 µg/ml o superior con MCF-7, MDA-MB-468 y SK-BR-3. LCB14-0101 (conjugado de MMAF) tuvo una Cl₅₀ de 8,09 µg/ml y 4,18 µg/ml con MCF-7 y MDA-MB-468, respectivamente, que expresa un bajo nivel o no de HER2, mientras que tuvo una Cl₅₀ de 0,11 µg/ml con SK-BR-3, que sobreexpresa HER2. Además de su excelente actividad inhibidora, LCB14-0101 es aproximadamente 40-80 veces más selectivo que Herceptin-LC-G₇CVIM. Por consiguiente, se confirma que LCB14-0101 tiene tanto potencia de fármaco citotóxica como selectividad anti HER2 (figura 21).

10

LCB 14-0102 (Herceptin-LC-G₇CVIM-VC-MMAF-OM)

15 Herceptin-LC-G₇CVIM tuvo una Cl₅₀ de 10 µg/ml con MCF-7 y SK-BR-3. LCB14-0102 (conjugado de MMAF-OMe) tuvo una Cl₅₀ de 4,38 µg/ml con MCF-7, mientras que tuvo una Cl₅₀ de 0,15 µg/ml con SK-BR-3. Además de su excelente actividad inhibidora, LCB14-0102 es aproximadamente 30 veces más selectivo que Herceptin-LC-G₇CVIM. Por consiguiente, se confirma que LCB14-0102 tiene tanto potencia de fármaco citotóxica como selectividad anti HER2 (figura 22).

20

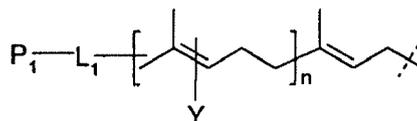
LCB 14-0103 (Herceptin-LC-G₇CVIM-BG-MMAE)

25 LCB 14-0103 (conjugado de MMAE) tuvo una Cl₅₀ de 7,25 µg/ml con MCF-7, mientras que tuvo una Cl₅₀ de 0,072 µg/ml con SK-BR-3. Además de su excelente actividad inhibidora, LCB 14-0103 es aproximadamente 100 veces más selectivo que Herceptin-LC-G₇CVIM. Por consiguiente, se confirma que LCB14-0103 tiene tanto potencia de fármaco citotóxica como selectividad anti HER2 (figura 23).

25

REIVINDICACIONES

1. Conjugado anticuerpo-agente activo, en el que el anticuerpo tiene un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa, en el que el agente activo se une covalentemente al anticuerpo en el resto de aminoácido, en el que el resto de aminoácido es CAAX, XXCC, XCXC o CXX, en los que C representa cisteína, A representa un aminoácido alifático y X representa un aminoácido que determina una especificidad de sustrato de la isoprenoide transferasa; y en el que el resto de aminoácido se une covalentemente al agente activo a través de al menos un grupo conector, en el que el al menos un grupo conector es un derivado de isoprenilo que puede ser reconocido por la isoprenoide transferasa, en el que el grupo conector está representado por la fórmula (I):



(I)

en la que

P_1 e Y son cada uno independientemente un grupo que contiene un primer grupo funcional (FG1), seleccionándose el FG1 del grupo que consiste en: acetileno, azida, aldehído, hidroxilamina, hidrazina, cetona, nitrobenzofurazano (NBD), dansilo, fluoresceína, biotina y rodamina,

L_1 es $(CH_2)RX_q(CH_2)_p$,

X es oxígeno, azufre, $-NR_1-$, $-C(O)NR_1-$, $-NR_1C(O)-$, $-NR_1SO_2-$, $-SO_2NR_1-$, $-(CH=CH)-$, o acetileno,

R_1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -arilo, o alquil C_{1-6} -heteroarilo,

r y p son cada uno independientemente un número entero de 0 a 6,

q es un número entero de 0 a 1, y

n es un número entero de 1 a 4,

en el que el agente activo se une a un grupo que contiene un segundo grupo funcional (FG2) que puede reaccionar con el FG1, en el que el FG2 se selecciona del grupo que consiste en: acetileno, hidroxilamina, azida, aldehído, hidrazina, cetona, y

en el que el agente activo se une al grupo que contiene un FG2 a través de $-(CH_2)RX_q(CH_2)_p-$ o $[ZCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2Z]-$, en el que

X es oxígeno, azufre, $-NR_1-$, $-C(O)NR_1-$, $-NR_1C(O)-$, $-NR_1SO_2$, o $-SO_2NR_1-$,

Z es oxígeno, azufre o NR_1 ,

R_1 es hidrógeno, alquilo C_{1-6} , alquil C_{1-6} -arilo, o alquil C_{1-6} -heteroarilo,

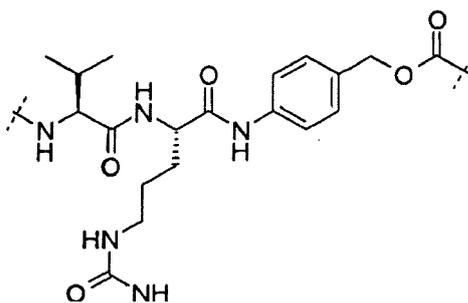
r y p son cada uno independientemente un número entero de 0 a 6,

q es un número entero de 0 a 1, y

w es un número entero de 0 a 6,

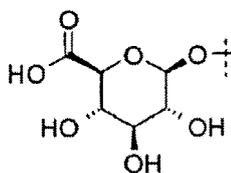
en el que el $-(CH_2)RX_q(CH_2)_p-$ o $-[ZCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_wCH_2CH_2Z]-$ se une a (i) un(os) péptido(s) que puede(n) escindirse por catepsina B o (ii) un glucurónido que puede escindirse por β -glucuronidasa,

en el que el péptido que puede escindirse por catepsina B es



y

5 el glucurónido que puede escindirse por β -glucuronidasa es



10 y en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo de unión a diana, un mutante de Fv de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico generado a partir de al menos dos anticuerpos intactos, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, o una proteína de fusión que comprende un fragmento de anticuerpo de unión a diana.

15 2. Conjugado anticuerpo-agente activo según la reivindicación 1, en el que el agente activo es un fármaco, una toxina, un ligando de afinidad, una sonda de detección, un compuesto inmunomodulador, un agente anticancerígeno, un agente antivírico, un agente antibacteriano, un agente antifúngico o un agente antiparasitario.

20 3. Conjugado anticuerpo-agente activo según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en terapia en un sujeto.

4. Conjugado anticuerpo-agente activo según la reivindicación 3, en el que el sujeto tiene cáncer.

25 5. Conjugado anticuerpo-agente activo según la reivindicación 3, en el que el sujeto tiene una infección con un agente patógeno.

6. Conjugado anticuerpo-agente activo según la reivindicación 5, en el que el agente patógeno es un virus, una bacteria, un hongo o un parásito.

30 7. Método para preparar el conjugado anticuerpo-agente activo según la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo el método:

(a) expresar un anticuerpo unido a un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa;

35 (b) hacer reaccionar enzimáticamente, usando la isoprenoide transferasa, el anticuerpo expresado con al menos un isosustrato que tiene un primer grupo funcional (FG1), produciendo de ese modo un anticuerpo funcionalizado;

40 (c) unir un segundo grupo funcional (FG2) a un agente activo, produciendo de ese modo un agente activo funcionalizado; y

(d) hacer reaccionar el anticuerpo funcionalizado con el agente activo funcionalizado, produciendo de ese modo el conjugado anticuerpo-agente activo,

45 o

(a) expresar un anticuerpo unido a un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa;

50

- (b) unir un isosustrato de la isoprenoide transferasa a un agente activo; y
- (c) hacer reaccionar enzimáticamente, usando la isoprenoide transferasa, el anticuerpo expresado con el agente activo unido al isosustrato.
- 5
8. Método según la reivindicación 7, en el que el método comprende:
- (a) expresar un anticuerpo unido a un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa;
- 10
- (b) hacer reaccionar enzimáticamente, usando la isoprenoide transferasa, el anticuerpo expresado con al menos un isosustrato que tiene un primer grupo funcional (FG1), produciendo de ese modo un anticuerpo funcionalizado;
- (c) unir un segundo grupo funcional (FG2) a un agente activo, produciendo de ese modo un agente activo funcionalizado; y
- 15
- (d) hacer reaccionar el anticuerpo funcionalizado con el agente activo funcionalizado, produciendo de ese modo el conjugado anticuerpo-agente activo.
- 20
9. Método según la reivindicación 7, en el que el método comprende:
- (a) expresar un anticuerpo unido a un resto de aminoácido que puede ser reconocido por una isoprenoide transferasa;
- 25
- (b) unir un isosustrato de la isoprenoide transferasa a un agente activo; y,
- (c) hacer reaccionar enzimáticamente, usando la isoprenoide transferasa, el anticuerpo expresado con el agente activo unido al isosustrato.
- 30
10. Método según la reivindicación 7 u 8, en el que el FG2:
- (a) se une al agente activo mediante al menos un grupo conector, y
- 35
- (b) el FG2 se selecciona de: acetileno, hidroxilamina, azida, aldehído, hidrazina, cetona y amina.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que la reacción entre el anticuerpo funcionalizado y el agente activo funcionalizado es una reacción de química clic o una formación de hidrazona y/u oxima.
- 40
12. Método según la reivindicación 11, en el que
- (i) FG1 es un grupo azida y FG2 es un grupo acetileno, o en el que FG1 es un grupo acetileno y FG2 es un grupo azida; o
- 45
- (ii) FG1 es un grupo aldehído o cetona y FG2 es una hidrazina o hidroxilamina, o en el que FG1 es hidrazina o hidroxilamina y FG2 es un aldehído o una cetona.
13. Composición que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y el conjugado anticuerpo-agente activo según la reivindicación 1 ó 2.
- 50

FIG. 1

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GCVIM

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQOKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSITL
 190 200 210
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK

FIG. 2

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LSDGGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECCGVIM

FIG. 3

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HFFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GGGGGCVIM

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 4

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSGRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIKRSV AAPSVEIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT
 190 200 210 220
 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGECSGGGGG VIM

FIG. 5

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450 460
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GGGGGGCVI M

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSSLT
 190 200 210
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 6

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLT
 190 200 210 220
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGGGGGVIM

FIG. 7

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG[̄] LVQPGGSLRL[̄] SCAASGFNIK[̄] DTYYHWVRQA[̄] PGKGLEWVAR[̄] IYPTNGYTRY[̄]
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI[̄] SADTSKNTAY[̄] LQMNSLRAED[̄] TAVYYCSRWG[̄] GDGFYAMDYW[̄] GQGTLVTVSS[̄]
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP[̄] LAPSSKSTSG[̄] GTAALGCLVK[̄] DYFPEPVTVS[̄] WNSGALTSGV[̄] HTFPAVLQSS[̄]
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT[̄] VPSSSLGTQT[̄] YICNVNHKPS[̄] NTKVDKRVEP[̄] KSCDKTHTCP[̄] PCPAPELLGG[̄]
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP[̄] KDTLMISRTP[̄] EVTCVVVDVS[̄] HEDPEVKFNW[̄] YVDGVEVHNA[̄] KTKPREEQYN[̄]
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT[̄] VLHQDWLNGK[̄] EYKCKVSNKA[̄] LPAPIEKTIS[̄] KAKGQPREPQ[̄] VYTLPPSRDE[̄]
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTCL[̄] LVKGFYPSDI[̄] AVEWESNGQP[̄] ENNYKTTTPV[̄] LDSDGSFFLY[̄] SKLTVDKSRW[̄]
 430 440 450 460
 QQGNVFSCSV[̄] MHEALHNHYT[̄] QKSLSLSPGK[̄] GGGGGGGGGG[̄] CVIM

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS[̄] LSASVGDRV[̄] ITCRASQDVN[̄] TAVAWYQQK[̄] GKAPKLLIYS[̄] ASFLYSGVPS[̄]
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGT[̄] FTLTISSLQP[̄] EDFATYYCQQ[̄] HYTTPPTFGQ[̄] GTKVEIKRSV[̄] AAPSVFIFPP[̄]
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA[̄] SVVCLLNNFY[̄] PREAKVQWKV[̄] DNALQSGNSQ[̄] ESVTEQDSKD[̄] STYLSSTLT[̄]
 190 200 210
 LSKADYEKHK[̄] VYACEVTHQG[̄] LSSPVTKSFN[̄] RGEC

FIG. 8

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG¹ LVQPGGSLRL² SCAASGFNIK³ DTYYHWVRQA⁴ PGKGLEWVAR⁵ IYPTNGYTRY⁶
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI⁷ SADTSKNTAY⁸ LQMNSLRAED⁹ TAVYYCSRWG¹⁰ GDGFYAMDYW¹¹ GQGTLVTVSS¹²
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP¹³ LAPSSKSTSG¹⁴ GTAALGCLVK¹⁵ DYFPEPVTVS¹⁶ WNSGALTSGV¹⁷ HTFPAVLQSS¹⁸
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT¹⁹ VPSSSLGTQT²⁰ YICNVNHNKPS²¹ NTKVDKRVEP²² KSCDKTHTCP²³ PCPAPELLGG²⁴
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP²⁵ KDTLMISRTP²⁶ EVTCVVVDVS²⁷ HEDPEVKFNW²⁸ YVDGVEVHNA²⁹ KTKPREEQYN³⁰
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT³¹ VLHQDWLNGK³² EYKCKVSNKA³³ LPAPIEKTIS³⁴ KAKGQPREPQ³⁵ VYTLPPSRDE³⁶
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC³⁷ LVKGFYPSDI³⁸ AVEWESNGQP³⁹ ENNYKTTTPV⁴⁰ LDSDGSFFLY⁴¹ SKLTVDKSRW⁴²
 430 440 450
 QQGNVFSCSV⁴³ MHEALHNHYT⁴⁴ QKSLSLSPGK⁴⁵

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS¹ LSASVGDRV² ITCRASQDVN³ TAVAWYQQK⁴ GKAPKLLIYS⁵ ASFLYSGVPS⁶
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGT⁷ FTLTISSLQP⁸ EDFATYYCQ⁹ HYTTPPTFG¹⁰ GTKVEIKRSV¹¹ AAPSVFIFPP¹²
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTA¹³ SVVCLLNIFY¹⁴ PREAKVQWKV¹⁵ DNALQSGNSQ¹⁶ ESVTEQDSKD¹⁷ STYLSLSTLT¹⁸
 190 200 210 220
 LSKADYEKHK¹⁹ VYACEVTHQG²⁰ LSSPVTKSFN²¹ RGECCGGGGG²² GGGGCVLM²³

FIG. 9

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450 460
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK GGGGGGGGGG CVLL

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTDTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLT
 190 200 210
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 10

Cadena pesada

10 20 30 40 50 60
 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY
 70 80 90 100 110 120
 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS
 130 140 150 160 170 180
 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 190 200 210 220 230 240
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
 250 260 270 280 290 300
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 310 320 330 340 350 360
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE
 370 380 390 400 410 420
 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 430 440 450
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

Cadena ligera

10 20 30 40 50 60
 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVN TAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPS
 70 80 90 100 110 120
 RFGSRSRGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPP
 130 140 150 160 170 180
 SDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLT
 190 200 210 220
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGGGGGGGCVLL

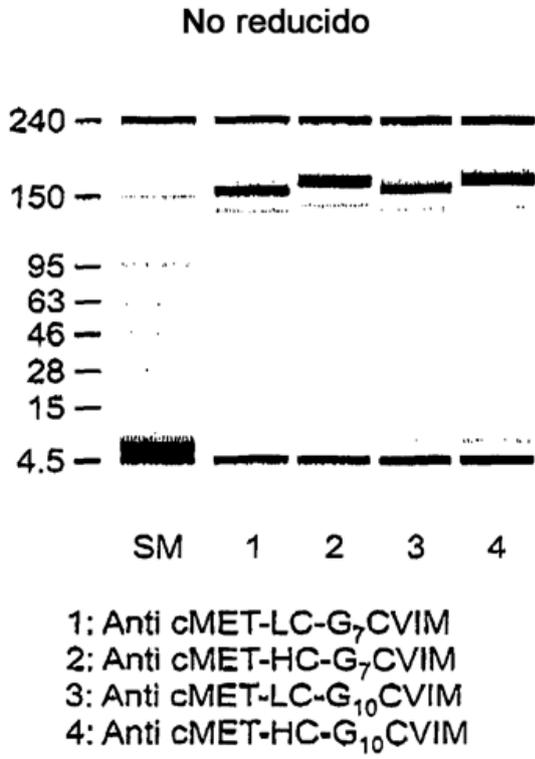


FIG. 11A

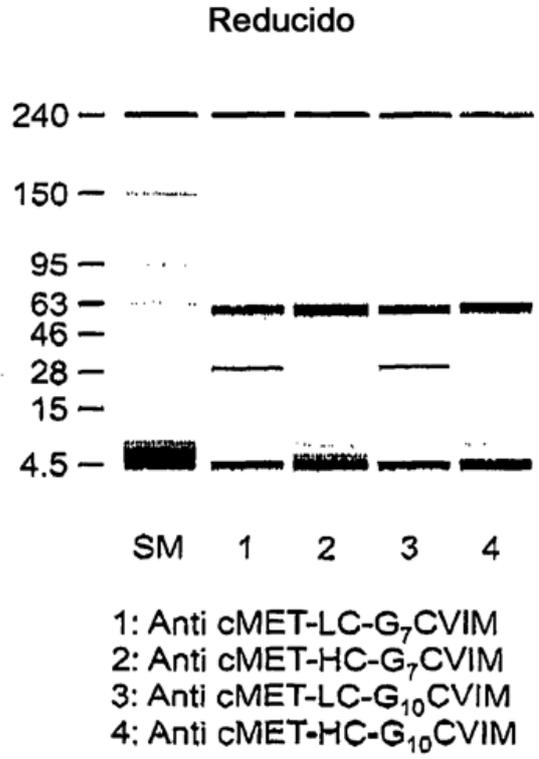
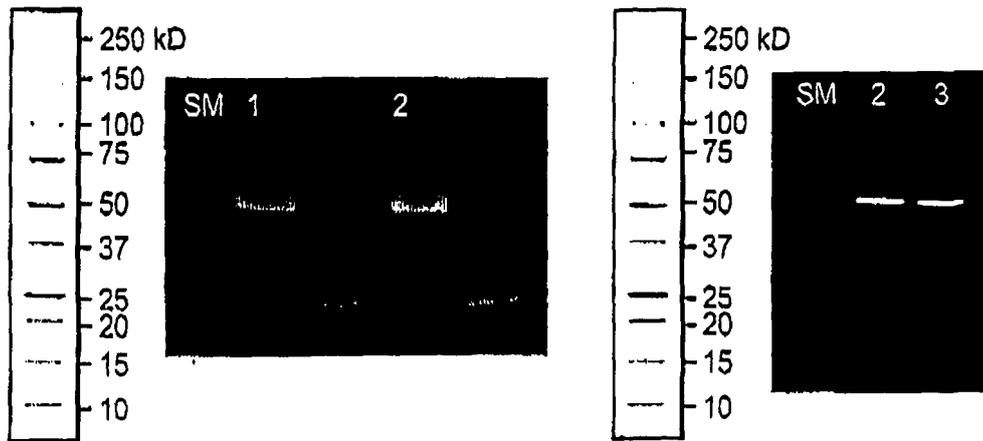
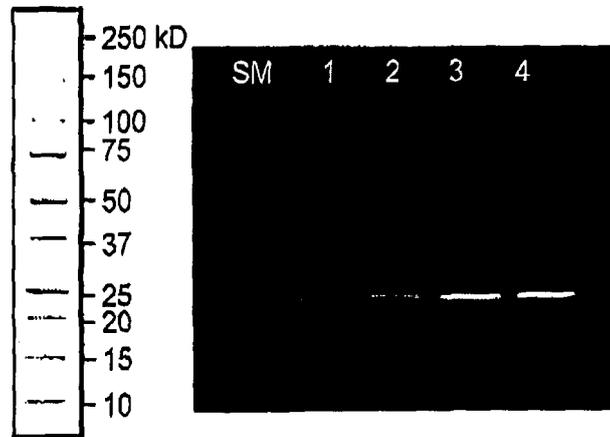


FIG. 11B



- 1: Herceptin-HC-GCVIM
- 2: Herceptin-HC-G₇CVIM
- 3: Herceptin-HC-G₁₀CVIM

FIG. 12



- 1: Herceptin-LC-GCVIM
- 2: Herceptin-LC-G₅CVIM
- 3: Herceptin-LC-G₇CVIM
- 4: Herceptin-LC-G₁₀CVIM

FIG. 13

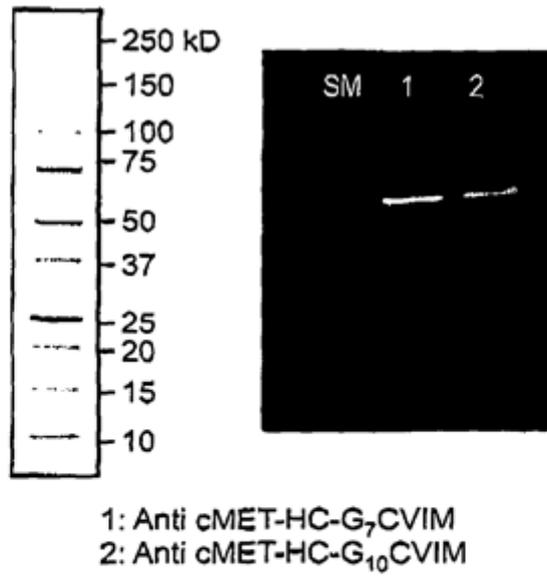


FIG. 14

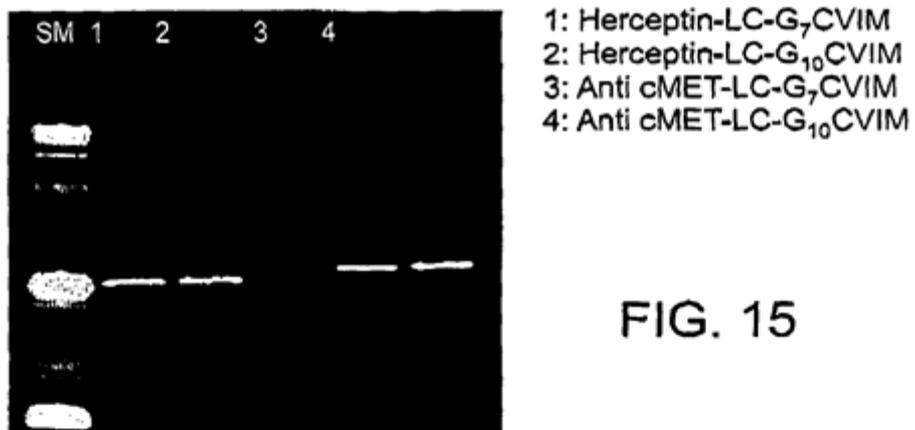


FIG. 15

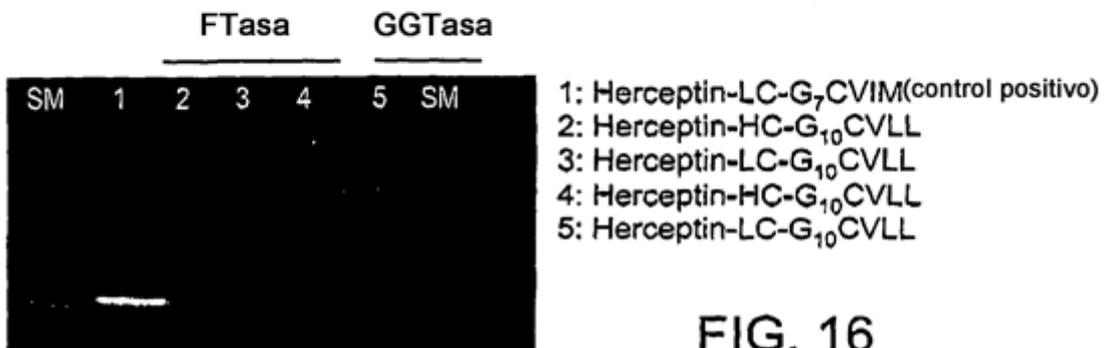


FIG. 16

Muestra	Masa teórica (Dalton)			Masa experimental (Dalton)			Masa Delta (Dalton)
	HC	LC, desnudo	LC, prenilado	HC	LC, desnudo	LC, prenilado	
Herceptin-LC-G ₇ CVIM	49,152*	24,275	-	49,156*	24,274	-	
Herceptin-LC-G ₇ CVIM prenilado	50,597**	24,275	24,480	50,600**	-	24,479	205

*PNGasa F tratada

**PNGasa F no tratada

FIG. 17

Muestra	Masa teórica (Dalton)			Masa (Dalton)			Masa Delta (Dalton)
	HC	LC, desnudo	LC, prenilado	HC	LC, desnudo	LC, prenilado	
Herceptin-LC-G ₁₀ CVIM	49,152*	24,446	-	49,156*	24,445	-	
Herceptin-LC-G ₁₀ CVIM prenilado	50,596**	24,446	24,651	50,601**	-	24,651	206

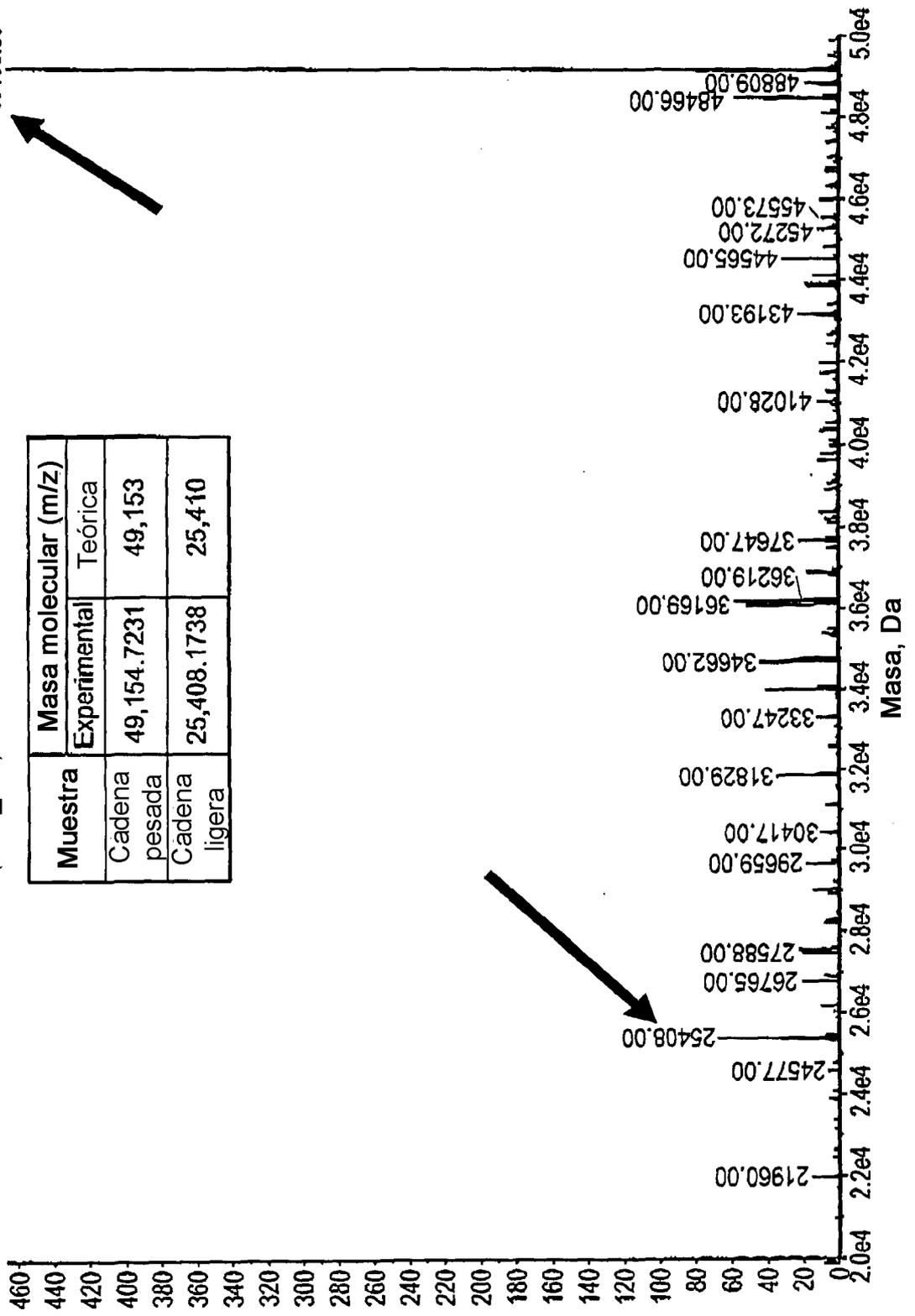
*PNGasa F tratada

**PNGasa F no tratada

FIG. 18

FIG. 19

■ Reconstrucción de masa de deconvolución de +TOF EM: de 15.083 a 19.117 min de la muestra 2 (click_PD) de 11ms140.wiff



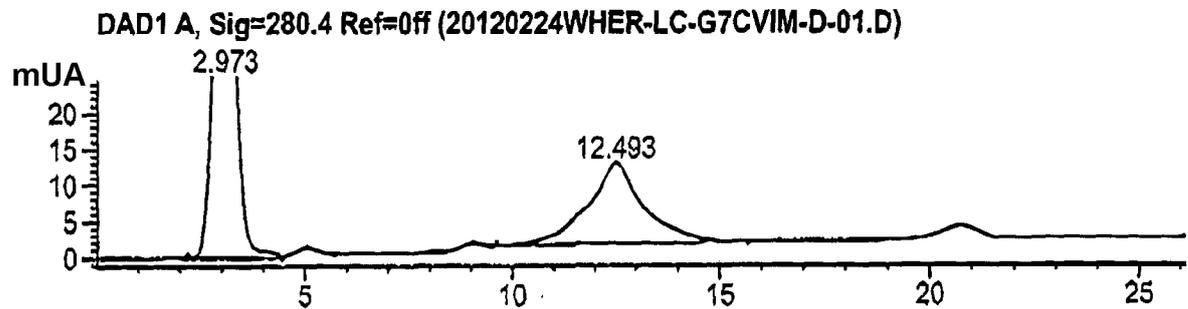
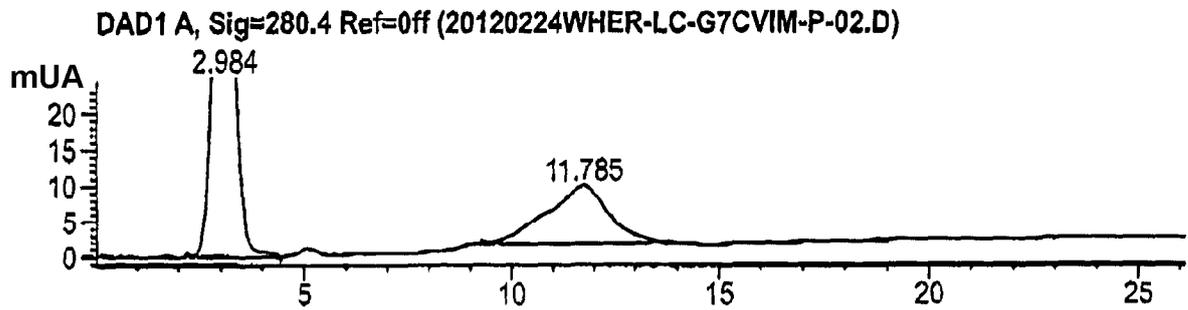
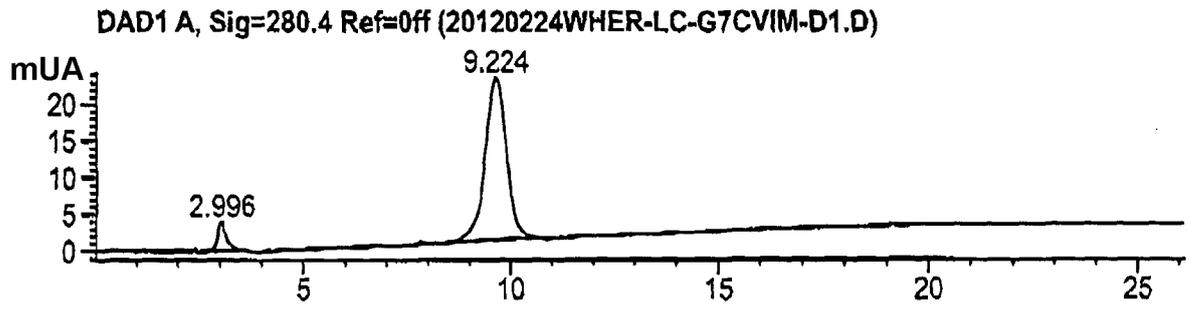


FIG. 20

Compuestos	CI ₅₀ (ug/ml)		
	MCF-7	MDA-MB-468	SK-BR-3
Herceptin-LC-G ₇ CVIM	>10	>10	>10
LCB14-0101 (Herceptin-LC-G ₇ CVIM-BG-MMAF)	8.09	4.18	0.11

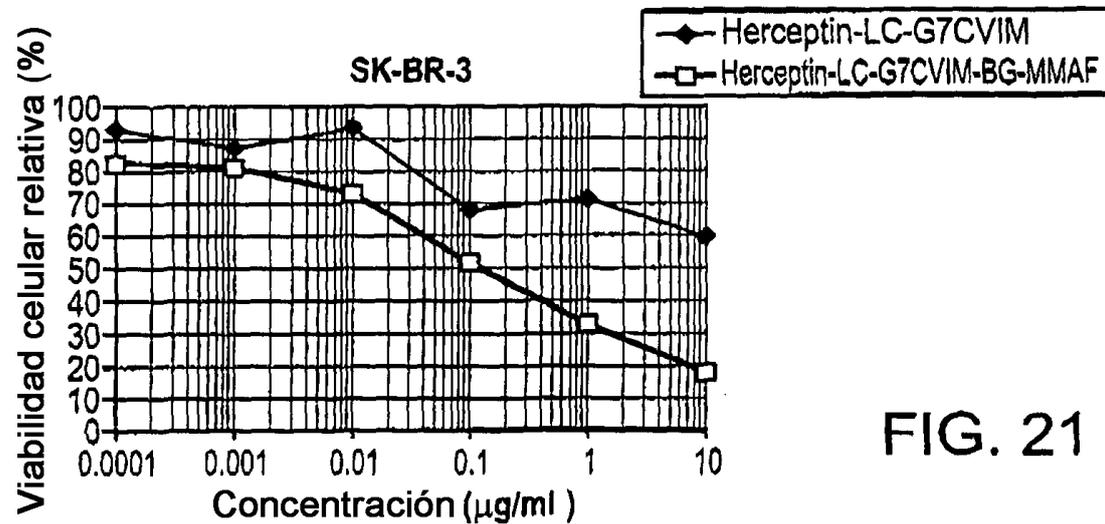
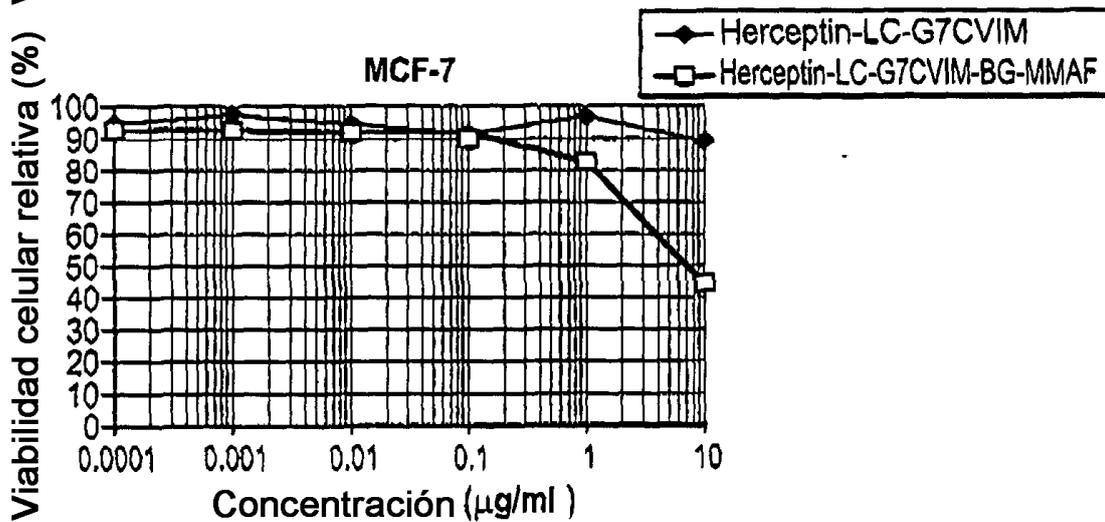
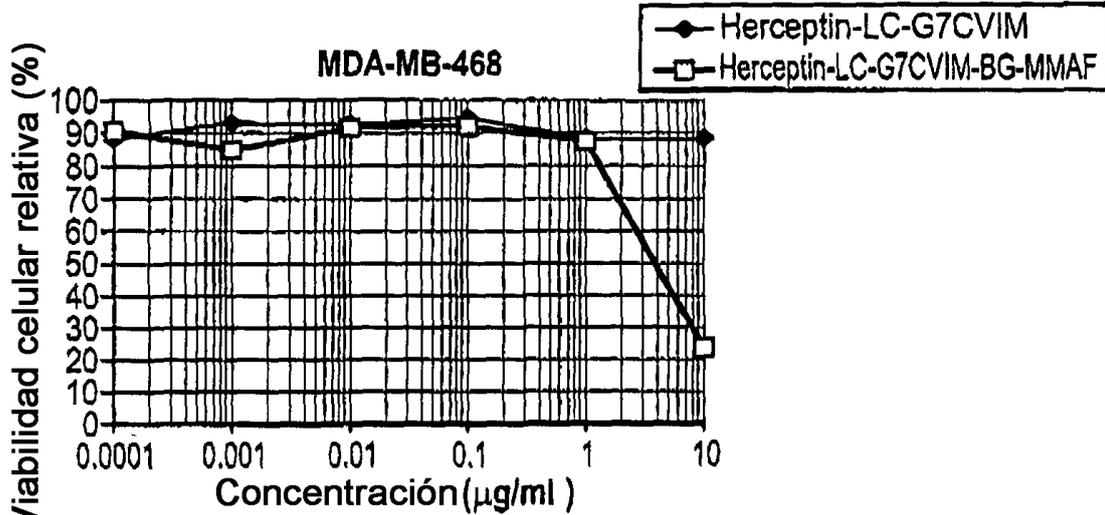


FIG. 21

Compuestos	CI ₅₀ (µg/ml)	
	MCF-7	SK-BR-3
Herceptin-LC-G ₇ CVIM	>10	>10
LCB14-0102 (Herceptin-LC-G ₇ CVIM-VC-MMAF-Ome)	4.38	0.15

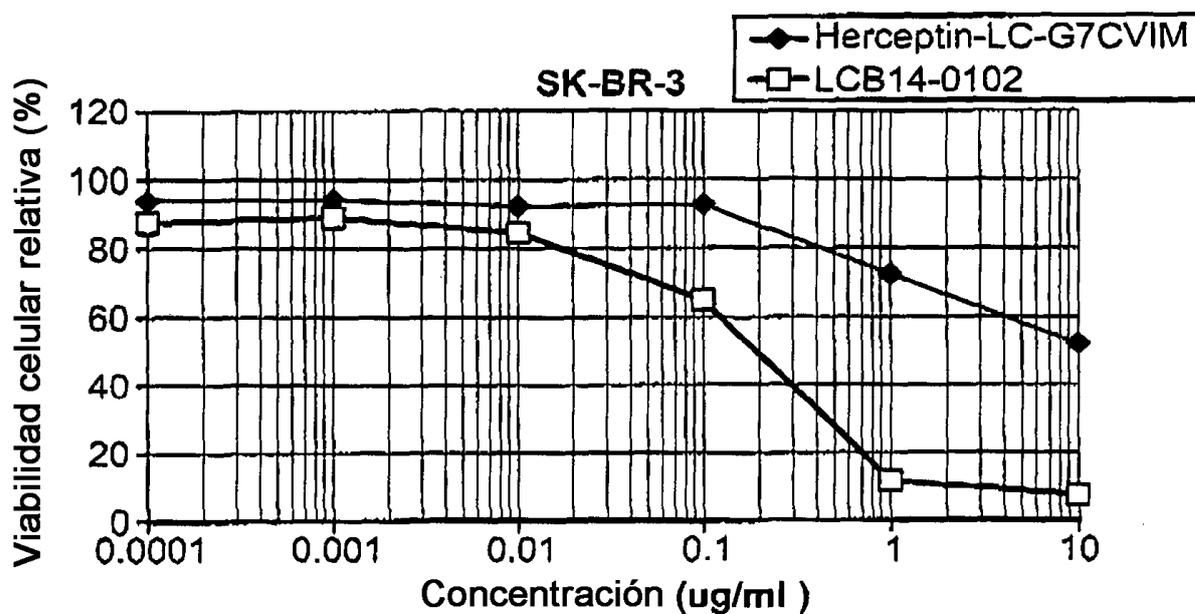
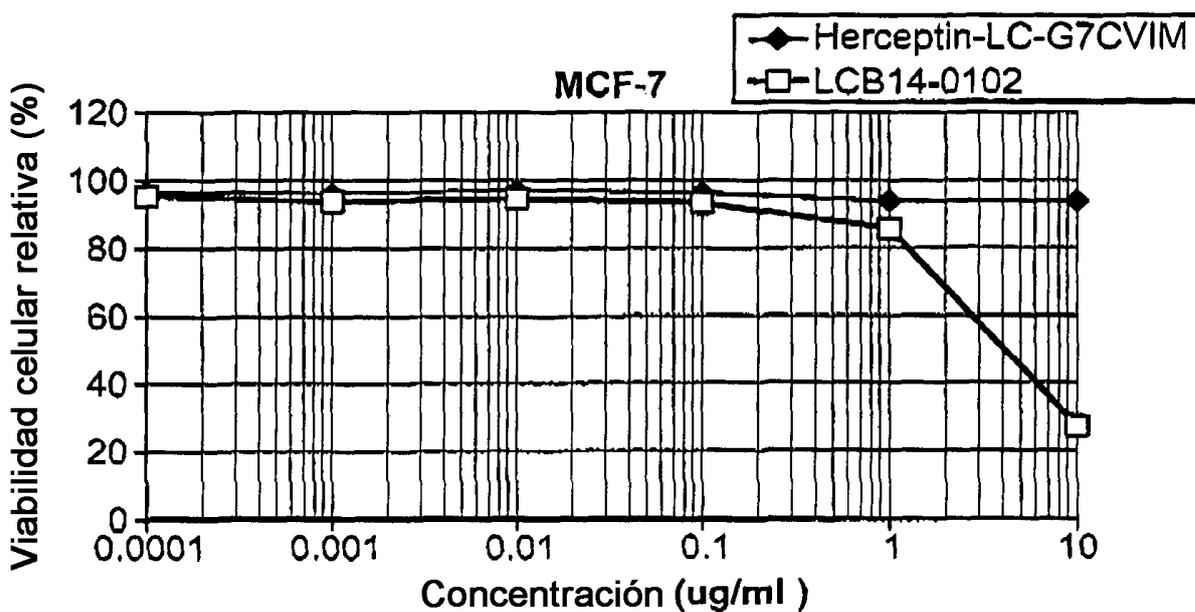


FIG. 22

ADC	CI ₅₀ (µg/ml)	
	MCF-7	SK-BR-3
LCB14-0103 (Herceptin-LC-G7CVIM-BG-MMAE)	7.25	0.072

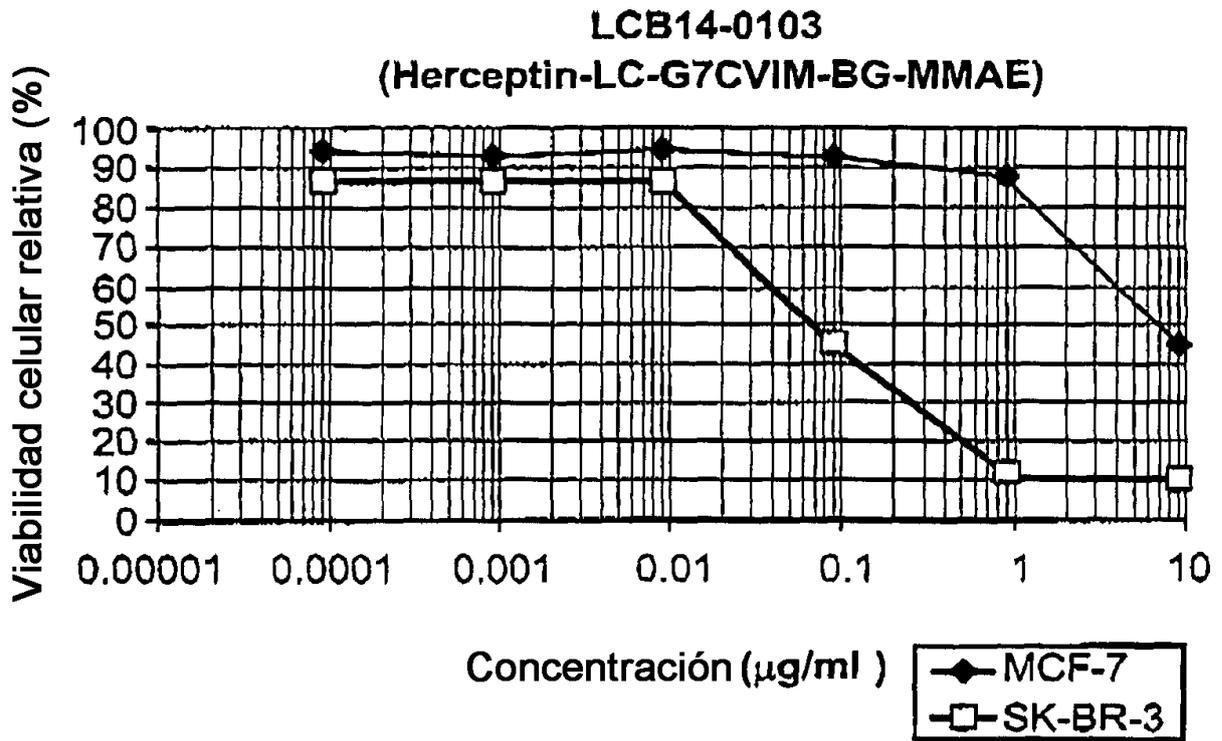


FIG. 23

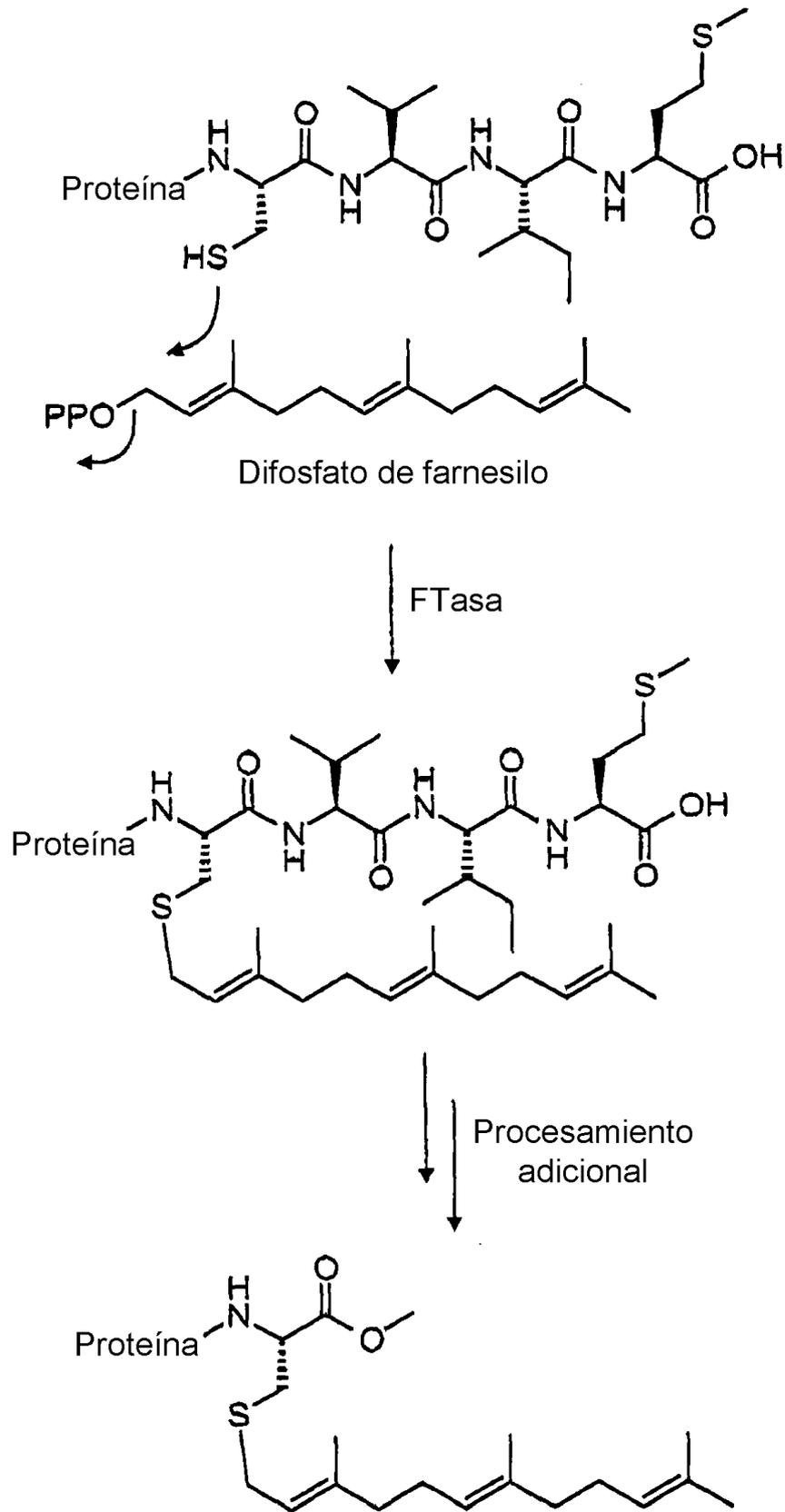
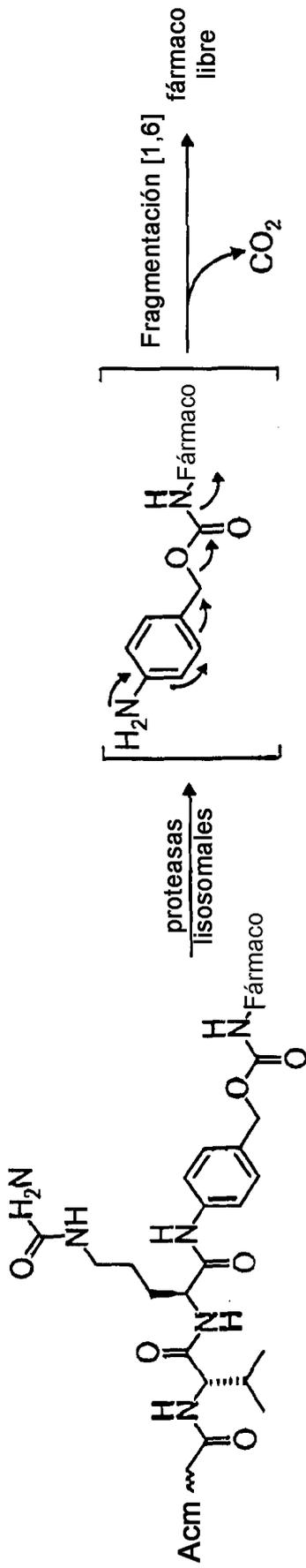


FIG. 24

1) Grupo conector de fármaco basado en Val-Cit



2) Grupo conector de fármaco basado en glucurónido

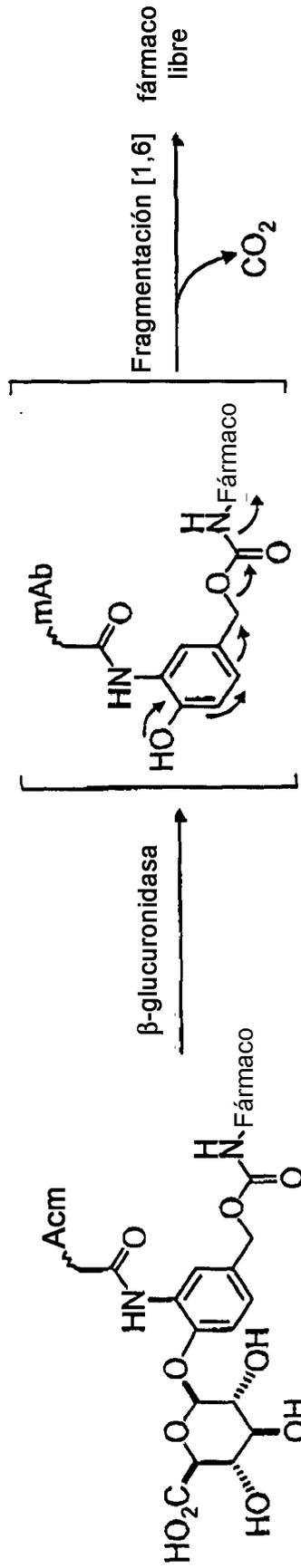
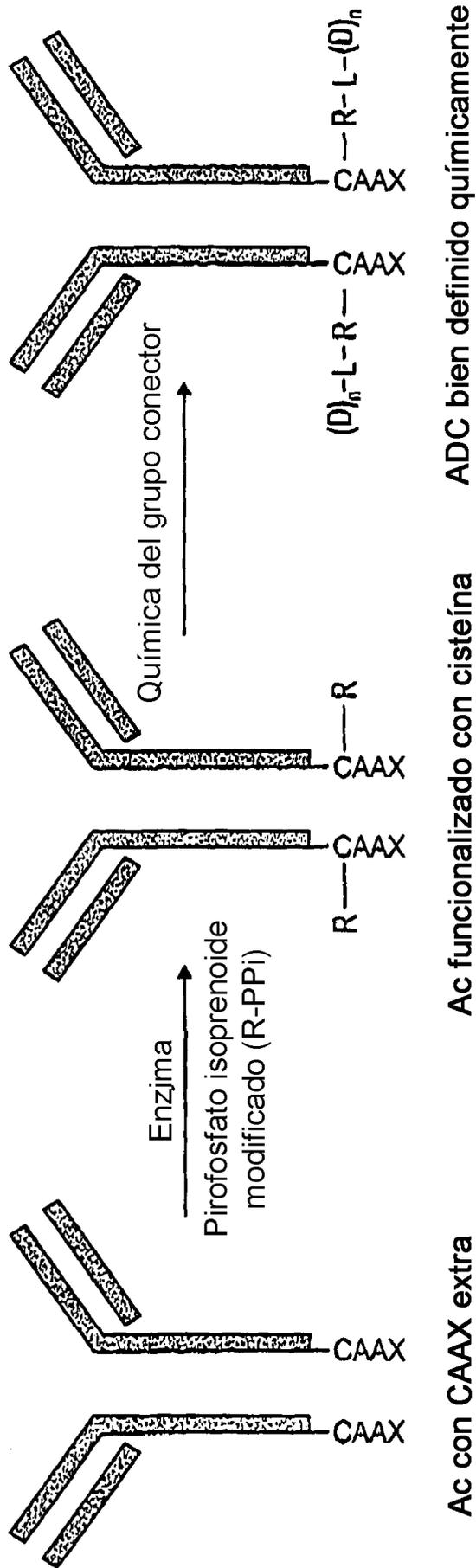


FIG. 25



R: grupo isoprenoide modificado, L: grupo conector, D: fármaco, n: número

FIG. 27

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5225539 A [0068]
- US 4816567 A [0073]
- US 5514548 A [0073]
- US 5545806 A [0073]
- US 5569825 A [0073]
- US 5591669 A [0073]
- US 5545807 A [0073]
- WO 9717852 A [0073]
- EP 1391213 A [0093]
- US 2009105461 A [0093]
- US 563548603 B [0093]
- US 61483698 B [0158]
- US 7423116 B [0158] [0161]
- US 7498298 B [0158]
- WO 2002088172 A [0158] [0161]
- US 2005238649 A [0185]
- WO 2007008603 A [0196]
- WO 2006111759 A1 [0208]
- WO 2010043880 A1 [0208]
- WO 2010010347 A1 [0208]
- WO 2006111759 A [0241]
- WO 2010043880 A [0241]
- WO 2010010347 A [0241]

Literatura no patente citada en la descripción

- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0068]
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0068]
- VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0068]
- MCCAFFERTY et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0073]
- CLACKSON et al. *Nature*, vol. 352, 624-628 [0073]
- MARKS et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0073]
- MARKS et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0073]
- WATERHOUSE et al. *Nucleic. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0073]
- MORIMOTO et al. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0073]
- BRENNAN et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0073]
- CARTER et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0073]
- KOHLER et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0073]
- KILPATRICK et al. *Hybridoma*, 1997, vol. 16 (4), 381-389 [0073]
- WRING et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, vol. 19 (5), 695-707 [0073]
- BYNUM et al. *Hybridoma*, 1999, vol. 18 (5), 407-411 [0073]
- JAKOBOVITS et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551 [0073]
- JAKOBOVITS et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0073]
- BRUGGEMANN et al. *Year in Immuno*, 1993, vol. 7, 33 [0073]
- BARBAS et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3809-3813 [0073]
- SCHIER et al. *Gene*, 1995, vol. 169, 147-155 [0073]
- YELTON et al. *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 1994-2004 [0073]
- JACKSON. *J. Immunol.*, 1995, vol. 154 (7), 3310-9 [0073]
- HAWKINS et al. *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0073]
- *Nature Rev. Cancer*, 2005, vol. 5 (5), 405-12 [0079]
- *Nature Chemical Biology*, 2010, vol. 17, 498-506 [0079]
- LANE KT ; BEES LS. Structural Biology of Protein of Farnesyltransferase and Geranylgeranyltransferase Type I. *Journal of Lipid Research*, 2006, vol. 47, 681-699 [0079]
- PATRICK J. KASEY ; MIGUEL C. SEABRA. *Protein Prenyltransferases, The Journal of Biological Chemistry*, 08 March 1996, vol. 271 (10), 5289-5292 [0079]
- BENJAMIN P. DUCKWORTH et al. *ChemBioChem*, 2007, vol. 8, 98 [0081]
- UYEN T. T. NGUYEN et al. *ChemBioChem*, 2007, vol. 8, 408 [0081]
- GUILLERMO R. LABADIE et al. *J. Org. Chem.*, 2007, vol. 72 (24), 9291 [0081]
- JAMES W. WOLLACK et al. *ChemBioChem*, 2009, vol. 10, 2934 [0081]
- IRAN M. BELL. *J. Med. Chem.*, 2004, vol. 47 (8), 1869 [0082]
- *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, vol. 40, 2004-2021 [0086]
- *Drug Discovery Today*, 2003, vol. 8 (24), 1128-1137 [0086]

10

15

- *Chem. Rev.*, 2008, vol. 108, 2952-3015 [0086]
- *Agnew, Chem Intl ed Engl.*, 1994, vol. 33, 183-186 [0089]
- **KERR et al.** *Bioconjugate Chem.*, 1997, vol. 8 (6), 781-784 [0093]
- *ACR*, 2008, vol. 41, 98-107 [0093]
- *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 3336-3342 [0093]
- *Cancer Res.*, 2010, vol. 70 (17), 6849-6858 [0093]
- **RHIANNON K. IHA et al.** *Chem. Rev.*, 2009, vol. 109, 5620 [0098]
- **MORTEN MELDAL ; CHRISTIAN WENZEL TOR-NOE.** *Chem Rev.*, 2008, vol. 108, 2952 [0098]
- **HARTMUTH C. KOLB et al.** *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.*, 2001, vol. 40, 2004 [0098]
- *Journal of Lipid Research*, 2006, vol. 47, 681-699 [0102]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, 1990 [0124]
- *ChemBioChem*, vol. 207 (8), 98-105 [0145]
- *JOC*, 2007, vol. 72 (24), 9291-9297 [0147]
- *JACS*, 2006, vol. 128, 2822-2835 [0148]
- *ChemPharmBull*, 1995, vol. 43 (10), 1706-1718 [0158] [0161] [0164] [0180]
- *BioconjugateChem*, 2002, vol. 13, 855-869 [0185]
- *JACS*, 2010, vol. 132 (12), 4281 [0252]