

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 649**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
A61K 31/52 (2006.01)
C07D 473/34 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07H 15/26 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2016 PCT/IB2016/056417**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17072662**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2016 E 16790722 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3368092**

54 Título: **Conjugados de anticuerpos que contienen agonistas de receptores tipo Toll**

30 Prioridad:

29.10.2015 US 201562247896 P

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

11.12.2020

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CORTEZ, ALEX;
GEIERSTANGER, BERNHARD HUBERT;
HOFFMAN, TIMOTHY Z.;
KASIBHATLA, SHAILAJA;
UNO, TETSUO;
WANG, XING y
WU, TOM YAO-HSIANG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 798 649 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 anticuerpos que contienen agonistas de receptores tipo Toll

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. N ° 62/247896, presentada el 29 de octubre de 2015.

Listado de Secuencias

10 La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado por vía electrónica en formato ASCII. Dicha copia ASCII, creada el 5 de octubre de 2016, se denomina PAT057064-WO-PCT_SL.txt y tiene un tamaño de 55.525 bits.

Campo De La Invención

15 La invención proporciona conjugados de anticuerpos que comprenden agonistas de receptores tipo toll y el uso de tales conjugados para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes De La Invención

20 La inmunidad innata es una respuesta inmune rápida no específica que lucha contra las agresiones medioambientales, incluidos patógenos, tales como bacterias o virus. La inmunidad adaptativa es una respuesta inmune más lenta pero más específica, que confiere inmunidad duradera o protectora al huésped e implica la diferenciación y activación de linfocitos T naïve en células T auxiliares CD4+ y/o células T citotóxicas CD8+, para fomentar la inmunidad celular y humoral. Las células de presentación de antígenos del sistema inmune innato, tales como las células dendríticas o los macrófagos, sirven como un enlace crítico entre los sistemas inmunes innato y adaptativo al fagocitar y procesar los antígenos extraños y presentarlos en la superficie celular a las células T, activando así la respuesta de células T.

30 Los receptores tipo Toll (TLR) son receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que se expresan predominantemente en células dendríticas, macrófagos, monocitos, células asesinas naturales y linfocitos T. Los TLR se unen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) de bacterias, hongos, protozoos y virus, y actúan como una primera línea de defensa contra los patógenos invasores. La activación de TLR conduce a una absorción de antígenos incrementada, maduración y capacidad estimuladora de células T de las células dendríticas. Los TLR comprenden un dominio de repetición rico en leucina (LRR) N-terminal extracelular, seguido de una región rica en cisteína, un dominio de transmembrana y una cola intracelular (citoplasmática) que contiene una región conservada denominado el dominio de receptores de Toll/IL-1 (TIR). El dominio LRR es importante para la unión del ligando y la señalización asociada y es una característica común de los PRR. El dominio TIR es importante en las interacciones proteína-proteína y está asociado con la inmunidad innata. Los TLR son esenciales para inducir la expresión de genes implicados en las respuestas inflamatorias y desempeñan papeles críticos en el desarrollo de la inmunidad adquirida específica para antígenos.

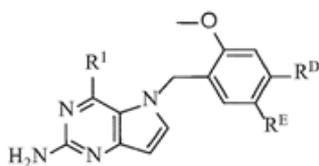
40 Mientras que los agonistas de TLR se han descrito previamente en el documento US2012/231023 A1, que describe una composición adyuvante que comprende un anticuerpo específico para células anti-dendríticas (DC) conjugado con un agonista de TLR, los agonistas de TLR difieren estructuralmente de los descritos en la presente en varios puntos. Además, el documento US2012/231023 A1 no describe un conjugado en el que el anticuerpo se une específicamente a Her2 humano.

45 Sigue existiendo la necesidad de nuevas inmunoterapias para el tratamiento de enfermedades, en particular el cáncer.

Sumario De La Invención

50 La invención proporciona conjugados de anticuerpos que comprenden agonistas de receptores tipo toll, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, composiciones farmacéuticas de los mismos y combinaciones de los mismos, que son útiles para el tratamiento de enfermedades, en particular, el cáncer. La invención proporciona, además, una cantidad eficaz de un conjugado de anticuerpos de la invención para su uso en el tratamiento, la prevención o la mejoría del cáncer en un sujeto que lo necesita. La invención también proporciona compuestos que comprenden agonistas de TLR7 y un enlazador que son útiles para conjugar con un anticuerpo anti-HER2 y de ese modo hacer los conjugados inmuno-estimuladores de la invención. En la presente se describen diversas realizaciones de la invención.

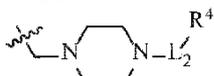
60 En un aspecto de la invención, son compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I), y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que son agonistas de TLR7:



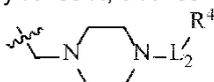
Fórmula (I)

en donde:

R^D es



5 y R^E es H; o R^E es



y R^D es H;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

10 R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m-;

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

15 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -

C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -

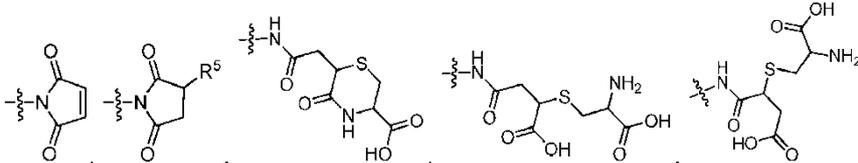
C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-, -

C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-, -

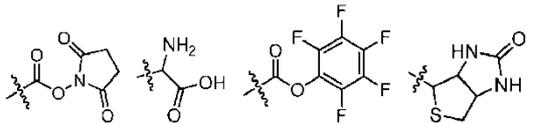
C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -

C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

R⁴ es



20 -ONH₂, -NH₂,

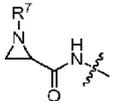


-N₃,

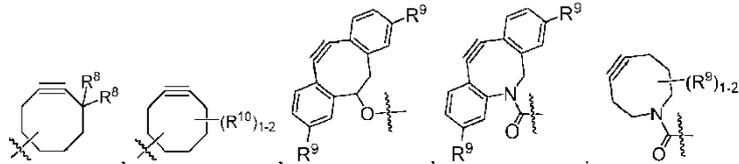
-C≡CH

25 NHC(=O)CH=CH₂, -SH, -SR⁷, -OH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -

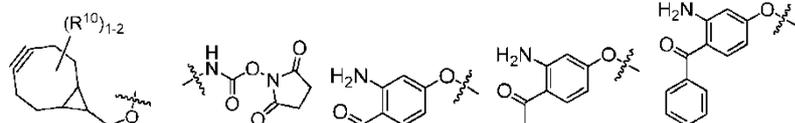
NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,

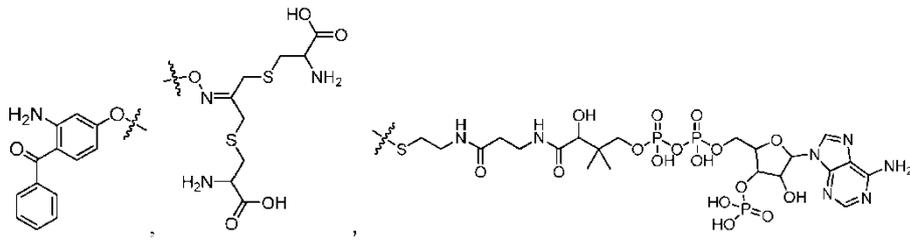


-CO₂H, -C(O)NHNH₂,

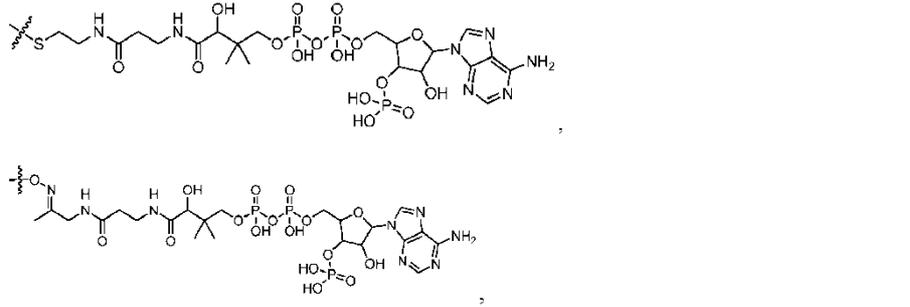


30

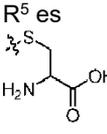
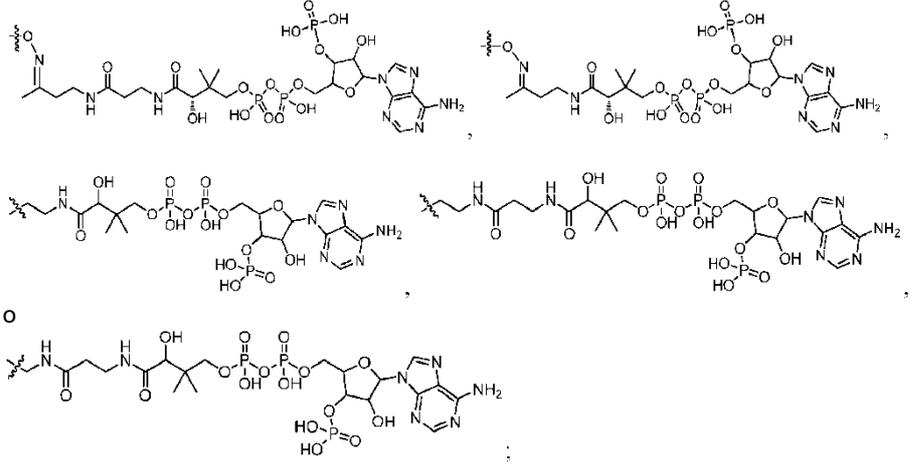




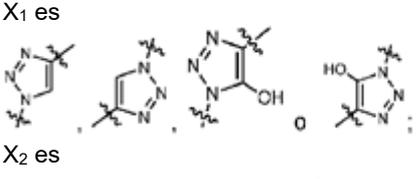
5



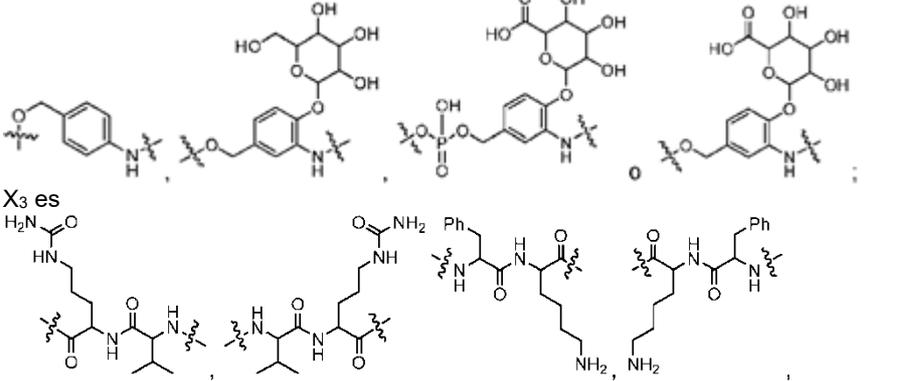
10

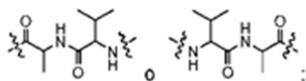


15



20





R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada uno de los R⁷ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆;

5 cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;

cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;

cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-6, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁-4 sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁-4 sustituido con -C(=O)OH;

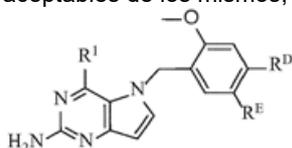
10 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

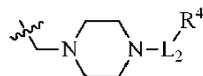
15 En un aspecto de la invención, son compuestos que tienen la estructura de Fórmula (I), y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que son agonistas de TLR7:



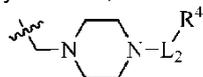
Fórmula (I)

en donde:

R^D es



20 y R^E es H; o R^E es



y R^D es H;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

25 R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m-;

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

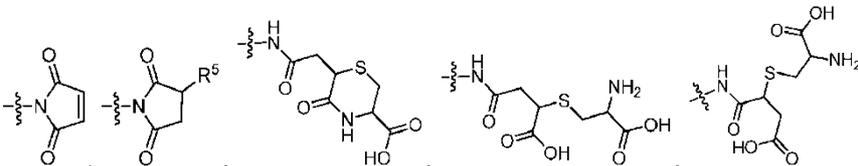
30 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,

-C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

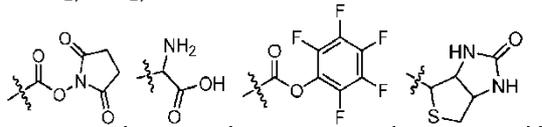
C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -

C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

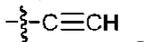
R⁴ es



35 -ONH₂, -NH₂,

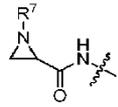


-N₃,

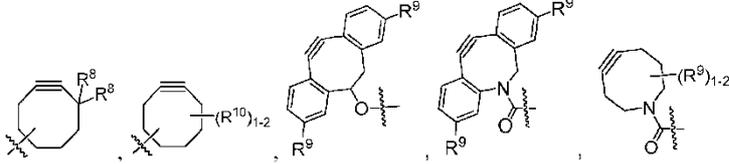


40 NHC(=O)CH=CH₂, SH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -NHC(=O)CH₂Br, -

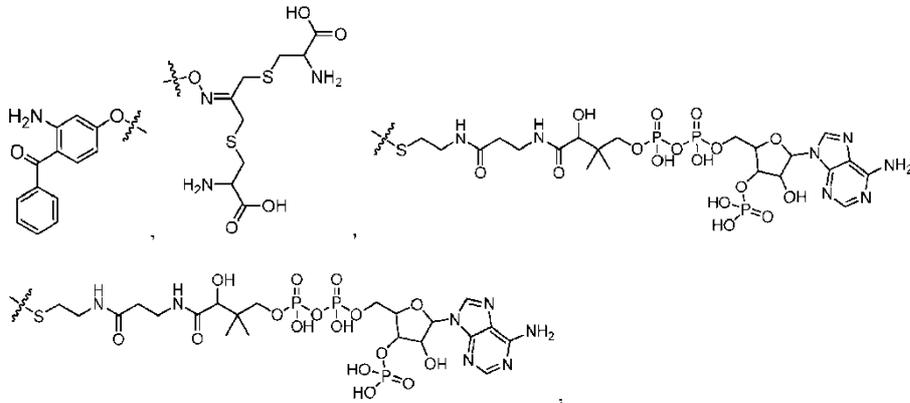
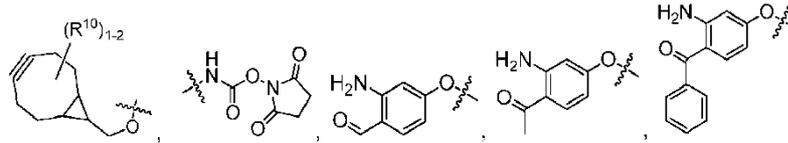
NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,



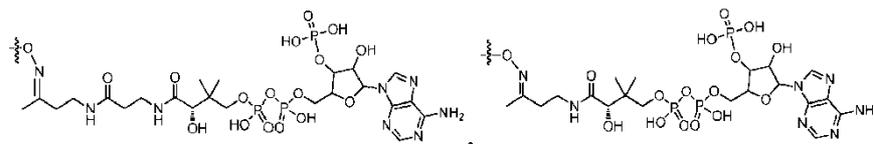
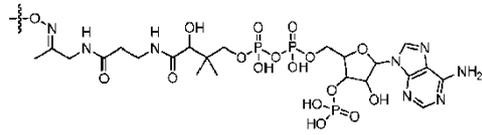
-CO₂H, -C(O)NHNH₂,



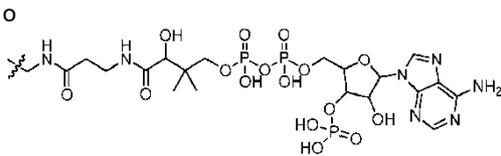
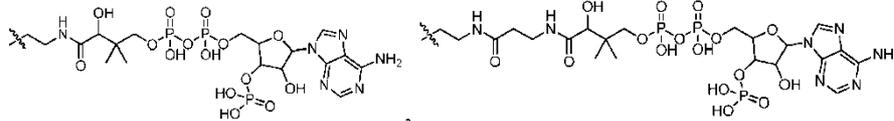
5



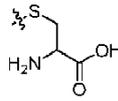
10



15

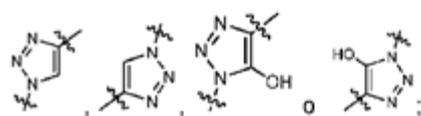


R⁵ es

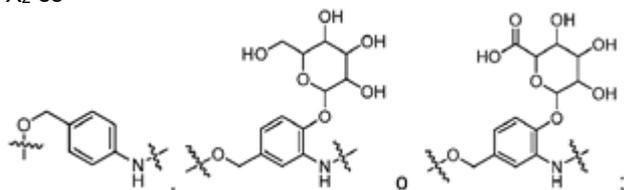


20

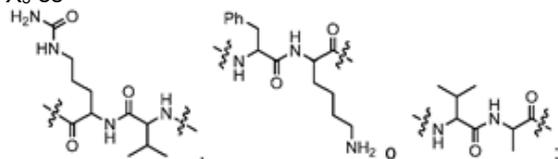
X₁ es



X2 es

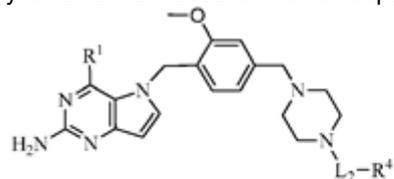


X3 es

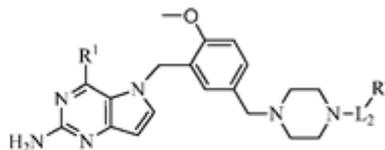


- 5 R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo;
 cada uno de los R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;
 cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;
 10 cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;
 cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;
 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 15 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 y
 cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En un aspecto de la invención, son compuestos de Fórmula (I) que tienen la estructura de Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:

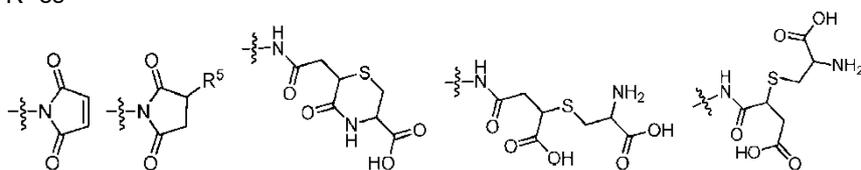


Fórmula (Ia)

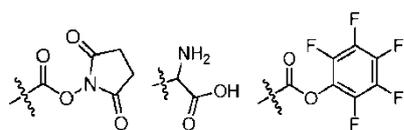


Fórmula (Ib)

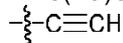
- 20 en donde:
 R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;
 R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;
 R³ es L₁OH;
 25 L₁ es -(CH₂)_m;
 L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,
 C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-,
 30 C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-,
 C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n o
 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;
 R⁴ es



35 -ONH₂, -NH₂,

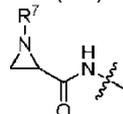


-NHC(=O)CH=CH₂, -N₃,



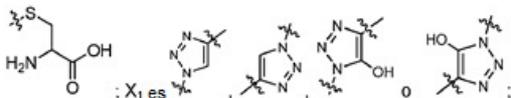
5 SH, -SR⁷, -OH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -NHC(=O)CH₂Br, -

NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,

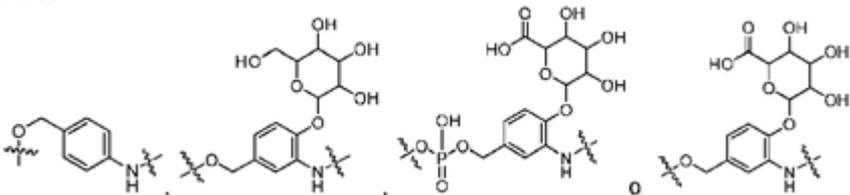


o -CO₂H;

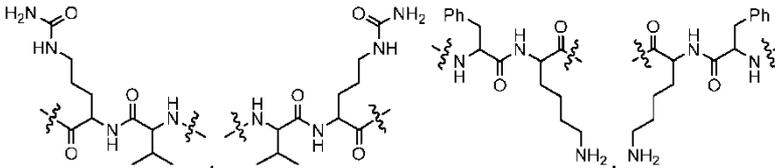
R⁵ es



10 X₂ es



X₃ es



15 R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada uno de los R⁷ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆;

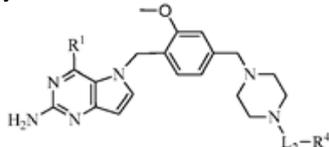
cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

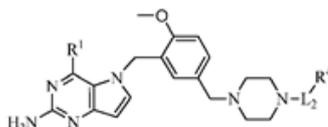
20 y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

En un aspecto de la invención, son compuestos de Fórmula (I) que tienen la estructura de Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos:



Fórmula (Ia)



Fórmula (Ib)

25 donde:

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

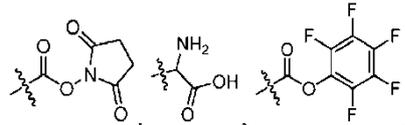
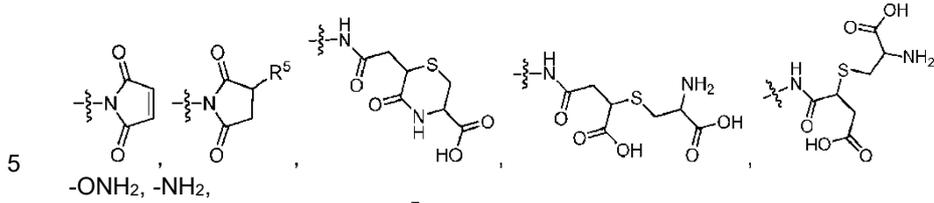
R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

R³ es L₁OH;

30 L₁ es -(CH₂)_m;

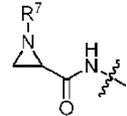
L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_i(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_i(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_i(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_i(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -

$C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_n-$,
 $C(=O)NH((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-C(=O)X_2X_3C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-C(=O)X_2C(=O)(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$ o
 $C(=O)(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_n$;
 R^4 es



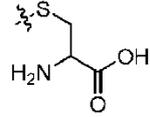
-NHC(=O)CH=CH₂, -N₃,
 $-C\equiv CH$

10 SH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,



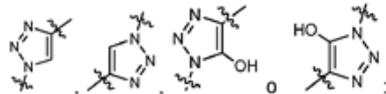
o -CO₂H;

R^5 es

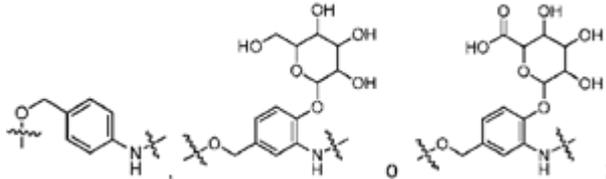


15

X_1 es

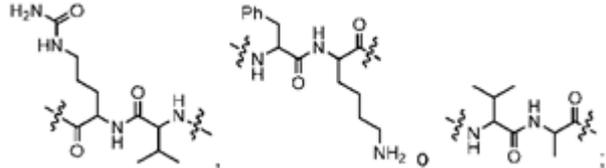


X_2 es



20

X_3 es



R^6 es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada uno de los R^7 se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆;

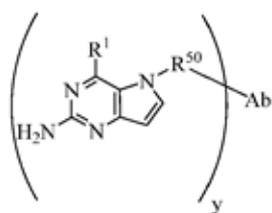
cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

25 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

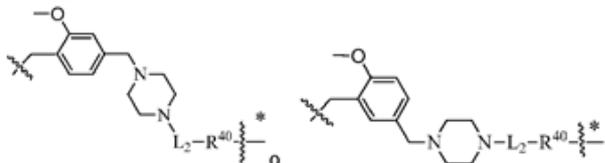
30 Otro aspecto de la invención son los conjugados de anticuerpos que tienen la estructura de Fórmula (II), y sus sales farmacéuticamente aceptables:



Fórmula (II)

en donde:

R⁵⁰ es



5 en que el * indica el punto de unión a Ab;

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

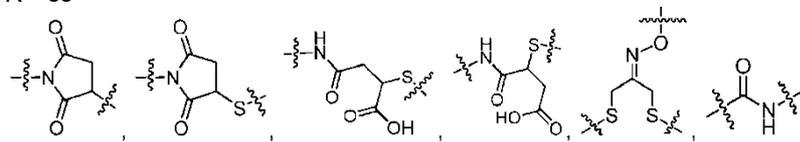
R³ es L₁OH;

10 L₁ es -(CH₂)_n-;

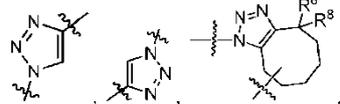
L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,
 C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-,
 C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-,
 C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n- o
 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

15 C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-,
 C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n- o
 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

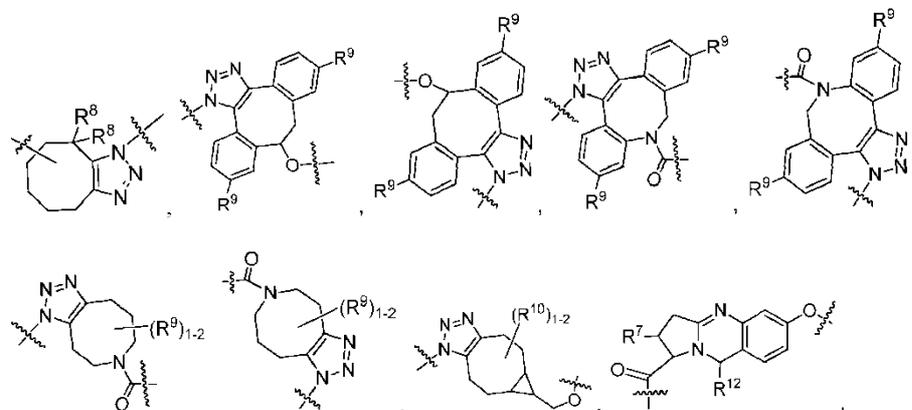
20 R⁴⁰ es

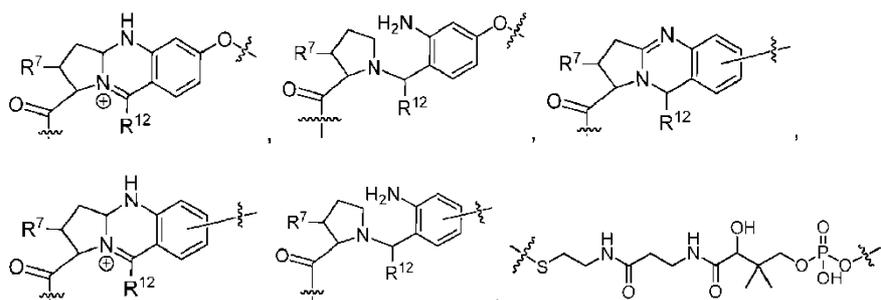


-S-, -NHC(=O)CH₂-, -S(=O)₂CH₂CH₂-, -(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-, -NHS(=O)₂CH₂CH₂-, -NHC(=O)CH₂CH₂-,
 CH₂NHCH₂CH₂-, -NHCH₂CH₂-;

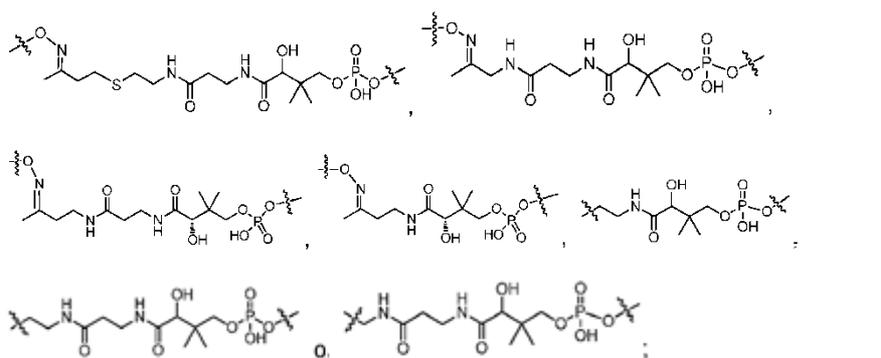


25

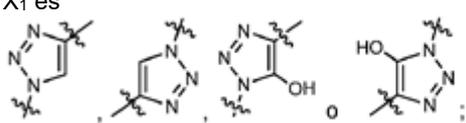




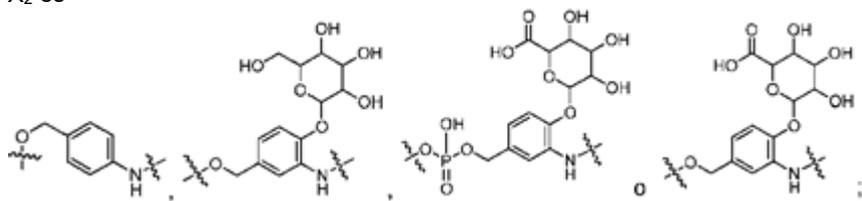
5



10 X1 es

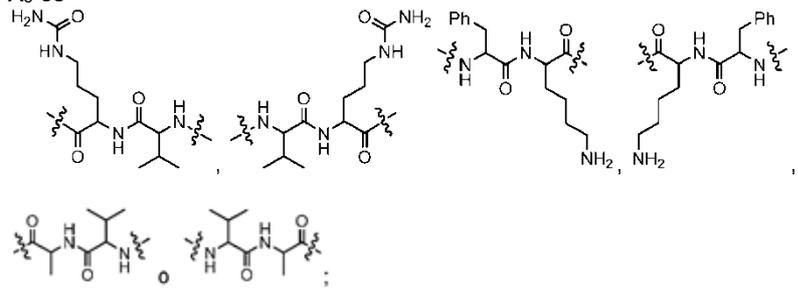


X2 es



X3 es

15

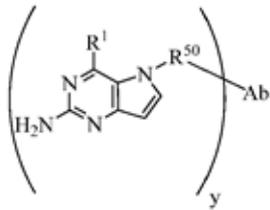


20

cada uno de los R⁷ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆;
 cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;
 cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂,
 -CN, -NO₂ y -OH;
 cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-6, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH,
 bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;
 R¹² es H, metilo o fenilo;
 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y
 y es un número entero de 1 a 16.

30

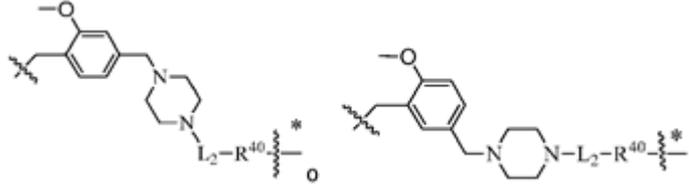
Otro aspecto de la invención son conjugados de anticuerpos que tienen la estructura de Fórmula (II), y sus sales farmacéuticamente aceptables:



Fórmula (II)

en donde:

R⁵⁰ es



5 en que * indica el punto de unión a Ab;

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

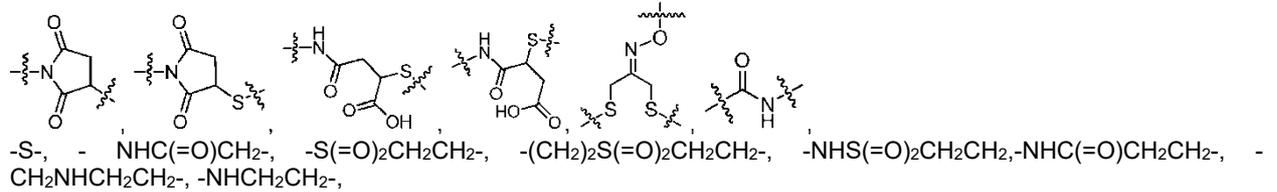
R³ es L₁OH;

10 L₁ es -(CH₂)_m;

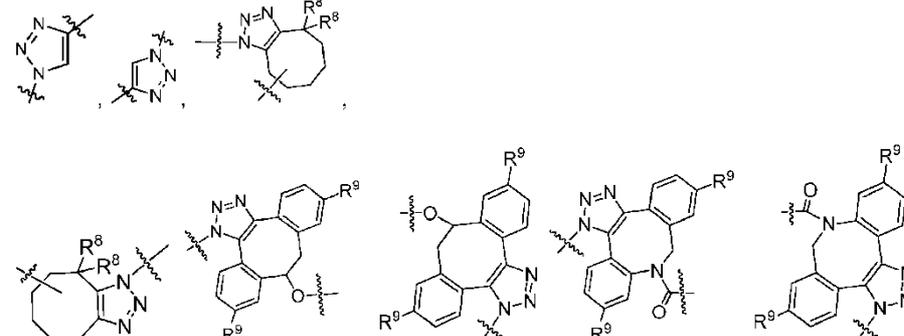
L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,
 C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -

15 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

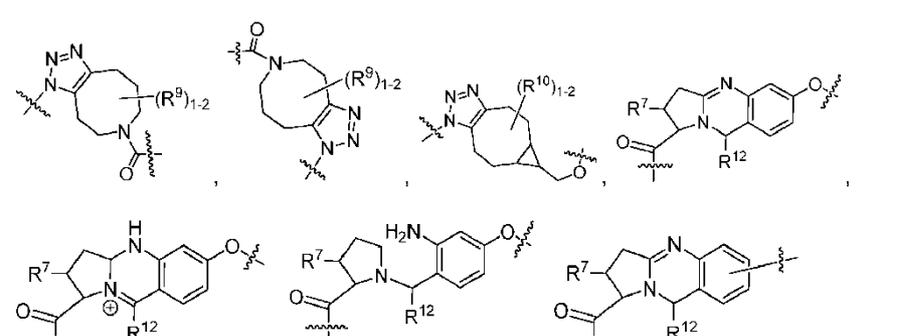
R⁴⁰ es

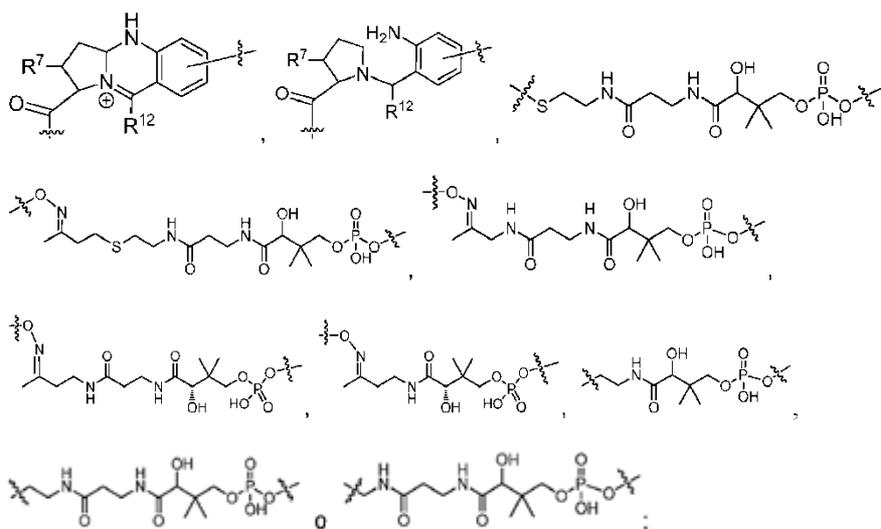


20

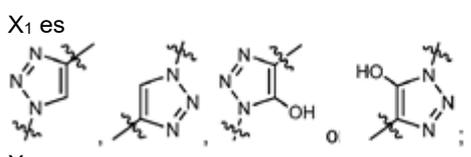


25

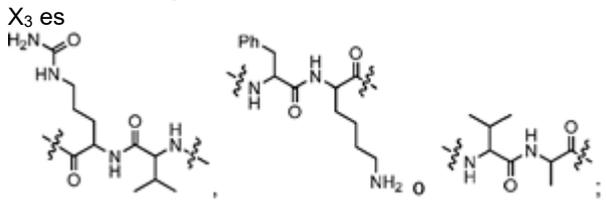
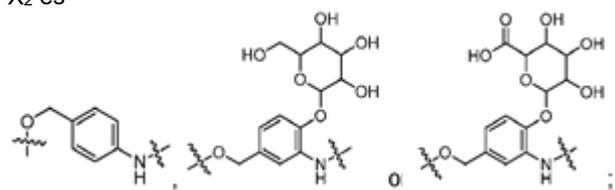




5



10



15

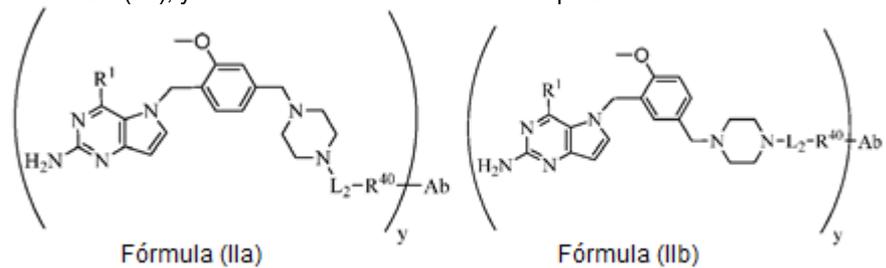
cada uno de los R⁷ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆;
 cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;
 cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂,
 -CN, -NO₂ y -OH;

20

cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH,
 bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;
 R¹² es H, metilo o fenilo;
 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y
 y es un número entero de 1 a 16.

25

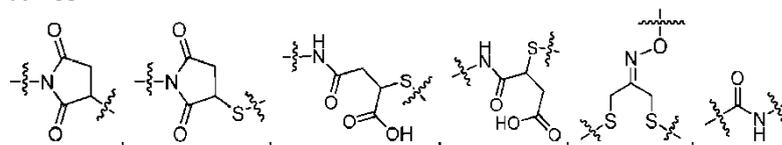
Otro aspecto de la invención son conjugados de anticuerpos de Fórmula (II), que tienen la estructura de Fórmula (IIa)
 o Fórmula (IIb), y sus sales farmacéuticamente aceptables:



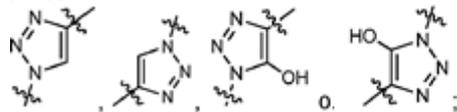
en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;
 R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;
 R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;
 R³ es L₁OH;

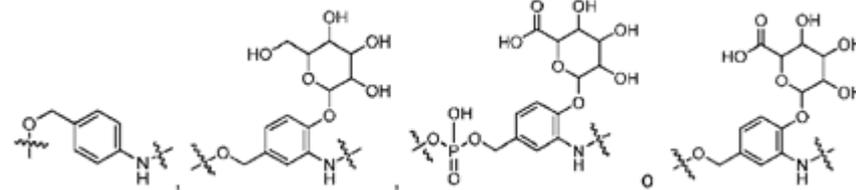
- 5 L₁ es -(CH₂)_m-;
 L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,
 C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-,
 10 C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-,
 C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n o
 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;
 R⁴⁰ es



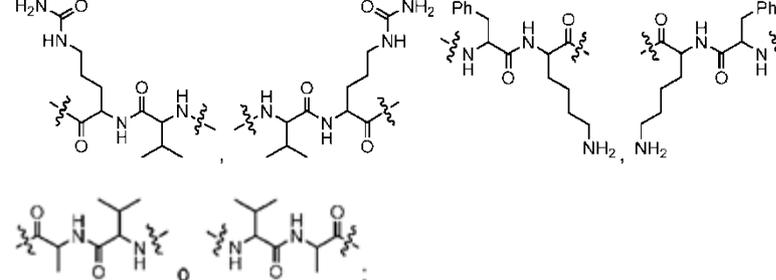
- 15 o -S-;
 X₁ es



X₂ es

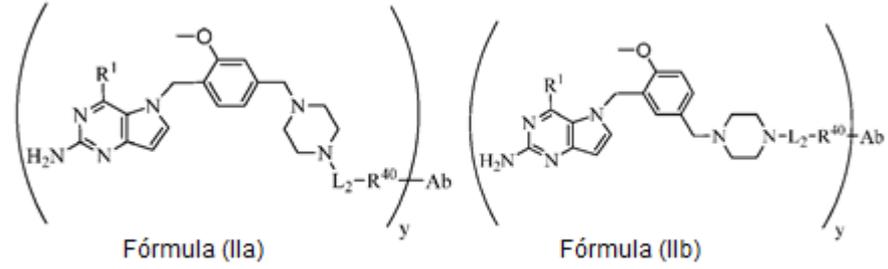


- 20 X₃ es



- 25 cada R⁷ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆;
 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y
 y es un número entero de 1 a 16.

- 30 Otro aspecto de la invención son conjugados de anticuerpos de Fórmula (II), que tienen la estructura de Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), y sus sales farmacéuticamente aceptables:



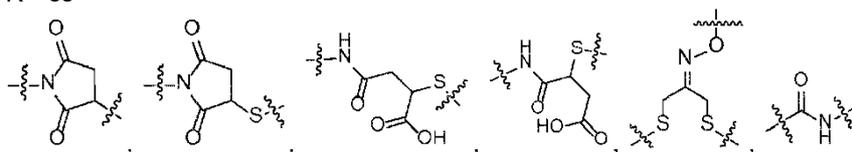
donde:
 Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;
 R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;
 R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m;

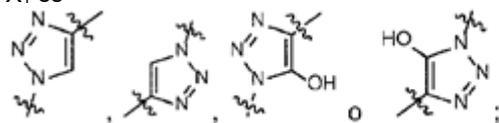
5 L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -
 C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-,
 -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -
 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

10 R⁴⁰ es

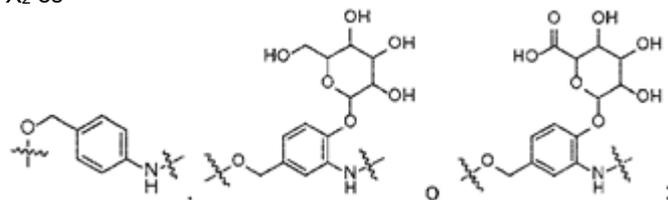


o -S-;

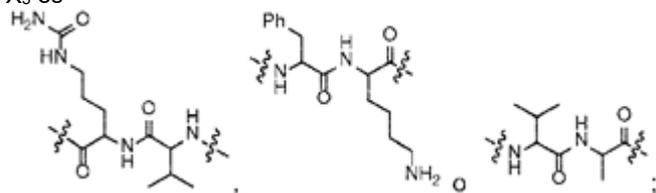
X₁ es



15 X₂ es



X₃ es



20 cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;
 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y
 y es un número entero de 1 a 16.

25 Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (Iib), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

30 Otro aspecto de la invención es el uso de una cantidad efectiva de conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (Iib), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de un cáncer HER2-positivo, en un sujeto que necesite un tratamiento de este tipo. Un cáncer HER2-positivo puede ser cualquier cáncer gástrico, cáncer de esófago, adenocarcinoma de unión gastroesofágica, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, osteosarcoma, neuroblastoma, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello. Un cáncer HER2-positivo puede tener una alta expresión de HER2 (p. ej., puede tener una puntuación IHC de 3+) o una expresión baja de HER2 (p. ej., puede tener una puntuación IHC de 2+).

40 Otro aspecto de la invención es el uso de un conjugado de anticuerpos de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (Iib), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la fabricación de un medicamento para tratar un cáncer HER2-positivo.

45 Otro aspecto de la invención es un conjugado de anticuerpos para uso en un método de tratamiento médico, en donde el método de tratamiento médico es para tratar un cáncer HER2-positivo, y en donde el conjugado de anticuerpos es un conjugado de anticuerpos de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (Iib), o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. Además, un aspecto adicional de la invención es un conjugado de anticuerpos para su uso en un método

para suprimir un cáncer HER2-positivo durante un período sostenido y/o reducir la recurrencia de un cáncer HER2-positivo, en comparación con un anticuerpo anti-HER2 solo.

5 Los conjugados de anticuerpos descritos en la presente pueden utilizarse para tratar no solo tumores que expresan HER2 altos (p. ej., que tienen puntuaciones IHC 3+), sino también tumores que expresan HER2 más bajos (p. ej., que tienen puntuaciones IHC 2+).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La FIG. 1 representa los resultados después de un tratamiento único de conjugado anti-HER2-mAb2-(C-1) en el modelo de tumor de xenoinjerto N87. Se observó una regresión del tumor para todas las dosis testadas, incluyendo 1 mg/kg (rombo negro), 2,5 mg/kg (triángulo negro), 5 mg/kg (círculo negro) y 10 mg/kg (cuadrado negro) en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Una regresión de los tumores gástricos N87 no se observó en ratones de xenoinjerto N87 tratados con 10 mg/kg de mAb2 anti-HER2 no conjugado solo (triángulo en blanco), o un conjugado de anticuerpo de control de isotipo (C-1) (rombo en blanco) en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Los datos representan los volúmenes del tumor medios (media +/- EMT) a lo largo del tiempo (post-dosis).

20 La FIG. 2 representa los resultados después del tratamiento de tumores de xenoinjerto N87 humano con una dosis única de mAb1 anti-HER2-(C-1) o mAb1 anti-HER2-(C-5). Se observó la regresión de los tumores de xenoinjerto N87 humanos después del tratamiento con 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-1) (cuadrado negro) o 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (triángulo negro), mientras que el tratamiento con 0,3 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-1) (círculo negro) o 0,3 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (rombo negro) resultó en estasis del tumor, en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Una regresión de los tumores gástricos N87 no se observó en ratones de xenoinjerto N87 tratados con un conjugado de anticuerpo de control de isotipo (C-5) (rombo en blanco) en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Los datos representan los volúmenes del tumor medios (media +/- EMT) a lo largo del tiempo (post-dosis).

30 La FIG. 3 representa los resultados después del tratamiento de tumores de xenoinjerto N87 humanos con una dosis única de mAb1 anti-HER2-(C-5). Se observó la regresión de los tumores de xenoinjerto N87 humanos después del tratamiento con 5 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (cuadrado negro) o 3 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (círculo negro), mientras que el tratamiento con 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (triángulo negro) resultó en estasis del tumor, en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Los datos representan los volúmenes del tumor medios (media +/- EMT) a lo largo del tiempo (post-dosis).

35 La FIG. 4 representa los resultados después del tratamiento de tumores de xenoinjerto N87 humanos con una dosis única de mAb1 anti-HER2 conjugado con diferentes compuestos.. Se observó una regresión inicial, seguida de estasis de tumores de xenoinjerto N87 humano después del tratamiento con 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (triángulos negros), mAb1 anti-HER2-(C-60) (triángulos en blanco), mAb1 anti-HER2-(C-59) (cuadrado negro), mAb1 anti-HER2-(C-61) (cuadrado en blanco), mAb1 anti-HER2-(C-35) (hexágono negro) , mAb1 anti-HER2-(C-37) (hexágono en blanco), mAb1 anti-HER2 (C-64) (rombo negro) o mAb1 anti-HER2- (C-62) (rombo en blanco), en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Los datos representan los volúmenes del tumor medios (media +/- EMT) a lo largo del tiempo (post-dosis).

45 Las FIGs. 5A y 5B representan los resultados del tratamiento de tumores de mama de ratón MMC (ratHER2-positivos) con una dosis única de conjugado anti-ratHER2 -(C-46). Los resultados demuestran que se observó una regresión completa del tumor en siete de ocho ratones tratados con conjugado anti-ratHER2-(C-46) (FIG. 5A), pero solo en tres de ocho ratones tratados con el anticuerpo anti-ratHER2 desnudo (FIG. 5B). El tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 200 mm³ en el modelo singénico de cáncer de mama MMC. Los datos representan los volúmenes del tumor medios (media +/- EMT) a lo largo del tiempo (post-dosis).

50 La FIG. 6 representa los resultados después del tratamiento de tumores de xenoinjerto de mama HCC1954 humanos con una dosis única de mAb1 anti-HER2-(C-5). Se observó la regresión de los tumores de xenoinjerto HCC1954 humanos después del tratamiento con 10 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (cuadrado negro) o 3 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (círculo negro), mientras que el tratamiento con 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (triángulo negro) resultó en estasis del tumor, en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Una regresión de los tumores no se observó en los ratones de xenoinjerto HCC1954 tratados 10 mg/kg de un conjugado de anticuerpo de control de isotipo (C-5) (rombo en blanco) o mAb1 anti-HER2 no conjugado en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Los datos representan los volúmenes del tumor medios (media +/- EMT) a lo largo del tiempo (post-dosis).

60 La FIG. 7 representa los resultados después del tratamiento de tumores de xenoinjerto de ovario SKOV3 humanos con una dosis única de mAb1 anti-HER2-(C-5). Se observó la regresión de los tumores de xenoinjerto SKOV3 humanos después del tratamiento con 10 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (cuadrado negro), mientras que el tratamiento con 3 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) (círculo negro) resultó en una regresión inicial del tumor, seguida

de un crecimiento renovado del tumor, en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Una regresión de los tumores no se observó en los ratones de xenoinjerto SKOV3 tratados con 10 mg/kg de un conjugado de anticuerpo de control de isotipo (C-5) (rombo en blanco) o mAb1 anti-HER2 no conjugado solo (triángulo en blanco), en comparación con animales no tratados (círculo en blanco). Los datos representan los volúmenes del tumor medios (media +/- EMT) a lo largo del tiempo (post-dosis).

Las FIGs. 8A-8C representan imágenes representativas de Inmunohistoquímica (IHC) que muestran la expresión de HER2 en tumores de xenoinjertos N87 (FIG. 8A), HCC1954 (FIG. 8B) y SKOV3 (FIG. 8C). Los tumores se puntuaron en base a su nivel de expresión de HER2 como 3+ (N87 y HCC1954) y 2+ (SKOV3).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente se describen diversas realizaciones enumeradas de la invención. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización se pueden combinar con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales de la presente invención.

A lo largo del texto de esta solicitud, si hubiera una discrepancia entre el texto de la memoria descriptiva (p. ej., la Tabla 1) y el listado de secuencias, prevalecerá el texto de la memoria descriptiva.

Definiciones

El término "alquilo C₄-C₆", tal como se usa en la presente, se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada completamente saturado que contiene de 4 a 6 átomos de carbono. Ejemplos no limitantes de grupos "alquilo C₄-C₆", incluyen n-butilo, isobutilo, sec.-butilo, terc.-butilo, n-pentilo, isopentilo y hexilo.

Tal como se utiliza en la presente, "HER2" (también conocidos como ERBB2; NEU; NGL; TKR1; CD340; p185; MLN19; HER-2/neu) se refiere a un receptor de tirosina quinasa transmembrana de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF). HER2 comprende un dominio de unión extracelular, un dominio de transmembrana y un dominio de tirosina quinasa intracelular. HER2 no tiene un dominio de unión a ligando propio y, por lo tanto, no puede unirse a factores de crecimiento, sin embargo, HER2 se une estrechamente a otros miembros de la familia de receptores de EGF unidos a ligando, tales como HER1 o HER3, para formar un heterodímero, estabilizando la unión a ligando y potenciando la activación mediada por quinasa de vías de señalización aguas abajo. El gen HER2/NEU humano se mapea en la ubicación cromosómica 17q12, y la secuencia genómica del gen HER2/NEU se puede encontrar en GenBank en NG_007503.1. En seres humanos existen cinco isoformas de HER2: A, B, C, D y E; el término "HER2" se utiliza en la presente para referirse colectivamente a todas las isoformas de HER2. Tal como se utiliza en la presente, una proteína HER2 humana también abarca proteínas que tienen en toda su longitud al menos aproximadamente un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con las isoformas de HER2: A, B, C, D y E, en donde dichas proteínas todavía tienen al menos una de las funciones de HER2. Las secuencias de ARNm y proteínas para la isoforma A de HER2 humana, la isoforma más larga, son:

Receptor tirosina quinasa 2 erb-b2 2 (ERBB2) de Homo sapiens, variante de transcrito 1, ARNm [NM_004448.3]

```

1 gcttgctccc aatcacagga gaaggaggag gtggaggagg agggctgctt gaggaagtat
61 aagaatgaag ttgtgaagct gagattcccc tccattggga ccggagaaac caggggagcc
121 ccccgggcag ccgcgcgccc ctcccacgg ggccctttac tgcgccgcgc gcccgcccc
181 caccctcgc agcaccocgc gccccgcgcc ctcccagccg ggtccagccg gagccatggg
241 gccggagccg cagtgagcac catggagctg gcggccttgt gccgctgggg gctcctcctc
    
```

301 gccctcttc cccccggagc cgcgagcacc caagtgtgca ccggcacaga catgaagctg
 361 cggctccctg ccagtcocga gaccacctg gacatgctcc gccacctcta ccagggctgc
 421 cagggtgtgc agggaaacct ggaactcacc tacctgcca ccaatgccag cctgtcctc
 481 ctgcaggata tccaggaggt gcagggtac gtgctcatg ctcaacaaca aglgaggcag
 541 gtccactgc agaggctgc gattgtgca ggcacccagc tcttgagga caactatgc
 601 ctggccgtg tagacaatgg agaccgctg aacaatacca cccctgtcac aggggctcc
 661 ccaggaggcc tgcgggagct gcagcttca agcctcacag agatctgaa aggggggtc
 721 ttgatccag ggaacccca gctctgtac caggacaga ttttgaggaa ggacatctc
 781 cacaagaaca accagctgc tctcacactg atagacacca accgctctg gccctgccac
 841 cctgttctc cgatgtgaa gggctcccgc tctggggag agagtctga ggatgtcag
 901 agctgacgc gactgtctg tgcgggtgc tgtcccct gcaaggggcc actgccact
 961 gactgtgcc atgagcagtg tctgcccgc tgcacggcc ccaagcact tgcctgctg
 1021 gcctgcclc actcaacca cagtggcctc tgtgagctc actgccagc cctggcacc
 1081 tacaacacag acacgttga gtccatgcc aatcccagg gccggatatac attggcgcc
 1141 agctgtgta ctgctgtcc ctacaactac ctttctcgg acgtgggac ctgcaccctc
 1201 gtctgcccc tgcacaacca agagtgaca gcagaggatg gaacacagcg gtgtgagaag
 1261 tgcagaagc cctgtcccg agtgtctat ggtctggca tggagcactt gcgagaggtg
 1321 agggcagta ccagtgcaca tatccaggag tttgctggct gcaagaagat cttggggagc
 1381 ctggcattc tgcgggagag cttgatggg gaccagcct ccaacactgc cccgtccag
 1441 ccagagcagc tcaagtgtt tgagactctg gaagagatca caggtacct atacatca
 1501 gcatggccg acagcctgc tgacctcagc gtctccaga accctcaagt aatccgggga
 1561 cgaattctc acaatggcg cactctgct accctgcaag ggtgggcat cagctggctg
 1621 gggctgcct cadtgagga actgggcagt ggactggcc tcatccaca taacaccac
 1681 ctctgcttg tgcacaggt gccctgggac cagctctc ggaaaccgca ccaagctctg
 1741 ctccacactg ccaaccggcc agaggacgag tgtgtggcg agggcctggc ctgccaccg
 1801 ctgtgcgcc gaggcactg ctgggtcca gggcccacc agtgtgtcaa ctgcagccag
 1861 ttctctggg gccaggagtg cgtggaggaa tgcagagtac tgcagggct ccccagggag
 1921 tatgtgaat ccaggcactg ttgcccgtc caccctgagt gtcagccca gaatggctca
 1981 gtgacctgt tggaccgga gctgaccag tgtgtggct gtcccacta taaggacct
 2041 cctctctgc tggcccgtg cccagcggg gtgaaacctg acctctcta catgccatc
 2101 tggaaattc cagatgagga gggcgatgc cagcctgcc ccatcaactg caccactcc
 2161 tgtgtgacc tggatgaca gggctgccc gccagcaga gaggcagccc tctgactcc
 2221 atcatctct cgtgtgttg cactctctg gtcgtggtc tgggggtgt cttgggac
 2281 ctatcaagc gacggcaga gaagatccg aaglacaga tgcggagact gctgcaggaa
 2341 accgagctg tggagccgt gacacctagc ggagcagatc ccaaccaggc gcagatgagg
 2401 atcctgaaag agacggagct gaggaagggt aagggtctg gatctggcg tttggcaca
 2461 gctacaagg gcatctgat cctgatggg gagaatgta aaattccagt ggccatcaa
 2521 gtgtgaggg aaaacacatc ccccaaagcc aacaagaaa tcttagagca agcatcgtg
 2581 atggctggt tgggtcccc atatgtccc cgcctctgg gcatctgct gacatccag
 2641 gtgcagctg tgacacagct tatccctat ggtgctct tagaccatg ccgggaaaac
 2701 cgcggagcc tgggtccca ggacctctg aactgggtg tgcagattg caaggggatg
 2761 agctacctg aggatgtgc gctgtacac agggactgg ccgctggaa cgtgctgtc
 2821 aagagtcca accatgcaa aattacagac ttcgggctgg ctggctgct ggacattgac
 2881 gagacagag accatgaca tggggcaag tgcctatca agtggatggc gctggagtcc
 2941 attctcccg ggcggttac ccaccagat gatgtgtga gttatggtg gactgtgtg
 3001 gagctgatg ctttggggc caaacctac gatggatcc cagccggga gatccctgac
 3061 ctgtggaaa agggggagcg gctgcccag cccccatct gaccaatga tctacatg
 3121 atcatgtca aatgttggat gattgactt gaatgtggc caagattcc ggagtggg
 3181 tctgaattc cccgatggc caggaccac cagcctttg tggcatcca gaatgaggac
 3241 ttggcccag ccagtcctt ggacagcacc tctaccgt cactgctga ggacgatgac
 3301 atgggggacc tgggtgatg tggagatg ctggtacccc agcagggct cttctgtcca
 3361 gaccctgcc cggcgctgg ggcctggtc caccacaggc accgagctc atctaccag
 3421 agtggcggg gggacctgac actaggctg gagcctctg aagaggagg cccaggtct
 3481 ccactggc cctccgaagg ggtggtctc gatgtattg atggtacct gggatgggg
 3541 gcagccaag gctgcaag cctcccaca catgaccca gcccttaca gggtagatg
 3601 gaggaccca cagtaccct gccctctg actgatggt acgtgcccc cctgacctg

3661 agccccagc ctgaatatgt gaaccagcca gatgttcggc cccagcccc ttcgccccga
 3721 gagggccctc tgctgtctgc cggacctgct ggtgccactc tggaaaggcc caagactctc
 3781 tccccaggga agaattgggt cgtcaaagac gttttgctc tgggggtgc cgtggagaac
 3841 cccgagtact tgacacccca gggaggagct gccctcagc cccacctcc tctgcctc
 3901 agcccagcct tcgacaacct ctattactgg gaccaggacc caccagagcg gggggctcca
 3961 ccagcacct tcaaaggga acctacggca gagaaccag agtacctggg tctggactg
 4021 ccagtgtgaa ccagaaggcc aagtccgag aagcctgat gtgtctcag ggagcagga
 4081 aggcctgact tctgtcgca tcaagagtg ggagggcct cggacctt ccaggggaac
 4141 ctgcatgcc aggaacctgt cctaaggaac ctctctct gctgagtc ccagatggct
 4201 ggaaggggtc cagcctcgtt ggaagaggaa cagcactggg gagtcttgt ggattctgag
 4261 gccctgcca atgagactt aggtocagt gtagccaca gccagcttg gcccttct
 4321 tccagatct gggtactga agccttagg aagctggct gagagggaa gcggccctaa
 4381 gggagtgtc aagaacaaa gcgacctt cagagactgt ccctgaaacc tagtactgcc
 4441 cccatgagg aaggaacagc aatggtgca gtatccaggc ttgtacaga gtgcttct
 4501 gtttagttt tactttttt gttttttt ttaaagatg aaataaagac ccagggggag
 4561 aatgggtgt gtatggggag gcaagtgtg ggggtcctc tccacacca cttgtccat
 4621 tgcataat atttggaaa acagctaaa aaaaaaaaaa aaaa (SEQ ID NO: 25)

Precursor del receptor proteína tirosina quinasa erbB-2 isoforma a [Homo sapiens] [NP_004439.2]

MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLY
 QGCQVVQGNL ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGYVLIHNP VRQVPLQRLR
 IVRGTQLFED NYALAVLDNG DPLNNTTPVT GASPGGLREL QLRSLTEILK
 GGVLIQRNPNQ LCYQDTILWK DIFHKNNQLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK
 GSRCWGESSE DCQSLTRTV CAGGCARCKGP LPTDCCHEQC AAGCTGPKHS
 DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP
 YNYLSTDVGS CTLCVPLHNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL
 REVRAVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF
 ETLEEITGYL YISAWPDSL PDLVFNQLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI
 SWLGLRSLRE LGSGLALIH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP
 EDECVGEGLA CHQLCARGHC WPGGPTQCVN CSQFLRGQEC VEECRVLQGL
 PREYVNRHC LPCHPECQPQ NGSVTCFGE ADQCVACAHY KDPPFCVARC
 PSGVKPDSY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAEQRASP
 LTSIISAVVG ILLVVVLGVV FGILIKRRQQ KIRKYTMRRL LQETELVEPL
 TPGAMPNQA QMRILKETEL RKVKVLGSGA FGTVYKGIWI PDGENVKIPV
 AIKVLRENTS PKANKEILDE AYVMAGVVGSP YVSRLGICL TSTVQLVTQL
 MPYGCLLDHV RENRGRLSGQ DLLNWCMIQA KGMSYLEDVR LVHRDLAARN
 VLVKSPNHVK ITDFGLARLL DIDETEHAD GGKVPKWMMA LESILRRRFT
 HQSDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDGIPARE IPDLLEKGER LPQPPICTID
 VYMIMVKCWM IDSECRPRFR ELVSEFSRMA RDPQRFVVIQ NEDLGPASPL
 DSTFYRSLLE DDDMGDLVDA EEYLVPQQGF FCPDPAPGAG GMVHHRHRSS
 STRSGGDLT LGLEPSEEEA PRSPLAPSEG AGSDVFDGDL GMGAAGLQS
 LPTHDPSPQL RYSEDPTVPL PSETDGYVAP LTCSPQPEYV NQPDVVRPQP
 SPREGPLPAA RPAGATLERP KTLSPGKNGV VKDVFAFGGA VENPEYLTPQ
 GGAAPQPHPP PAFSPAFLNL YYWDQDPPER GAPPSTFKGT PTAENPEYLG LDVPV
 (SEQ ID NO: 26)

5 El ARNm y las secuencias de proteínas de las otras isoformas HER2 humanas se pueden encontrar en GeneBank con los siguientes N°s de acceso:

- Isoforma B de HER2: NM_001005862.2 (ARNm)----> NP_001005862.1 (proteína);
- Isoforma C de HER2: NM_001289936.1 (ARNm)----> NP_001276865.1 (proteína);
- 10 Isoforma D de HER2: NM_001289937.1 (ARNm)----> NP_001276866.1 (proteína);
- Isoforma E de HER2: NM_001289938.1 (ARNm)----> NP_001276867.1 (proteína).

15 El término "anticuerpo", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una secuencia de proteína o polipéptido derivada de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena múltiple o sencilla, o inmunoglobulinas intactas, y pueden proceder de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Un "anticuerpo" que se produce de forma natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada una de las cadenas pesadas está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada una de las cadenas ligeras está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada una de las VH y VL está compuesto por tres
 20 CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2,
 25

CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo camelizado o un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

La expresión "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" se refiere a al menos una porción de un anticuerpo, que conserva la capacidad de interactuar específicamente (p. ej., mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) con un epítipo de un antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, fragmentos de anticuerpos scFv, Fvs enlazados por disulfuro (sdFv), un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, anticuerpos lineales, anticuerpos de dominio único, tales como sdAb (VL o VH), dominios VHH de camélidos, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, tal como un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de bisagra y una CDR aislada u otros fragmentos de unión a epítopos de un anticuerpo. Un fragmento de unión al antígeno también se puede incorporar a anticuerpos de dominio único, minicuerpos, nanocuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, p. ej., Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Fragmentos de unión a antígeno también pueden injertarse en armazones basados en polipéptidos tales como una fibronectina tipo III (Fn3) (véase la Patente de EE.UU. N° 6.703.199, que describe minicuerpos del polipéptido fibronectina). El término "scFv" se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena ligera y al menos un fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de una cadena pesada, en donde las regiones variables de la cadena ligera y pesada están enlazadas contiguamente, p. ej., a través de un enlazador sintético, p. ej., un enlazador de polipéptido corto y flexible, y capaz de expresarse como un polipéptido de cadena sencilla, y en donde el scFv retiene la especificidad del anticuerpo intacto del que se deriva. A menos que se especifique, tal como se utiliza en la presente, un scFv puede tener las regiones variables VL y VH en cualquier orden, p. ej., con respecto a los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido, el scFv puede comprender VL-enlazador-VH o puede comprender VH-enlazador-VL.

La expresión "región determinante de complementariedad" o "CDR", tal como se utiliza en la presente, se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de regiones variables de anticuerpo que confieren especificidad de antígeno y afinidad de unión. Por ejemplo, en general, hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada (p. ej., CDR1H, CDR2H, CDR3H) y tres CDR una de las regiones variables de la cadena ligera (CDR1L, CDR2L, CDR3L). Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse utilizando cualquiera de un cierto número de esquemas bien conocidos, incluidos los descritos por Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.^a Ed. Public Health Service, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD (esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273, 927-948 (esquema de numeración de "Chothia") o una combinación de estos. En un esquema combinado de numeración de Kabat y Chothia para una región CDR dada (por ejemplo, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 o LC CDR3), en algunas realizaciones, las CDR corresponden a los residuos de aminoácidos que se definen como parte de la CDR de Kabat, junto con los residuos de aminoácidos que se definen como parte de la CDR de Chothia.

El término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o de lo contrario interactuar con una molécula. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de azúcares y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítipo puede ser "lineal" o "conformacional". Los epítopos conformacionales y lineales se distinguen porque la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se utilizan en la presente, se refieren a polipéptidos, que incluyen anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, etc., que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica o se derivan de la misma fuente genética. Este término también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal tiene una especificidad y afinidad de unión únicas para un epítipo particular.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto la región marco como la CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de tales secuencias humanas, p. ej., secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o anticuerpo que contiene secuencias marco consensuadas derivadas del análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, tal como se describe en Knappik, et al. (2000. *J Mol Biol* 296, 57-86). Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina, p. ej., CDR, se pueden definir utilizando esquemas de numeración bien conocidos, p. ej., el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia o una combinación de Kabat y Chothia

(véase, p. ej., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds.. Kabat et al.; Al Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948); Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edic., NIH Publication nº 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; y Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948).

Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*, o una sustitución conservadora para fomentar la estabilidad o la fabricación). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana. o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, p. ej., de un transfectoma, anticuerpos aislados de una colección recombinante, combinatoria de anticuerpos humanos, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que impliquen el corte y empalme de todo o una parte de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias a otras secuencias de ADN. Anticuerpos humanos recombinantes de este tipo tienen regiones variables en las que las regiones marco y de CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en determinadas realizaciones, anticuerpos humanos recombinantes de este tipo pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

La expresión "región Fc", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido que comprende el CH3, CH2 y al menos una porción de la región bisagra de un dominio constante de un anticuerpo. Opcionalmente, una región Fc puede incluir un dominio CH4, presente en algunas clases de anticuerpos. Una región Fc puede comprender la región bisagra completa de un dominio constante de un anticuerpo. En una realización, la invención comprende una región Fc y una región CH1 de un anticuerpo. En una realización, la invención comprende una región CH3 de la región Fc de un anticuerpo. En otra realización, la invención comprende una región Fc, una región CH1 y una región C kappa/lambda del dominio constante de un anticuerpo. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante, p. ej., una región constante de cadena pesada. En una realización, dicha región constante está modificada en comparación con una región constante de tipo salvaje. Es decir, los polipéptidos de la invención descritos en la presente pueden comprender alteraciones o modificaciones a uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o al dominio de la región constante de la cadena ligera (CL). Las modificaciones de ejemplo incluyen adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Dichos cambios pueden incluirse para optimizar la función efectora, la semivida, etc.

La expresión "especificidad de unión", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la capacidad de un sitio de combinación de anticuerpo individual para reaccionar con un determinante antigénico y no con un determinante antigénico diferente. El sitio de combinación del anticuerpo se encuentra en la porción Fab de la molécula y se construye a partir de las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras. La afinidad de unión de un anticuerpo es la fuerza de la reacción entre un único determinante antigénico y un único sitio de combinación en el anticuerpo. Es la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas que operan entre el determinante antigénico y el sitio de combinación del anticuerpo.

El término "afinidad", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada uno de los sitios antigénicos, la región variable del "brazo" del anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad.

La expresión "modificaciones de secuencia conservadoras" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Las modificaciones conservadoras de este tipo incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención mediante técnicas estándares conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido las familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de carácter básico (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina,

glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de un anticuerpo pueden reemplazarse por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado puede analizarse utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente.

El término "homólogo" o "identidad" se refiere a la identidad secuencial de subunidades entre dos moléculas poliméricas, p. ej., entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de subunidad en las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; p. ej., si la mitad (p. ej., cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son homólogas en un 50%; si el 90% de las posiciones (p. ej., 9 de 10) son coincidentes u homólogas, las dos secuencias son homólogas en un 90%. El porcentaje de "identidad de secuencia" se puede determinar comparando dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, en que el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (p. ej., huecos o colgantes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje puede calcularse determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de la secuencia. El resultado es el porcentaje de identidad de la secuencia objeto con respecto a la secuencia de consulta.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por el crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen carcinoma, linfoma, blastoma (que incluye meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (que incluye liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (que incluyen tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de los islotes), mesotelioma, schwannoma (que incluye neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias linfoides. Ejemplos más particulares de este tipo de cánceres incluyen cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de pulmón escamoso, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, neuroblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer de esófago, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.

Un "cáncer HER2-positivo" o "cáncer que expresa HER2" es un cáncer que comprende células que tienen proteína HER2 presente en su superficie celular. Se conocen muchos métodos en la técnica para detectar o determinar la presencia de HER2 en una célula cancerosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presencia de HER2 en la superficie celular puede determinarse por inmunohistoquímica (IHC), citometría de flujo, transferencia Western, ensayo inmunofluorescente, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) o tomografía por emisión de positrones (PET).

El término "combinación" o la expresión "combinación farmacéutica", tal como se utilizan en la presente, significan un producto que es el resultado de la mezcla o combinación de más de un principio activo e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los ingredientes activos. La expresión "combinación fija" significa que los ingredientes activos, a modo de ejemplo, un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales, se administran a un sujeto simultáneamente en forma de una sola entidad o dosificación. La expresión "combinación no fija" significa que los ingredientes activos, a modo de ejemplo, un compuesto de la invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales, se administran a un sujeto como entidades separadas simultánea, concurrente o secuencialmente sin límites de tiempo específicos, en donde dicha administración proporciona niveles terapéuticamente efectivos de los ingredientes activos en el cuerpo del sujeto. Esto último también se aplica a la politerapia, p. ej., la administración de 3 o más ingredientes activos.

El término "composición" o la expresión "composición farmacéutica", tal como se utilizan en la presente, se refieren a una mezcla de un compuesto de la invención con al menos uno y opcionalmente más de otro componente químico farmacéuticamente aceptable, tal como soportes, estabilizadores, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o excipientes.

La expresión "un isómero óptico" o "un estereoisómero", tal como se utilizan en la presente, se refiere a cualquiera de las diversas configuraciones estereoisómeras que pueden existir para un compuesto dado de la presente invención e

incluye isómeros geométricos. Se sobreentiende que un sustituyente puede estar unido a un centro quiral de un átomo de carbono. El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no ser superponibles en su compañero de imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a moléculas que son superponibles en su compañero de imagen especular. Por lo tanto, la invención incluye enantiómeros, diastereómeros o racematos del compuesto.

5 "Enantiómeros" son un par de estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla "racémica". El término se utiliza para designar una mezcla racémica cuando sea apropiado. Los "diastereoisómeros" son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero que no son imágenes especulares entre sí. La estereoquímica absoluta se especifica de acuerdo con el sistema R-S de Cahn-Ingold-Prelog. Cuando un compuesto es un enantiómero puro, la estereoquímica en cada uno de los
10 carbonos quirales se puede especificar ya sea como R o S. Los compuestos resueltos, cuya configuración absoluta es desconocida, se pueden designar (+) o (-) dependiendo de la dirección (dextrógira o levógira) en la que desvían el plano de luz polarizada a la longitud de onda de la línea D del sodio. Determinados compuestos descritos en la presente contienen uno o más centros o ejes asimétricos y, por tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de su estereoquímica absoluta,
15 como (R)- o (S)-.

La expresión "soporte farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en la presente, incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (p. ej., agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, conservantes,
20 estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes y combinaciones de los mismos, como conocerían los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Salvo en lo que concierne a cualquier soporte convencional que sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

25 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una sal que no anula la actividad biológica y las propiedades de los compuestos de la invención, y no provoca irritación significativa a un sujeto al que se administra.

30 El término "sujeto", tal como se utiliza en la presente, abarca mamíferos y no mamíferos. Ejemplos de mamíferos incluyen seres humanos, chimpancés, simios, monos, vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos; conejos, perros, gatos, ratas, ratones, cobayas. Ejemplos de no mamíferos incluyen aves, peces. Con frecuencia el sujeto es un ser humano.

35 La expresión "un sujeto que necesita dicho tratamiento" se refiere a un sujeto que se beneficiaría biológica, médicamente o en calidad de vida de dicho tratamiento.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una cantidad de un conjugado de anticuerpos de la invención que provocará la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, la
40 reducción o inhibición de una actividad enzimática o proteica, o mejorar los síntomas, aliviar afecciones, retrasar o demorar la progresión de la enfermedad, o prevenir una enfermedad, etc. En una realización no limitante, la expresión "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un conjugado de anticuerpos de la invención que, cuando se administra a un sujeto, es efectivo para aliviar, inhibir, prevenir y/o mejorar al menos parcialmente una afección, un trastorno o una enfermedad.

45 La expresión "agonista de TLR7", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto o conjugado de anticuerpo capaz de activar el Receptor tipo Toll 7 (TLR7).

50 El término "tratar", la expresión "que tratan" o el término "tratamiento", tal como se utilizan en la presente, se refieren a métodos para aliviar, moderar o mejorar una enfermedad o síntomas de afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de síntomas, inhibir la enfermedad o afección, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, provocar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una afección provocada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección ya sea profiláctica y/o terapéuticamente.

55 Los nombres de los compuestos proporcionados en la presente se obtuvieron utilizando ChemDraw Ultra versión 12.0 (CambridgeSoft®) o JChem versión 5.3.1 (ChemAxon).

60 Los nombres de los compuestos proporcionados en la presente se obtuvieron utilizando ChemDraw Ultra versión 12.0 (CambridgeSoft®) o JChem versión 5.3.1 (ChemAxon).

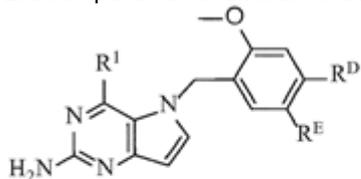
A menos que se especifique lo contrario, la expresión "compuestos de la presente invención", "compuestos de la invención" o "compuestos proporcionados en la presente" se refiere a compuestos de Fórmula (I) y sub-formulas de los mismos (es decir, compuestos de Fórmula (Ia) y Fórmula (Ib)) y sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros (incluidos diastereoisómeros y enantiómeros), tautómeros y compuestos marcados isotópicamente (incluidas las sustituciones de deuterio) de los mismos.

A menos que se especifique lo contrario, la expresión "conjugado de anticuerpo de la invención" se refiere a conjugados de Fórmula (II) y sub-formulas de los mismos (es decir, compuestos de Fórmula (IIa) y Fórmula (IIb)) y sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros (incluidos diastereoisómeros y enantiómeros), tautómeros y compuestos marcados isotópicamente (incluidas las sustituciones de deuterio) de los mismos.

Tal como se utiliza en la presente, se debe interpretar que el término "un", "una", "el/la" y términos similares utilizados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente o el contexto lo contradiga claramente.

Compuestos Inmunoestimuladores de la Invención

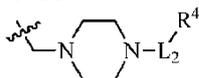
Los compuestos inmunoestimuladores de la invención son agonistas de TLR7 que tienen la estructura de Fórmula (I):



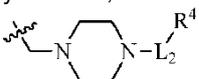
Fórmula (I)

en donde:

R^D es



y R^E es H; o R^E es



y R^D es H;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_n-;

L₂ es -(CH₂)_n-, -(CH₂)_nO(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

-(CH₂)_nO(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -

C(=O)((CH₂)_nO)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -

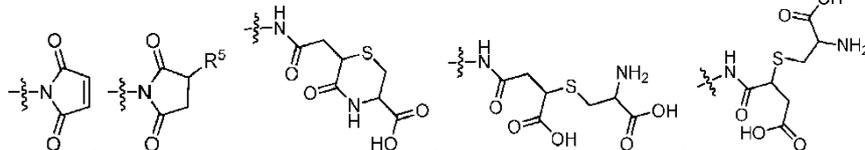
C(=O)NH((CH₂)_nO)(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-, -

C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-, -

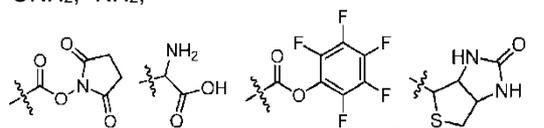
C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)(CH₂)_n-, -

C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

R⁴ es



-ONH₂, -NH₂,

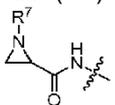


-N₃,

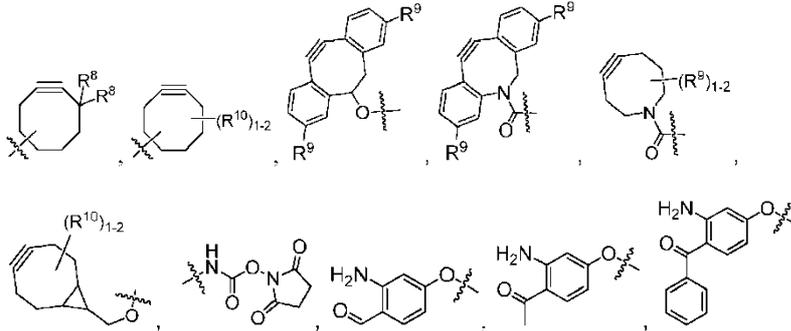
-C≡CH

NHC(=O)CH=CH₂, -SH, -SR⁷, -OH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -

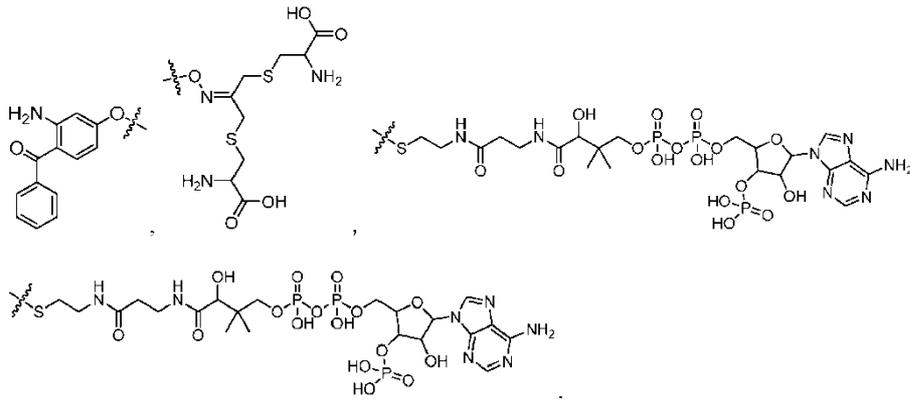
NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,



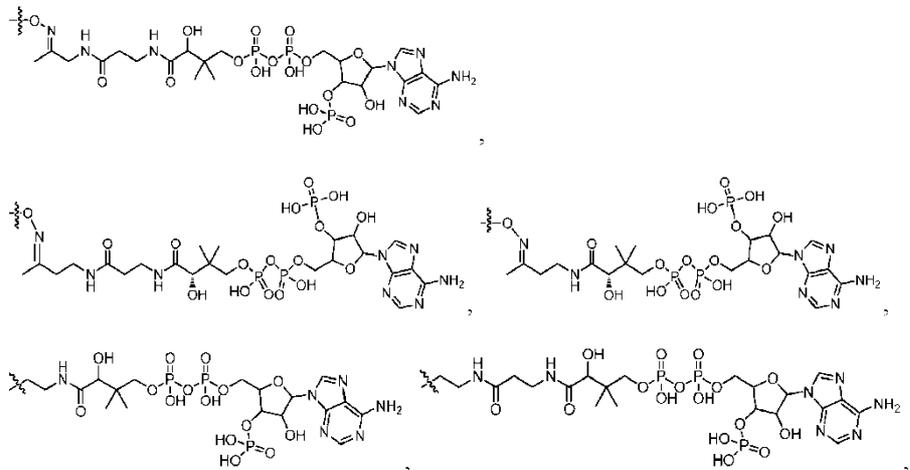
-CO₂H, -C(O)NHNH₂,



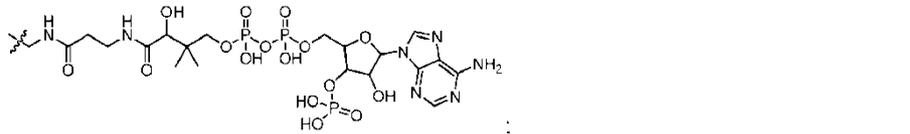
5



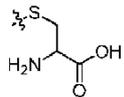
10



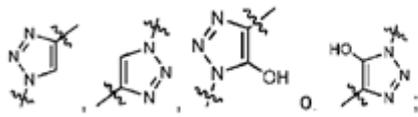
15



R⁵ es

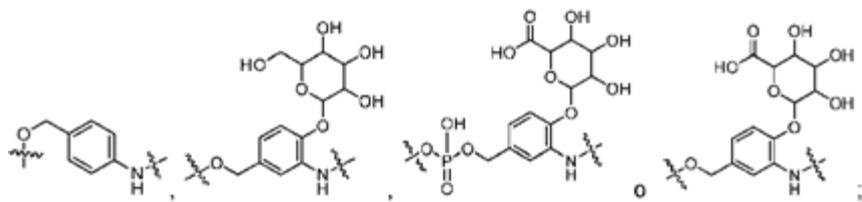


X₁ es

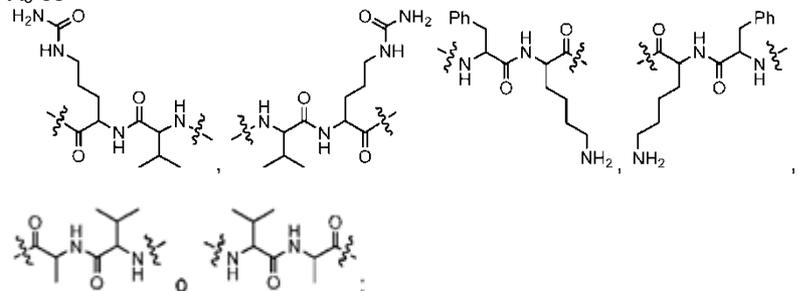


20

X₂ es



X₃ es



5

R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada uno de los R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;

10

cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;

cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

15

y cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

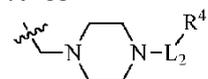
cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

20

Determinados aspectos y ejemplos de los compuestos de la invención se proporcionan en la siguiente lista de realizaciones enumeradas adicionales. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización se pueden combinar con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales de la presente invención.

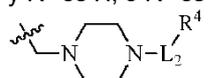
Realización 1. El compuesto de Fórmula (I), y sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde:

R^D es



25

y R^E es H; o R^E es



y R^D es H;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

30

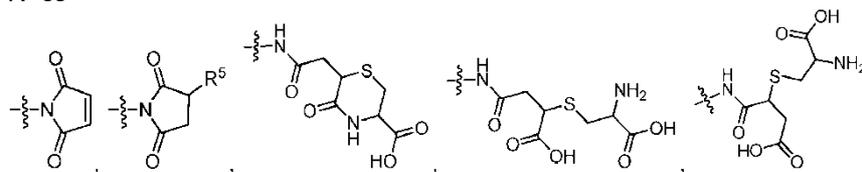
R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m-;

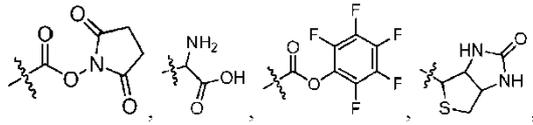
L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

35

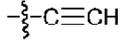
R⁴ es



-ONH₂, -NH₂,

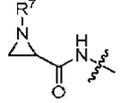


-N₃,

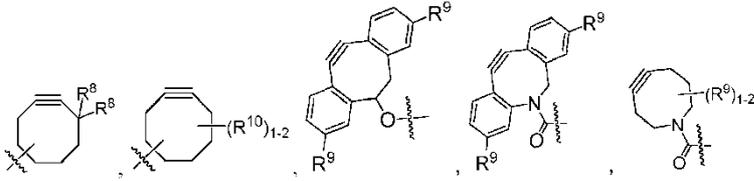


NHC(=O)CH=CH₂, SH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,

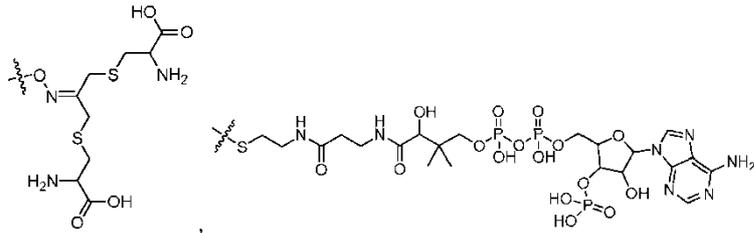
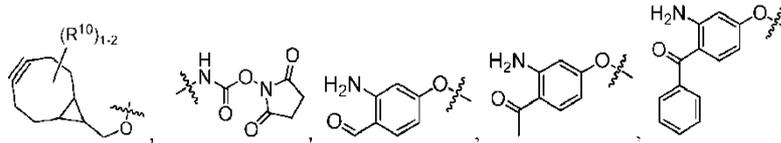
5



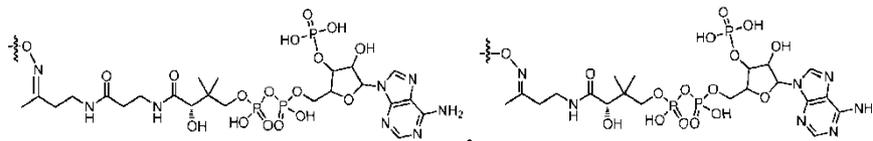
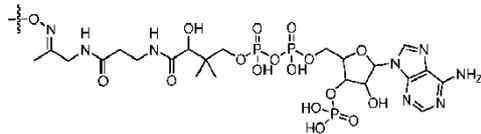
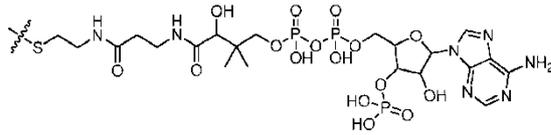
-CO₂H, -C(O)NHNH₂,



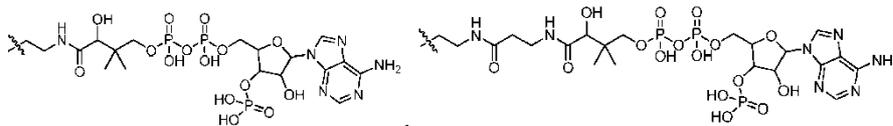
10



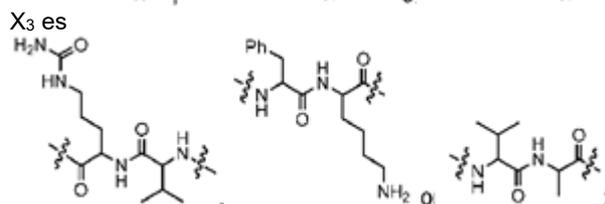
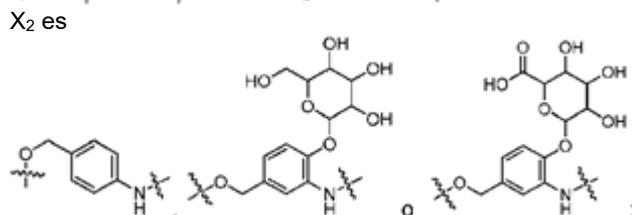
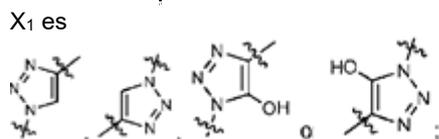
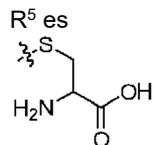
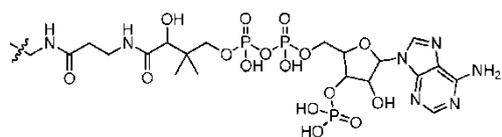
15



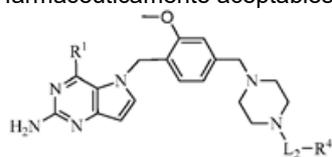
20



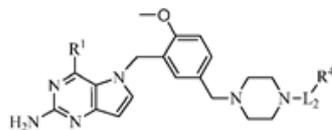
o



- 5
- 10 R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo;
 cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;
 cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;
 cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;
- 15 cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;
 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
- 20 y
 cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.
 Realización 2. El compuesto de Fórmula (I) que tiene la estructura de Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), y sus sales farmacéuticamente aceptables,

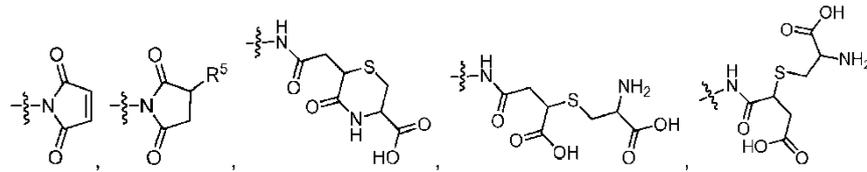


Fórmula (Ia)

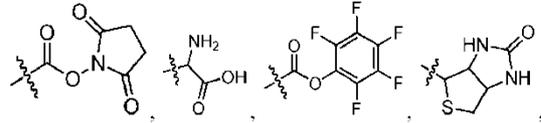


Fórmula (Ib)

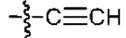
- 25 en donde:
 R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;
 R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;
 R³ es L₁OH;
 L₁ es -(CH₂)_m;
 L₂ es -(CH₂)_n, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n,
 30 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n, -C(=O)(CH₂)_n, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n,
 C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n,
 C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n,
 C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂,
 C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n o
 35 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;
 R⁴ es



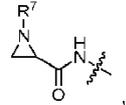
-ONH₂, -NH₂,



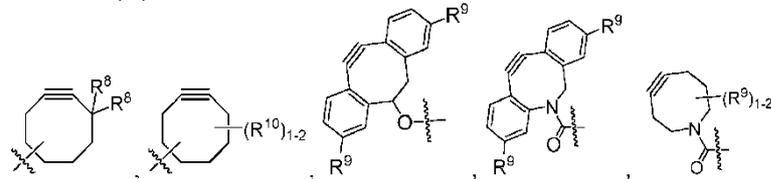
-N₃,



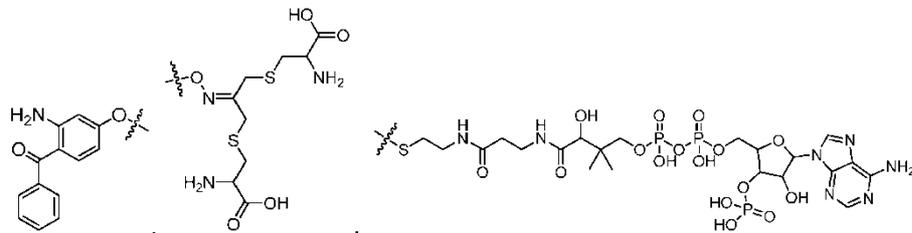
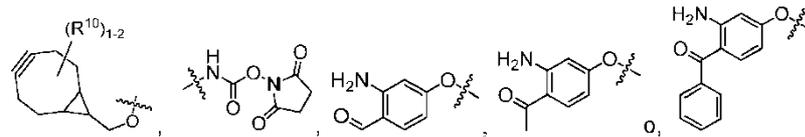
5 NHC(=O)CH=CH₂, SH, -SR⁷, -OH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,



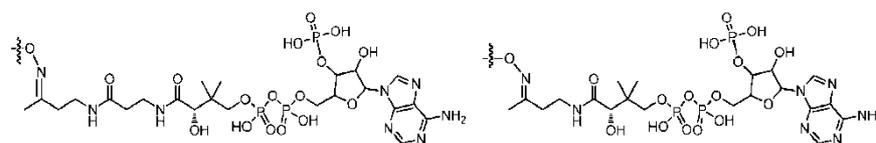
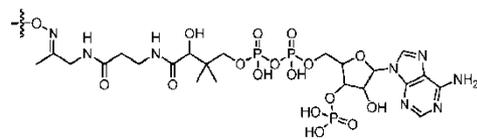
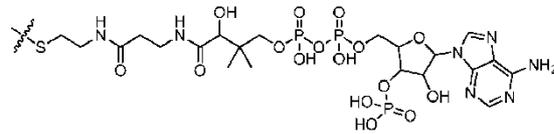
-CO₂H, -C(O)NHNH₂,



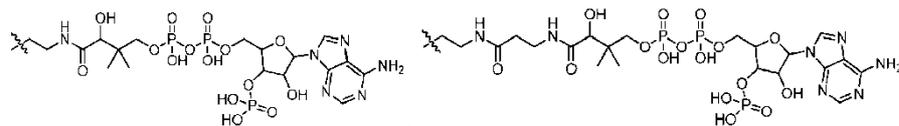
10



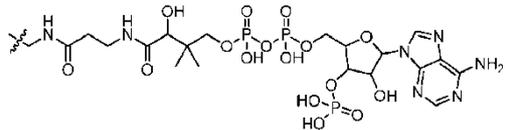
15



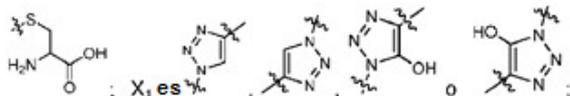
20



O

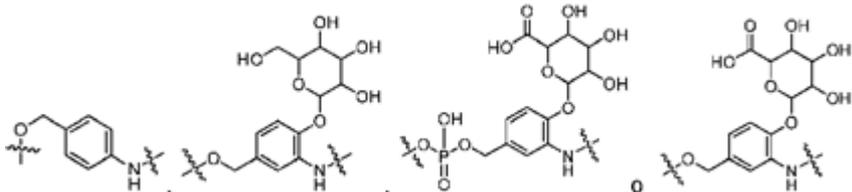


R⁵ es

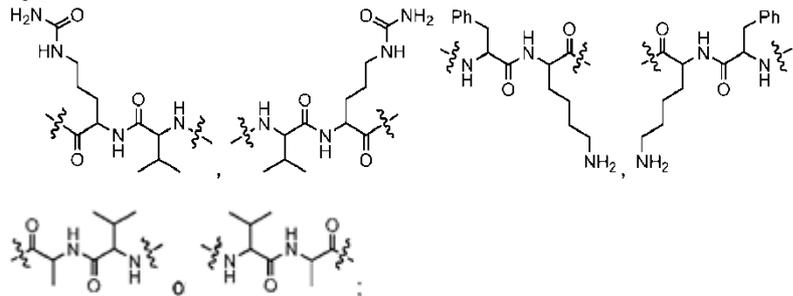


5

X₂ es



X₃ es



10

R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;

15 cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;

cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con -C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

20 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

Realización 3. El compuesto de Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), y sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde:

25 R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m;

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

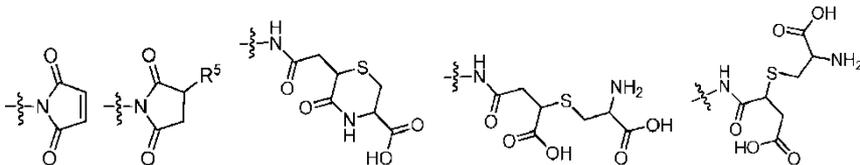
30 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -

C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -

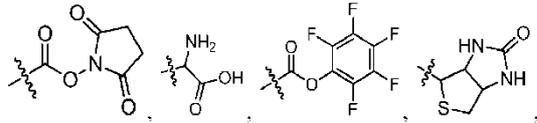
C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -

C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

R⁴ es



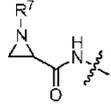
-ONH₂, -NH₂,



-N₃,

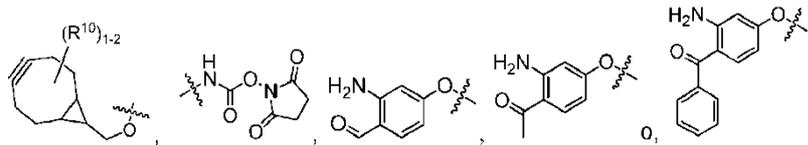
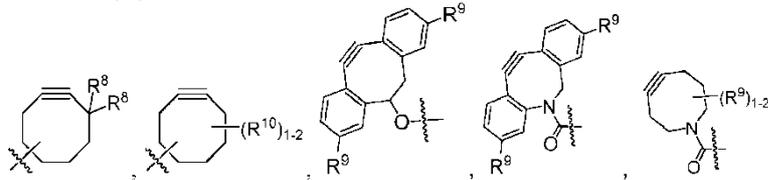
$\text{---C}\equiv\text{CH}$

- 5 NHC(=O)CH=CH₂, SH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,

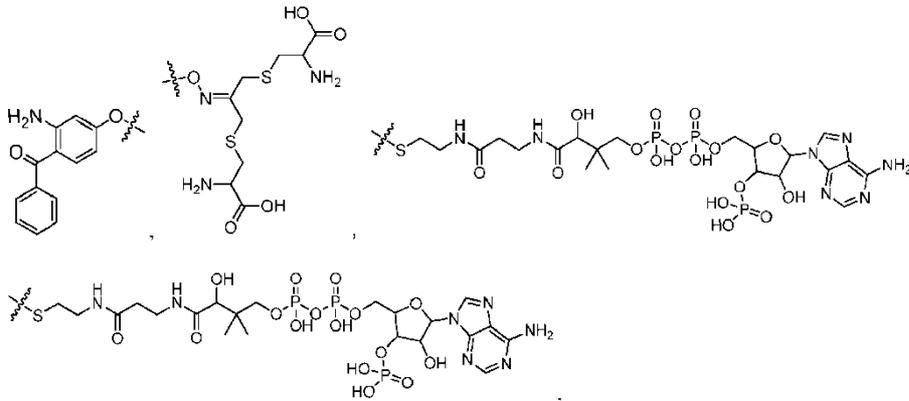


-CO₂H, -C(O)NHNH₂,

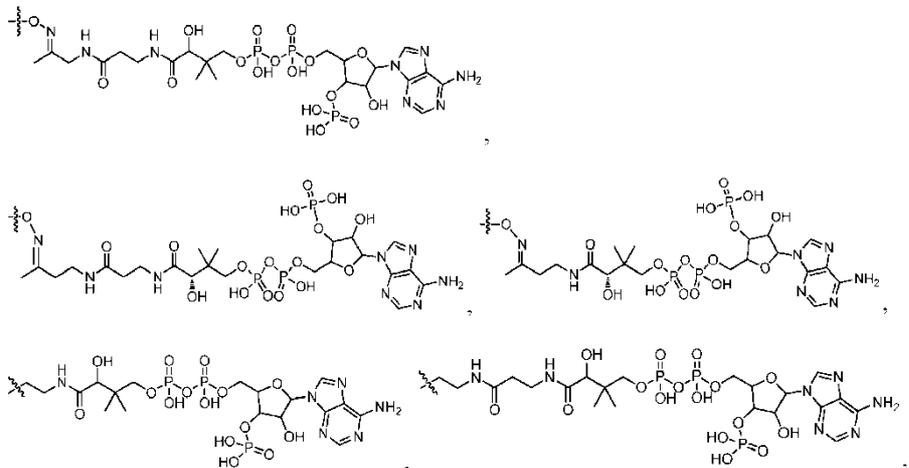
10



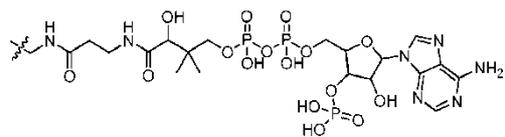
15



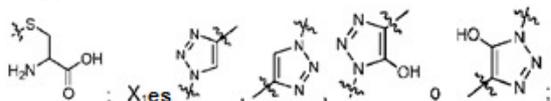
20



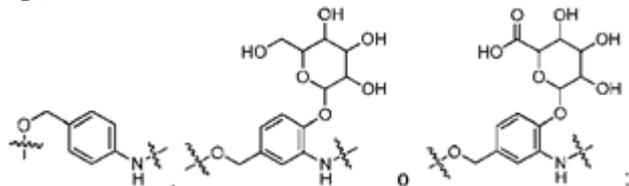
o



R⁵ es

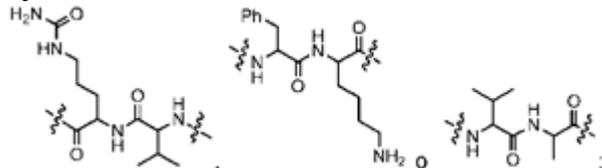


X₂ es



5

X₃ es



R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

10 cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;

cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;

cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

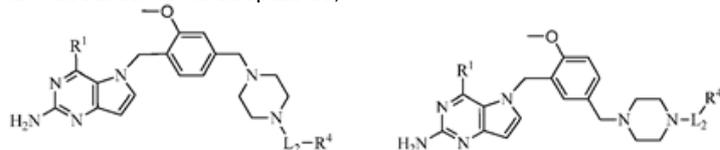
15 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

20 Realización 4. El compuesto de Fórmula (I) que tiene la estructura de Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), y sus sales farmacéuticamente aceptables,



Fórmula (Ia)

Fórmula (Ib)

en donde:

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

25 R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m-;

L₂ es -(CH₂)_n-, -(CH₂)_nO((CH₂)_n)-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

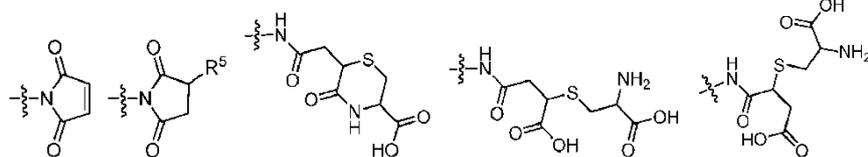
-(CH₂)_nO((CH₂)_n)NHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)((CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)((CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,

30 C(=O)((CH₂)_nO)((CH₂)_n)NHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)((CH₂)_n)C(=O)NH(CH₂)_n-,

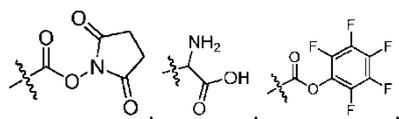
C(=O)NH((CH₂)_nO)((CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)((CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -

C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

R⁴ es



-ONH₂, -NH₂,

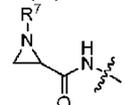


-NHC(=O)CH=CH₂, -N₃,

-C≡CH

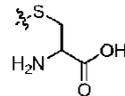
5 SH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -

C(O)NHNH₂,

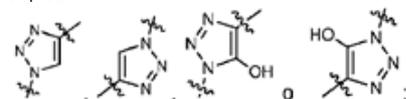


o-CO₂H;

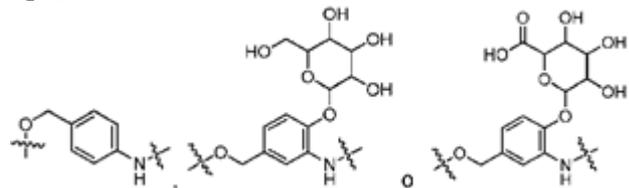
R⁵ es



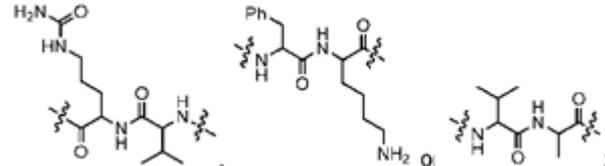
10 X₁ es



X₂ es



X₃ es



15 R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

20 y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

Realización 5. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es alquilo C₄-C₆;

25 R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m-;

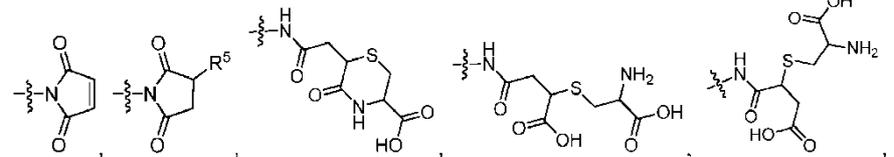
L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

-((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,

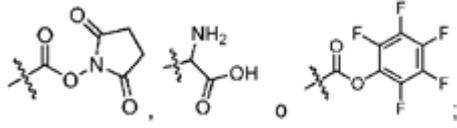
-C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,

30 -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-;

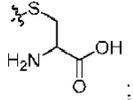
R⁴ es



ONH₂, -NH₂



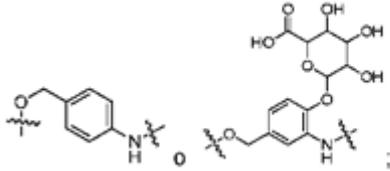
R⁵ es



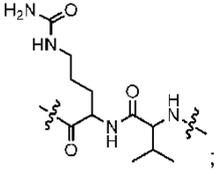
X₁ es



X₂ es



X₃ es



10 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

Realización 6. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

15 R¹ es -NHR²; R² es -alquilo C₄-C₆;

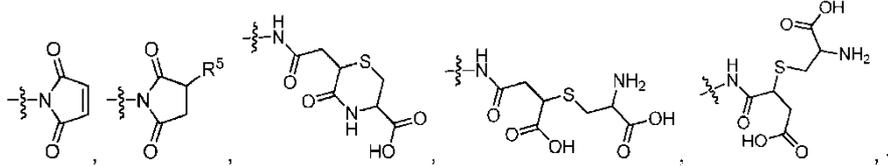
L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-

-((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,

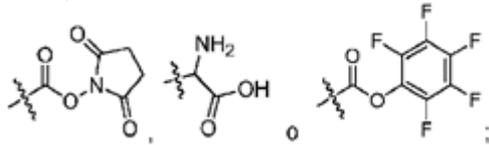
-C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-,

-C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-;

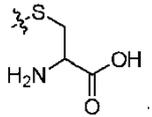
20 R⁴ es



ONH₂, -NH₂



R⁵ es

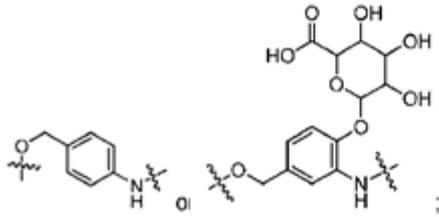


X₁ es

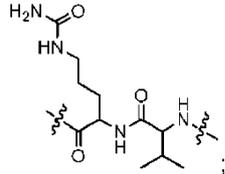


X₂ es

25



X₃ es



5 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4 y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

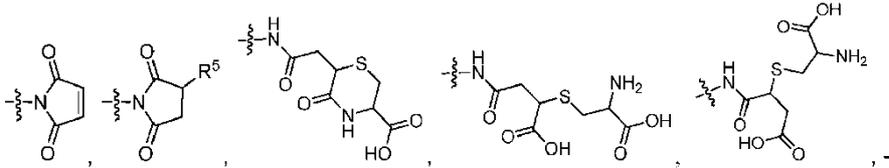
Realización 7. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

R¹ es -NHR²;

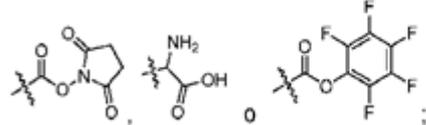
R² es alquilo C₄-C₆;

10 L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n- o -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-;

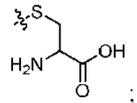
R⁴ es



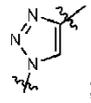
15 ONH₂, -NH₂



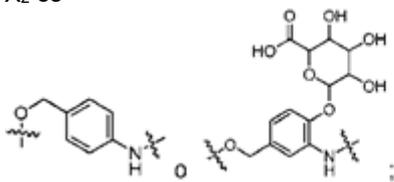
R⁵ es



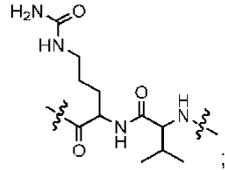
X₁ es



20 X₂ es



X₃ es



25 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4 y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

Realización 8. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

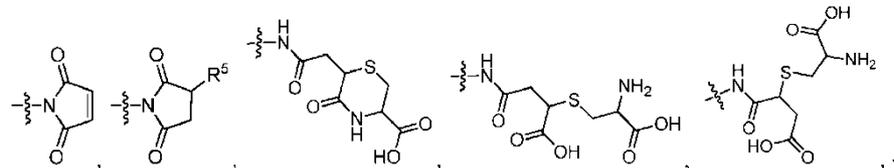
R¹ es -NHR²;

R² es alquilo C₄-C₆;

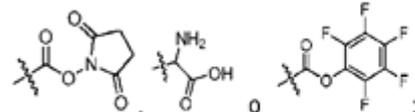
L₂ es -(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_n;

R⁴ es

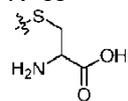
5



ONH₂, -NH₂



R⁵ es



10

y

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4.

Realización 9. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

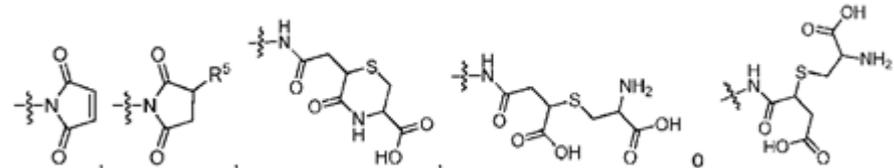
R¹ es -NHR²;

R² es alquilo C₄-C₆;

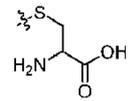
L₂ es -(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_n;

R⁴ es

15



R⁵ es



20

y

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4.

Realización 10. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

R¹ es -NHR²;

R² es alquilo C₄-C₆;

L₂ es -(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_n;

R⁴ es -ONH₂ o -NH₂;

y

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4.

25

30

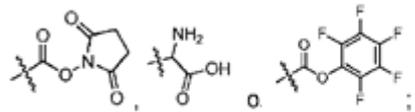
Realización 11. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

R¹ es -NHR²;

R² es alquilo C₄-C₆;

L₂ es -(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_n;

R⁴ es



35

y

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4.

Realización 12. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: R¹ es -NHR².

Realización 13. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: R¹ es -NHCHR²R³.

40

Realización 14. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: R² es -alquilo C₄.

Realización 15. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: R² es -alquilo C₅.

Realización 16. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: R² es -alquilo C₆.

Realización 17. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: R³ es L₁OH.

Realización 18. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: L₁ es -(CH₂)_n.

Realización 19. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: L₁ es -(CH₂CH₂)_n.

5 Realización 20. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:
L₂ es -(CH₂)_n*, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n*, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n*, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n*,
(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n* o -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n*, en que el * designa el punto de unión a R⁴.

Realización 21. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

10 L₂ es -C(=O)(CH₂)_n*, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n*, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n*,
-C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n*, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n*,
C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n*, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n*, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n* o -
C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n*, en que el * designa el punto de unión a R⁴.

Realización 22. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

15 L₂ es -(CH₂)_n* o -C(=O)(CH₂)_n*, en que el * designa el punto de unión a R⁴.

Realización 23. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

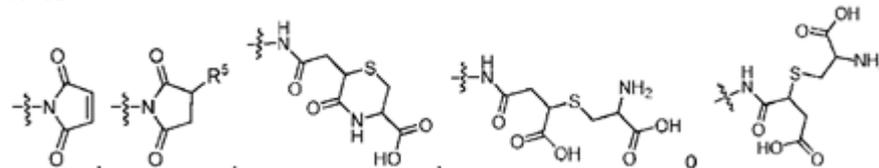
L₂ es -(CH₂CH₂)_n* o -C(=O)(CH₂CH₂)_n*, en que el * designa el punto de unión a R⁴.

Realización 24. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

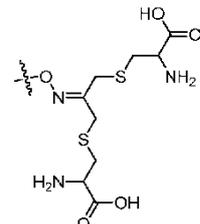
20 L₂ es -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n*, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n*, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂*,
-C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n* o -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n*, en que el * designa el punto de unión a R⁴.

Realización 25. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

R⁴ es



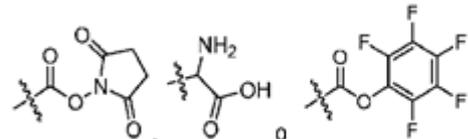
25 Realización 26. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:
R⁴ es -ONH₂



o -NH₂.

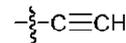
Realización 27. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

30 R⁴ es

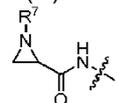


Realización 28. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

R⁴ es -NHC(=O)CH=CH₂, -N₃,



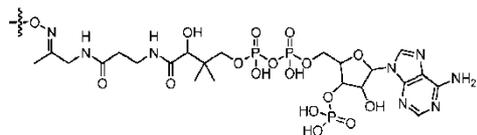
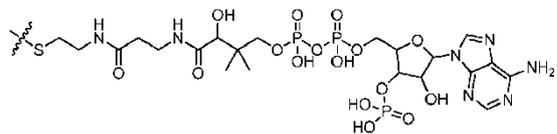
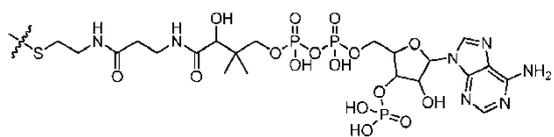
35 SH, -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,



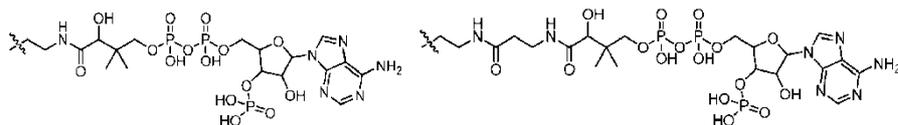
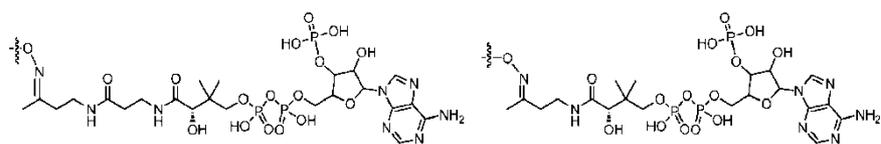
-CO₂H, -NHCH(=O) o -NHCH(=S).

Realización 29. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

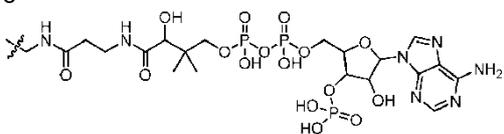
40 R⁴ es



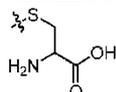
5



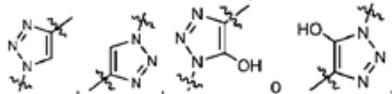
10 o



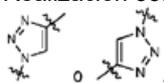
Realización 30. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: R⁴ es -SR⁷ u -OH.
Realización 31. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde R⁵ es



15 Realización 32. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₁ es



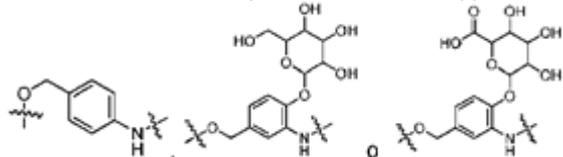
Realización 33. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₁ es



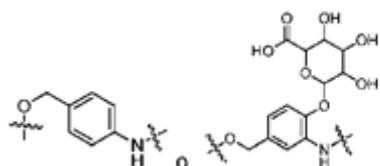
Realización 34. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₁ es



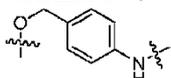
20 Realización 35. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₂ es



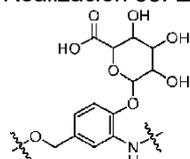
Realización 36. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₂ es



Realización 37. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₂ es

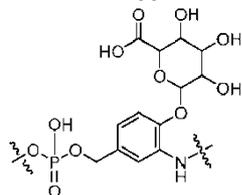


Realización 38. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₂ es

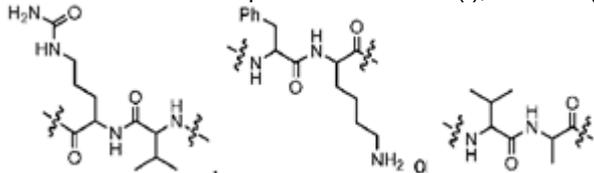


5

Realización 39. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₂ es

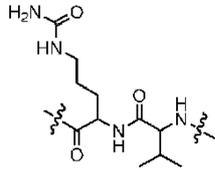


Realización 40. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₃ es

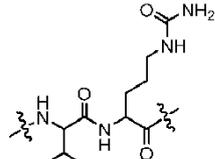


10

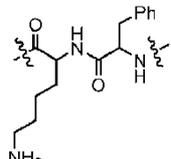
Realización 41. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₃ es



Realización 42. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₃ es

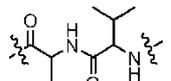


Realización 43. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₃ es



15

Realización 44. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: X₃ es



Realización 45. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo.

20

Realización 46. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde cada uno de los R⁷ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆.

Realización 47. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde cada uno de los R⁷ es H.

Realización 48. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde cada uno de los R⁷ es alquilo C₁-C₆.

- Realización 49. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4.
- Realización 50. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde cada uno de los m es 1 o 2.
- Realización 51. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4.
- Realización 52. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde cada uno de los n es 2 o 3.
- Realización 53. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.
- Realización 54. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5 y 6.
- Realización 55. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), seleccionado de:
 1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona;
 ácido (2R)-2-amino-3-((1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-2,5-dioxopirrolidin-3-il)tio)propanoico;
 ácido (6R)-6-(2-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-2-oxoetil)-5-oxotiomorfolina-3-carboxílico;
 ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
 1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-pirrol-2,5-diona;
 ácido (2S)-2-amino-3-((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-2,5-dioxopirrolidin-3-il)tio)propanoico;
 ácido (6R)-6-(2-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-2-oxoetil)-5-oxotiomorfolina-3-carboxílico;
 ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 1-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)-1 H-pirrol-2,5-diona;
 ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
 1-(2-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona;
 ácido (2R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,19-dioxo-10,13,16-trioxa-4-tia-7-azanonadecan-1-oico;

- ácido (2R,5S)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,19-dioxo-10,13,16-trioxa-4-tia-7-azanonadecan-1-oico;
- ácido (2R,5R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,19-dioxo-10,13,16-trioxa-4-tia-7-azanonadecan-1-oico;
- 5 ácido (19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,14-dioxo-4,7,10-trioxa-17-tia-13-azaicosan-20-oico;
- ácido (16R,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,14-dioxo-4,7,10-trioxa-17-tia-13-azaicosan-20-oico;
- ácido (16S,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,14-dioxo-4,7,10-trioxa-17-tia-13-azaicosan-20-oico;
- 10 1-(21-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosil)-1H-pirrol-2,5-diona;
- ácido (2R)-2-amino-28-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,28-dioxo-10,13,16,19,22,25-hexaoxa-4-tia-7-azaotacosan-1-oico;
- 15 ácido (2R,5S)-2-amino-28-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,28-dioxo-10,13,16,19,22,25-hexaoxa-4-tia-7-azaotacosan-1-oico;
- ácido (2R,5R)-2-amino-28-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,28-dioxo-10,13,16,19,22,25-hexaoxa-4-tia-7-azaotacosan-1-oico;
- ácido (28R)-28-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-25-carboxi-1,23-dioxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-26-tia-22-azanonacosan-29-oico;
- 20 ácido (25R,28R)-28-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-25-carboxi-1,23-dioxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-26-tia-22-azanonacosan-29-oico;
- ácido (25S,28R)-28-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-25-carboxi-1,23-dioxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-26-tia-22-azanonacosan-29-oico;
- 25 1-((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1H-pirrol-2,5-diona;
- ácido (2R)-2-amino-3-((2-(((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-2-oxoetil)tio)pentanodioico;
- 30 N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida;
- ácido (19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-(carboximetil)-1,11,15-trioxa-4,7-dioxa-17-tia-10,14-diazaicosan-20-oico;
- ácido (16S,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-(carboximetil)-1,11,15-trioxa-4,7-dioxa-17-tia-10,14-diazaicosan-20-oico;
- 35 ácido (16R,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-(carboximetil)-1,11,15-trioxa-4,7-dioxa-17-tia-10,14-diazaicosan-20-oico;
- ácido (20R)-20-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-17-carboxi-1,11,15-trioxa-4,7-dioxa-18-tia-10,14-diazahenicosan-21-oico;
- ácido (17R,20R)-20-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-17-carboxi-1,11,15-trioxa-4,7-dioxa-18-tia-10,14-diazahenicosan-21-oico;
- 40 ácido (17S,20R)-20-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-17-carboxi-1,11,15-trioxa-4,7-dioxa-18-tia-10,14-diazahenicosan-21-oico;
- 5-(4-(4-(3-aminopropil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina;
- 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona;
- 45 N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida;
- ácido (2R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,9,19-trioxa-13,16-dioxa-4-tia-7,10-diazanonadecan-1-oico;
- 50 ácido (2R,5S)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,9,19-trioxa-13,16-dioxa-4-tia-7,10-diazanonadecan-1-oico;
- ácido (2R,5R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,9,19-trioxa-13,16-dioxa-4-tia-7,10-diazanonadecan-1-oico;
- ácido (19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,11,14-trioxa-4,7-dioxa-17-tia-10,13-diazaicosan-20-oico;
- 55 ácido (16R,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,11,14-trioxa-4,7-dioxa-17-tia-10,13-diazaicosan-20-oico;
- ácido (16S,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,11,14-trioxa-4,7-dioxa-17-tia-10,13-diazaicosan-20-oico;
- 60 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)-N-(2-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazina-1-carboxamida;
- ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;

- ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- 5 ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- 10 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- 15 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- 20 1-(2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona;
- ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
- 25 ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
- ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
- ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
- 30 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
- ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;
- 1-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1H-pirrol-2,5-diona;
- 35 ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- 40 ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- 45 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico;
- N-(21-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida;
- 4-4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encilo;
- 50 ácido (2R,3R,4R,5S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico;
- (S)-1-(3-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona;
- 55 1-(3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona;
- ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
- 60 ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
- ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
- ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
- 65 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;

- ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;
1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-(aminooxi)etanona;
- 5 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-aminoetoxi)propan-1-ona;
N-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida;
- 10 (S)-1-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-(aminooxi)etanona;
(S)-1-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona;
(S)-N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida;
- 15 N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida;
5-(4-((4-(2-(2-(aminooxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrol[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina;
- 20 N-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)-2-(aminooxi)acetamida;
5-(4-((4-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrol[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina;
- 25 N-(2-(2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida;
5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo;
5-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de (S)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo;
- 30 ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(3-((2-amino-4-(((S)-1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico;
ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico;
- 35 5-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)amino)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo;
ácido (S)-2-amino-6-(5-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)amino)-5-oxopentanamido)hexanoico;
- 40 5-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo;
ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico;
- 45 5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de perfluorofenilo;
3-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)propanoato de perfluorofenilo;
- 50 3-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)propanoato de perfluorofenilo;
ácido (S)-2-amino-6-(3-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)propanamido)hexanoico y
N-(15-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecil)-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida.
- Realización 56. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), seleccionado de:
1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona;
- 55 1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-pirrol-2,5-diona;
1-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)-1 H-pirrol-2,5-diona y
1-(2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona.
- 60 Realización 57. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), seleccionado de:
ácido (2R,3R,4R,5S)-6-(4-((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico;
- 65 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((R)-6-amino-2-((S)-2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3-fenilpropanamido)hexanamido)bencilo;

4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo; ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico; ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico; N-(2-((5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-metil-5-oxopentan-2-il)disulfanil)etil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida; 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-metil-4-(metiltio)pentan-1-ona; ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)(hidroxil)fosforil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico; (2R,2'R)-3,3'-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-oxoetoxi)imino)propano-1,3-diil)bis(sulfanodil)bis(ácido 2-aminopropanoico); ácido (R)-2-amino-6-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)metil)-17-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-10,17-dioxo-8,14-dioxa-4-tia-7,11-diazaheptadec-6-enoico y 2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etan-1-ol.

Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, ^2H o D) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una semivida in vivo incrementada o requisitos de dosis reducidos o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera un sustituyente de un compuesto de fórmula (I). La concentración de un isótopo más pesado de este tipo, específicamente deuterio, puede definirse por el factor de enriquecimiento isotópico. La expresión "factor de enriquecimiento isotópico", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la relación entre la abundancia isotópica y la abundancia natural de un isótopo especificado. Si un sustituyente en un compuesto de esta invención se denomina deuterio, dicho compuesto tendrá un factor de enriquecimiento isotópico para cada uno de los átomos de deuterio designados de al menos 3500 (52,5% de incorporación de deuterio en cada uno de los átomos de deuterio designados), al menos 4000 (60% de incorporación de deuterio), al menos 4500 (67,5% de incorporación de deuterio), al menos 5000 (75% de incorporación de deuterio), al menos 5500 (82,5% de incorporación de deuterio), al menos 6000 (90% de incorporación de deuterio), al menos 6333,3 (95% de incorporación de deuterio), al menos 6466,7 (97% de incorporación de deuterio), al menos 6600 (99% de incorporación de deuterio) o al menos 6633,3 (99,5% de incorporación de deuterio).

Solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquellos en los que el disolvente de cristalización puede estar isotópicamente sustituido, *p. ej.*, D_2O , d_6 -acetona, d_6 -DMSO.

Procedimientos para Hacer Compuestos de Fórmula (I) y sub-fórmulas de los mismos

En la presente se describen procedimientos generales para preparar compuestos de Fórmula (I) y sub-formulas de los mismos. En las reacciones descritas, los grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxil, amino, imino, tiol o carboxil, en los casos en los que estos se deseen en el producto final, pueden protegerse para evitar su participación no deseada en las reacciones. Dentro del alcance de este texto, únicamente un grupo que se pueda eliminar fácilmente que no sea constituyente del producto final particular deseado de los compuestos de la presente invención se denomina un "grupo protector", a menos que el contexto indique lo contrario. La protección de grupos funcionales con grupos protectores de este tipo, los propios grupos protectores y sus reacciones de escisión se describen, por ejemplo, en trabajos de referencia estándares tales como J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres y Nueva York 1973, en T. W. Greene y P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", tercera edición, Wiley, Nueva York 1999, en "The Peptides"; volumen 3 (editores: E. Gross y J. Meienhofer), Academic Press, Londres y Nueva York 1981, en "Methoden der organischen Chemie" (Methods of Organic Chemistry), Houben Weyl, 4ª edición, volumen 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, en H.-D. Jakubke y H. Jeschkeit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine" (Aminoácidos, Péptidos, Proteínas), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, y Basel 1982, y en Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate" (Química de carbohidratos: monosacáridos y derivados), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974. Una característica de los grupos protectores es que se pueden eliminar fácilmente (es decir, sin que se produzcan reacciones secundarias indeseadas), por ejemplo, mediante solvolisis, reducción, fotólisis o como alternativa en condiciones fisiológicas (por ejemplo, mediante escisión enzimática).

En determinadas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) y sub-fórmulas de los mismos, proporcionados en la presente, se preparan como una sal por adición de ácidos farmacéuticamente aceptable haciendo reaccionar la forma de base libre de un compuesto de Fórmula (I) y sus sub-formulas, con una cantidad estequiométrica de un ácido orgánico o ácido inorgánico farmacéuticamente aceptable apropiado o un reactivo de intercambio aniónico adecuado.

Reacciones de este tipo se llevan a cabo típicamente en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, en los casos en los que sea posible, es deseable el uso de medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo.

- 5 Alternativamente, las formas de sal de compuestos de Fórmula (I) y sub-fórmulas de los mismos, se preparan utilizando sales de los materiales de partida o compuestos intermedios.

Se pueden preparar sales de los compuestos de la presente invención que tienen al menos un grupo formador de sales de un modo conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las sales de los compuestos de la presente invención que tienen grupos ácidos se pueden formar, por ejemplo, tratando los compuestos con compuestos metálicos tales como sales de metales alcalinos de ácidos orgánicos carboxílicos adecuados, por ejemplo, la sal de sodio del ácido 2-etilhexanoico, con compuestos orgánicos de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como los correspondientes hidróxidos, carbonatos o hidrogenocarbonatos, tales como hidróxido, carbonato o hidrogenocarbonato de sodio o potasio, con los correspondientes compuestos de calcio o con amoníaco o una amina orgánica adecuada, usándose preferentemente cantidades estequiométricas o solo un pequeño exceso de agente formador de la sal. Las sales por adición de ácidos de los compuestos de la presente invención se obtienen de la manera habitual, p. ej., tratando los compuestos con un ácido o un reactivo de intercambio de aniones adecuado. Sales internas de compuestos de la presente invención que contienen grupos formadores de sales de carácter ácido y básico, p. ej., un grupo carboxi libre y un grupo amino libre, pueden formarse, p. ej., mediante la neutralización de sales, tales como sales por adición de ácidos, al punto isoelectrónico, p. ej., con bases débiles, o por tratamiento con intercambiadores de iones.

Las sales se pueden convertir en los compuestos libres de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las sales de metales y de amonio se pueden convertir, por ejemplo, mediante el tratamiento con ácidos adecuados, y las sales de adición de ácido, por ejemplo, mediante el tratamiento con un agente básico adecuado.

Todas las etapas del procedimiento arriba mencionadas se pueden llevar a cabo en condiciones de reacción que son conocidas por los expertos en la técnica, incluidas las mencionadas específicamente, en ausencia o, habitualmente, en presencia de disolventes o diluyentes, incluidos, por ejemplo, disolventes o diluyentes que son inertes hacia los reactivos utilizados y los disuelven, en ausencia o presencia de catalizadores, agentes de condensación o neutralizantes, por ejemplo, intercambiadores de iones, tales como intercambiadores de cationes, p. ej., en forma H^+ , dependiendo de la naturaleza de la reacción y/o de los reaccionantes a temperatura reducida, normal o elevada, por ejemplo en un intervalo de temperaturas de aproximadamente $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a aproximadamente $190\text{ }^{\circ}\text{C}$, que incluye, por ejemplo, de aproximadamente $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a aproximadamente $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, por ejemplo, de -80 a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, a temperatura ambiente, de -20 a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a temperatura de reflujo, bajo presión atmosférica o en un recipiente cerrado, cuando sea apropiado bajo presión y/o en una atmósfera inerte, por ejemplo, bajo una atmósfera de argón o nitrógeno.

Sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de Fórmula (I) y las sub-fórmulas de los mismos, incluyen formas de sales acetato, adipato, ascorbato, aspartato, benzoato, besilato, bencenosulfonato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, bromuro/hidrobromuro, sulfonato de alcanfor, camsilato, caprato, cloruro/hidrocloruro, cloroteofilinato, citrato, edisilato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, glucoheptonato, gluconato, glucuronato, glutamato, glutarato, glicolato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metanosulfonato, metilsulfato, mucato, naftoato, napsilato, 2-napsilato, naftalenosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno-fosfato/dihidrógeno-fosfato, poligalacturonato, propionato, sebacato, estearato, succinato, sulfosalicilato, sulfato, tartrato, tosilato, p-toluenosulfonato, trifluoroacetato, trifenatato, trifenilacetato y xinafoato.

El ácido orgánico o los ácidos inorgánicos utilizados para formar determinadas sales por adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de compuestos de Fórmula (I) y sub-fórmulas de los mismos, incluyen ácido acético, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido benzoico, ácido bencenosulfónico, ácido carbónico, ácido alcanforsulfónico, ácido cáprico, cloroteofilinato, ácido cítrico, ácido etanodisulfónico, ácido fumárico, ácido D-glicero-D-gulo-heptónico, ácido galáctarico, ácido galactárico/ácido múxico, ácido glucéptico, ácido glucoheptonoico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutamático, ácido glutárico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido yodhídrico, ácido isetiónico, ácido láctico, ácido lactobiónico, ácido laurilsulfúrico, ácido málico, ácido maleico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido mesílico, ácido metanosulfónico, ácido múxico, ácido naftoico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido naftalenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido nicotínico, ácido nítrico, ácido octadecanoico, ácido oleaico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido fosfórico, ácido poligalacturónico, ácido propiónico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfosalicílico, ácido sulfúrico, ácido tartárico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético y ácido trifenilacético.

En una realización, la presente invención proporciona 3-(3-fluoro-4-(3-(piperidin-4-il)propoxi)fenil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-amina en forma de una sal acetato, adipato, ascorbato, aspartato, benzoato, besilato, bencenosulfonato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, bromuro/hidrobromuro, sulfonato de alcanfor, camsilato, caprato, cloruro/hidrocloruro, cloroteofilinato, citrato, edisilato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, glucoheptonato,

gluconato, glucuronato, glutamato, glutarato, glicolato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metanosulfonato, metilsulfato, mucato, naftoato, napsilato, 2-napsilato, naftalenosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno-fosfato/dihidrógeno-fosfato, poligalacturonato, propionato, sebacato, estearato, succinato, sulfosalicilato, sulfato, tartrato, tosilato, p-toluenosulfonato, trifluoroacetato, trifenatato, trifenilacetato o xinafoato.

En una realización, la presente invención proporciona 3-(4-(((1r,4r)-4-aminociclohexil)metoxi)-3-fluorofenil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-amina en forma de una sal acetato, adipato, ascorbato, aspartato, benzoato, besilato, benzenosulfonato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, bromuro/hidrobromuro, sulfonato de alcanfor, camsilato, caprato, cloruro/hidrocloruro, cloroteofillinato, citrato, edisilato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, glucoheptonato, gluconato, glucuronato, glutamato, glutarato, glicolato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metanosulfonato, metilsulfato, mucato, naftoato, napsilato, 2-napsilato, naftalenosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno-fosfato/dihidrógeno-fosfato, poligalacturonato, propionato, sebacato, estearato, succinato, sulfosalicilato, sulfato, tartrato, tosilato, p-toluenosulfonato, trifluoroacetato, trifenatato, trifenilacetato o xinafoato.

En una realización, la presente invención proporciona 3-(4-((4-aminobiciclo[2.2.2]octan-1-il)metoxi)-3-fluorofenil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-amina en forma de una sal acetato, adipato, ascorbato, aspartato, benzoato, besilato, benzenosulfonato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, bromuro/hidrobromuro, sulfonato de alcanfor, camsilato, caprato, cloruro/hidrocloruro, cloroteofillinato, citrato, edisilato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, glucoheptonato, gluconato, glucuronato, glutamato, glutarato, glicolato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metanosulfonato, metilsulfato, mucato, naftoato, napsilato, 2-napsilato, naftalenosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno-fosfato/dihidrógeno-fosfato, poligalacturonato, propionato, sebacato, estearato, succinato, sulfosalicilato, sulfato, tartrato, tosilato, p-toluenosulfonato, trifluoroacetato, trifenatato, trifenilacetato o xinafoato.

En una realización, la presente invención proporciona 3-(4-((4-aminobiciclo[2.2.2]octan-1-i)metoxi)-3-clorofenil)-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-6-amina en forma de una sal acetato, adipato, ascorbato, aspartato, benzoato, besilato, benzenosulfonato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, bromuro/hidrobromuro, sulfonato de alcanfor, camsilato, caprato, cloruro/hidrocloruro, cloroteofillinato, citrato, edisilato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, glucoheptonato, gluconato, glucuronato, glutamato, glutarato, glicolato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metanosulfonato, metilsulfato, mucato, naftoato, napsilato, 2-napsilato, naftalenosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno-fosfato/dihidrógeno-fosfato, poligalacturonato, propionato, sebacato, estearato, succinato, sulfosalicilato, sulfato, tartrato, tosilato, p-toluenosulfonato, trifluoroacetato, trifenatato, trifenilacetato o xinafoato.

En una realización, la presente invención proporciona 4-((2-cloro-4-(6-metoxi-1-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)fenoxi)metil)biciclo[2.2.2]octan-1-amina en forma de una sal acetato, adipato, ascorbato, aspartato, benzoato, besilato, benzenosulfonato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, bromuro/hidrobromuro, sulfonato de alcanfor, camsilato, caprato, cloruro/hidrocloruro, cloroteofillinato, citrato, edisilato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, glucoheptonato, gluconato, glucuronato, glutamato, glutarato, glicolato, hipurato, hidroyoduro/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metanosulfonato, metilsulfato, mucato, naftoato, napsilato, 2-napsilato, naftalenosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/hidrógeno-fosfato/dihidrógeno-fosfato, poligalacturonato, propionato, sebacato, estearato, succinato, sulfosalicilato, sulfato, tartrato, tosilato, p-toluenosulfonato, trifluoroacetato, trifenatato, trifenilacetato o xinafoato.

Se pueden encontrar listas de sales por adición de ácidos adecuadas adicionales, p. ej., en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" de Stahl y Wermuth mencionadas específicamente o, por ejemplo, agua, ésteres, tales como alcanos inferiores de alquilo inferior, por ejemplo acetato de etilo, éteres, tales como éteres alifáticos, por ejemplo, dietiléter, o éteres cíclicos, por ejemplo tetrahidrofuran o dioxano, hidrocarburos aromáticos líquidos, tales como benceno o tolueno, alcoholes, tales como metanol, etanol o 1- o 2-propanol, nitrilos, tales como acetonitrilo, hidrocarburos halogenados, tales como cloruro de metileno o cloroformo, amidas de ácido, tales como dimetilformamida o dimetilacetamida, bases, tales como bases de nitrógeno heterocíclico, por ejemplo piridina o N-metilpirrolidin-2-ona, anhídridos del ácido carboxílico, tales como anhídridos de ácido alcanico inferior, por ejemplo anhídrido acético, hidrocarburos cíclicos, lineales o ramificados, tales como ciclohexano, hexano o isopentano, metilciclohexano o mezclas de esos disolventes, por ejemplo soluciones acuosas, a menos que se indique lo contrario en el descripción de los procedimientos. Dichas mezclas de disolventes también se pueden utilizar en el procesamiento, por ejemplo, mediante cromatografía o partición.

En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) y sub-fórmulas de los mismos se preparan o forman, como solvatos (p. ej., hidratos). En ciertas realizaciones, hidratos de compuestos de Fórmula (I) y sub-fórmulas de los mismos, se preparan por recristalización a partir de una mezcla de disolventes acuosos/orgánicos, utilizando disolventes orgánicos, tales como dioxina, tetrahidrofurano o metanol. Además, los compuestos de la presente invención, incluidas sus sales, también se pueden obtener en forma de sus hidratos o pueden incluir otros disolventes utilizados para su cristalización.

Los compuestos de la presente invención pueden formar solvatos de forma inherente o por diseño con disolventes farmacéuticamente aceptables (que incluyen agua); por lo tanto, se pretende que la invención englobe tanto formas solvatadas como no solvatadas. El término "solvato" se refiere a un complejo molecular de un compuesto de la presente invención (incluidas las sales farmacéuticamente aceptables del mismo) con una o más moléculas de disolvente. Moléculas disolventes son aquellas comúnmente utilizadas en la técnica farmacéutica, que se sabe que son inocuas para el receptor, p. ej., agua, etanol. El término "hidrato" se refiere al complejo en donde la molécula disolvente es agua.

Cualquier átomo asimétrico (p. ej., carbono o similar) del o de los compuestos de la presente invención puede estar presente en configuración racémica o enriquecida enantioméricamente, por ejemplo, la configuración (*R*), (*S*) o (*R,S*). En ciertas realizaciones, cada uno de los átomos asimétricos tiene al menos 50% de exceso enantiomérico, al menos 60% de exceso enantiomérico, al menos 70% de exceso enantiomérico, al menos 80% de exceso enantiomérico, al menos 90% de exceso enantiomérico, al menos 95% de exceso enantiomérico, o al menos 99% de exceso enantiomérico en la configuración (*R*) o (*S*). Los sustituyentes en átomos con dobles enlaces insaturados pueden estar presentes, si es posible, en forma *cis* (*Z*) o *trans* (*E*).

Por consiguiente, tal como se utiliza en la presente, un compuesto de la presente invención puede estar en forma de uno de los posibles isómeros, rotámeros, atropisómeros, tautómeros o mezclas de estos, por ejemplo, como racematos, isómeros ópticos (enantiómeros), diastereómeros, isómeros geométricos (*cis* o *trans*) sustancialmente puros o mezclas de estos.

Cualquier mezcla resultante de isómeros puede separarse en base a los productos fisico-químicos (antípodos), racematos o mezclas de los mismos.

Cualesquiera mezclas de isómeros resultantes se pueden separar en base a las diferencias físico-químicas de los constituyentes, en isómeros, diastereómeros, racematos puros o sustancialmente puros, geométricos u ópticamente puros, por ejemplo, por cromatografía y/o cristalización fraccionada.

Cualesquiera racematos resultantes de productos finales o intermedios puede resolverse en las antípodos ópticas por métodos conocidos, p. ej., por separación de sus sales diastereoméricas, obtenidas con un ácido o base ópticamente activo, y liberando el compuesto de carácter ácido o básico ópticamente activo. En particular, se puede emplear un resto de carácter básico para resolver los compuestos de la presente invención en sus antípodos ópticas, p. ej., por cristalización fraccionada de una sal formada con un ácido ópticamente activo, p. ej., ácido tartárico, ácido dibenzoil tartárico, ácido diacetil tartárico, ácido di-*O,O'*-*p*-toluolil tartárico, ácido mandélico, ácido málico o ácido alcanfor-10-sulfónico. Los productos racémicos también se pueden resolver mediante cromatografía quiral, p. ej., cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un adsorbente quiral.

En ciertas realizaciones, los compuestos de Fórmula (I) o sub-fórmulas de los mismos se preparan como sus estereoisómeros individuales. En otras realizaciones, los compuestos de Fórmula (I), o sub-fórmulas de los mismos, se preparan como sus estereoisómeros individuales haciendo reaccionar una mezcla racémica del compuesto con un agente de resolución ópticamente activo para formar un par de compuestos diastereoisoméricos, separando los diastereómeros y recuperando los enantiómeros ópticamente puros. En ciertas realizaciones, la resolución de enantiómeros se lleva a cabo utilizando derivados diastereoméricos covalentes de los compuestos de Fórmula (I), o sub-fórmulas de los mismos, o utilizando complejos disociables (p. ej., sales diastereoméricas cristalinas). Los diastereómeros tienen propiedades físicas (p. ej., puntos de fusión, puntos de ebullición, solubilidad, reactividad, etc.) diferentes y se separan fácilmente aprovechando estas diferencias. En ciertas realizaciones, los diastereómeros se separan por cromatografía o por técnicas de separación/resolución basadas en diferencias de solubilidad. Después, el enantiómero ópticamente puro se recupera, junto con el agente de resolución, por cualquier medio práctico que no provoque racemización. Se puede encontrar una descripción más detallada de las técnicas aplicables para la resolución de estereoisómeros de compuestos a partir de su mezcla racémica en Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley And Sons, Inc., 1981.

Mezclas de isómeros obtenibles de acuerdo con la invención pueden separarse de una manera conocida por los expertos en la técnica en los isómeros individuales; los diastereoisómeros se pueden separar, por ejemplo, mediante la partición entre mezclas de disolventes polifásicos, recristalización y/o separación cromatográfica, por ejemplo sobre gel de sílice o, p. ej., mediante cromatografía líquida de presión media sobre una columna de fase inversa, y los racematos se pueden separar, por ejemplo, mediante la formación de sales con reactivos formadores de sales ópticamente puros y la separación de la mezcla de diastereoisómeros así obtenibles, por ejemplo, por cristalización

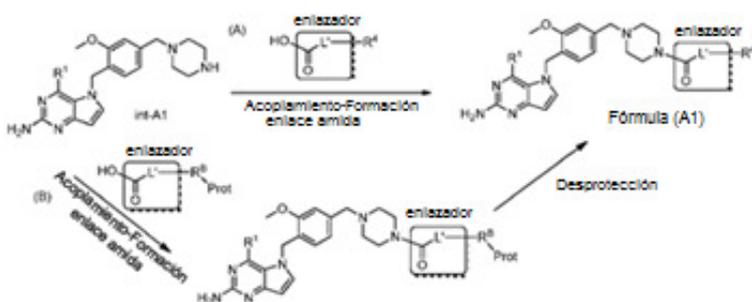
fraccionada, o por cromatografía sobre materiales de columna ópticamente activos, o como mezclas de los mismos, por ejemplo, como isómeros ópticos puros, o como mezclas de isómeros, tales como racematos y mezclas de diastereoisómeros, dependiendo del número de átomos de carbono asimétricos. Se pretende que la presente invención incluya todos los posibles isómeros de este tipo, incluidas las mezclas racémicas, mezclas diastereoméricas y formas ópticamente puras. Isómeros (R) y (S) ópticamente activos pueden prepararse utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o pueden resolverse utilizando técnicas convencionales. Si el compuesto contiene un doble enlace, el sustituyente puede tener la configuración E o Z. Si el compuesto contiene un cicloalquilo disustituido, el sustituyente del cicloalquilo puede tener una configuración cis o trans. También se pretende que todas las formas tautoméricas estén incluidas.

Productos intermedios y finales pueden elaborarse y/o purificarse de acuerdo con métodos estándares, *p. ej.*, utilizando métodos cromatográficos, métodos de distribución, (re)cristalización. La invención se refiere también a aquellas formas del procedimiento en las cuales se utiliza como material de partida un compuesto que se puede obtener como compuesto intermedio en cualquier etapa del proceso y se llevan a cabo las etapas restantes del procedimiento, o en las cuales un material de partida se forma en las condiciones de reacción o se utiliza en forma de derivado, por ejemplo, en una forma protegida o en forma de una sal, o un compuesto que se puede obtener mediante el procedimiento de acuerdo con la invención se produce en las condiciones del procedimiento y se procesa posteriormente in situ. Todos los materiales de partida, bloques de construcción, reactivos, ácidos, bases, agentes deshidratantes, disolventes y catalizadores utilizados para sintetizar los compuestos de la presente invención están disponibles comercialmente o pueden producirse mediante métodos de síntesis orgánicos conocidos por un experto en la técnica.

Compuestos de Fórmula (I) y sus sub-fórmulas (Fórmula (Ia) y Fórmula (Ib)) se preparan mediante procedimientos descritos en los esquemas generales de la presente y como se ilustra en los Ejemplos.

El Esquema 1A ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de fórmula (A1), en que el resto -enlazador- R^4 está unido al compuesto intermedio (int-A1) mediante un enlace amida. En el esquema 1A, el enlazador es cualquier enlazador (L^1) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L^1-C(=O)$). También en el Esquema 1A, R^1 es como se describe en la presente y R^4 es un resto reactivo que puede reaccionar con un tiol, un disulfuro, una amina, una cetona, una dicetona, una azida o un alquino. El Esquema 1B ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de fórmula (A1), en que el resto -enlazador- R^4 está unido al compuesto intermedio (int-A1) mediante un enlace amida. En el esquema 1B, el enlazador es cualquier enlazador (L^1) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L^1-C(=O)$). También en el Esquema 1B, R^1 es como se describe en la presente y el resto R^4 que tiene un grupo amino (tal como una hidroxilamina o una amina) y R^B se tiene un resto de un grupo amino protegido, en que Prot es un grupo protector tal como Boc, Fmoc y Cbz.

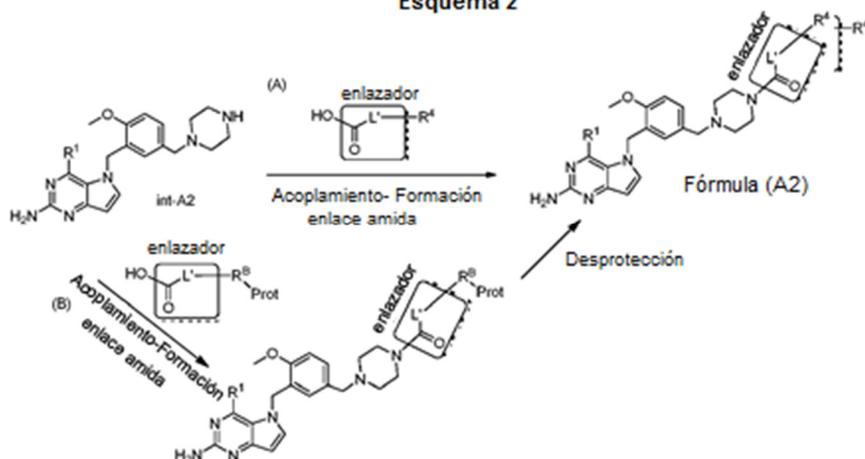
Scheme 1



Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P.

El Esquema 2A ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de fórmula (A2), en que el resto -enlazador- R^4 está unido al compuesto intermedio (int-A2) mediante un enlace amida. En el esquema 2A, el enlazador es cualquier enlazador (L^1) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L^1-C(=O)$). También en el Esquema 2A, R^1 es como se describe en la presente y R^4 es un resto reactivo que puede reaccionar con un tiol, un disulfuro, una amina, una cetona, una dicetona, una azida o un alquino. El Esquema 2B ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de fórmula (A2), en que el resto -enlazador- R^4 está unido al compuesto intermedio (int-A2) mediante un enlace amida. En el esquema 2B, el enlazador es cualquier enlazador (L^1) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L^1-C(=O)$). También en el Esquema 2B, R^1 es como se describe en la presente y el resto R^4 que tiene un grupo amino (tal como una hidroxilamina o una amina) y R^B se tiene un resto de un grupo amino protegido, en que Prot es un grupo protector tal como Boc, Fmoc y Cbz.

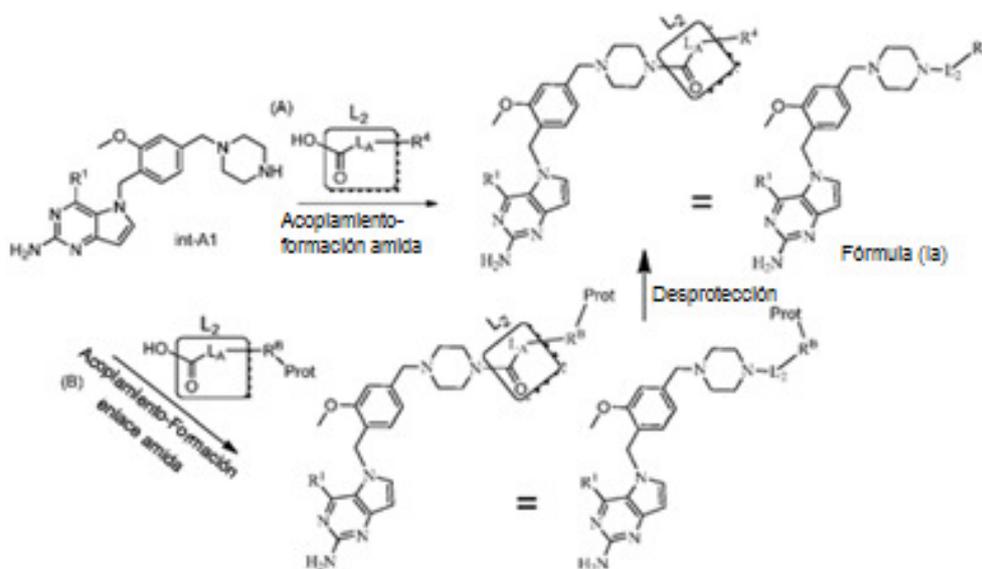
Esquema 2



Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P.

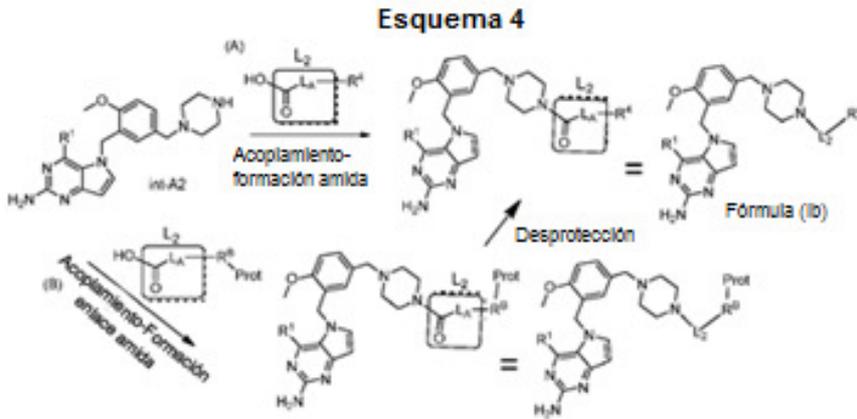
- 5 El Esquema 3A ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (Ia), en donde el resto $-L_2-R^4$ está unido al compuesto intermedio (int-A1) mediante un enlace amida. Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P. En el esquema 3A, el enlazador (L_2) es cualquier resto enlazador (L_A) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L_A-C(=O)$). El Esquema 3B ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (I), en donde el resto $-L_2-R^4$ está unido al compuesto intermedio (int-A1) mediante un enlace amida. Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P. En el Esquema 3B, el enlazador (L_2) comprende un resto enlazador (L_A) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L_A-C(=O)$), y R^B es un resto que tiene un grupo amino protegido, en que Prot es un grupo protector como Boc, Fmoc y Cbz.
- 10
- 15

Esquema 3

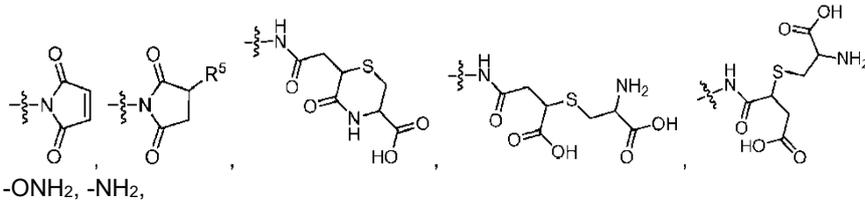


- El Esquema 4A ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (Ib), en donde el resto $-L_2-R^4$ está unido al compuesto intermedio (int-A2) mediante un enlace amida. Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P. En el esquema 4A, el enlazador (L_2) es cualquier resto enlazador (L_A) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L_A-C(=O)$). El Esquema 4B ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (Ib), en donde el resto $-L_2-R^4$ está unido al compuesto intermedio (int-A2) mediante un enlace amida. Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P. En el Esquema 4B, el enlazador (L_2) comprende un resto enlazador (L_A) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L_A-$
- 20
- 25

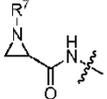
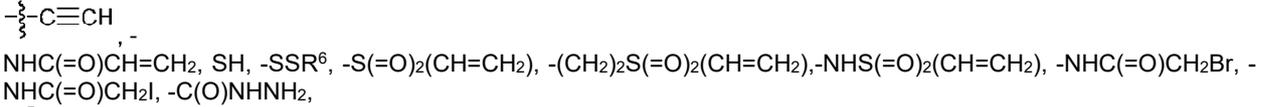
C(=O)), y R^B es un resto que tiene un grupo amino protegido, en que Prot es un grupo protector como Boc, Fmoc y Cbz.



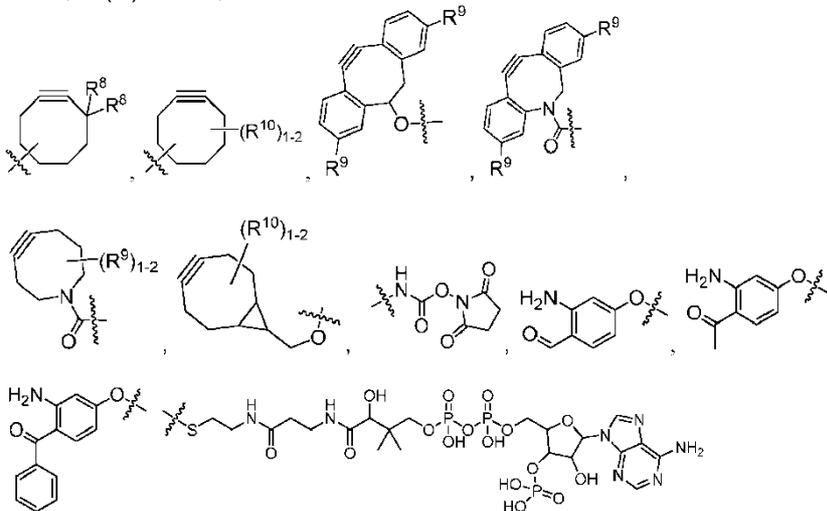
5 En los esquemas 3 y 4, R⁴ es



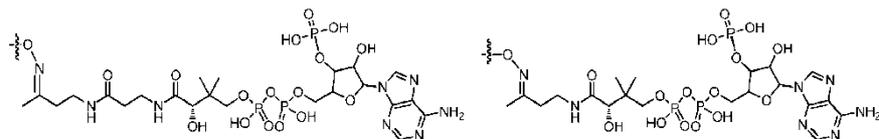
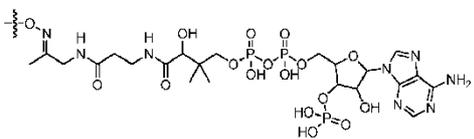
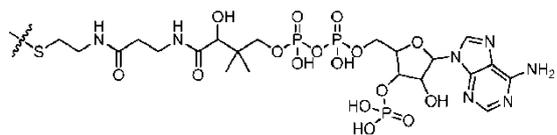
10



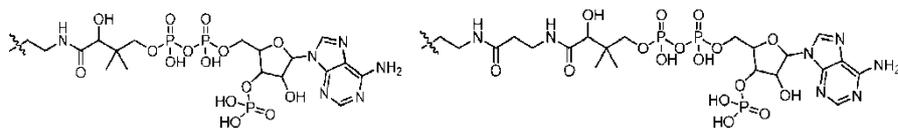
15 CO₂H, -C(O)NHNH₂,



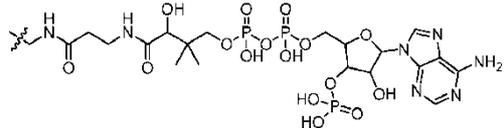
20



5



o

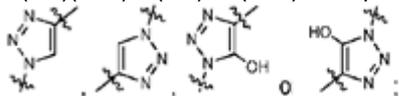


10 R^B es -ONH-;

L_A es $-(CH_2)_n-$, $-((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_n-$, $-NH((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-X_2X_3C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-X_2C(=O)(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$ o $-(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_n$;

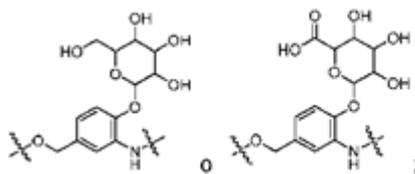
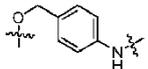
15

L_2 es $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-C(=O)X_2X_3C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-C(=O)X_2C(=O)(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$ o $-C(=O)(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_n$; en que X_1 es

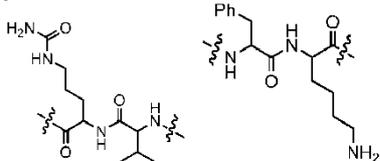


X_2 es

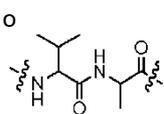
20



y X_3 e



25

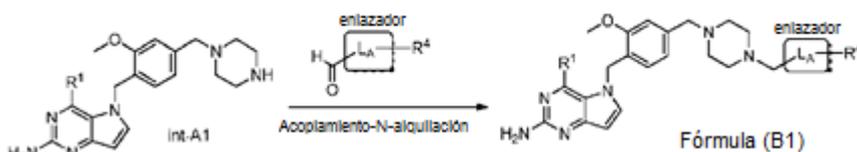


y

R¹, R⁷, R⁸, R⁹ y R¹⁰ son como se definen en la presente.

El Esquema 5 ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para preparar ciertos compuestos de Fórmula (B1), en que el resto -enlazador-R⁴ está unido al compuesto intermedio (int-A1) por alquilación de la amina secundaria del compuesto intermedio (int-A1). En el Esquema 5, el enlazador (L_A) se funcionaliza inicialmente con un aldehído terminal (es decir, -L_A-C(=O)H) y luego se hace reaccionar con la amina secundaria del compuesto intermedio (int-A1). También en el Esquema 5, R¹ es como se describe en la presente y R⁴ es un resto reactivo que puede reaccionar con un tiol, un disulfuro, una amina, una cetona, una dicetona, una azida o un alquino.

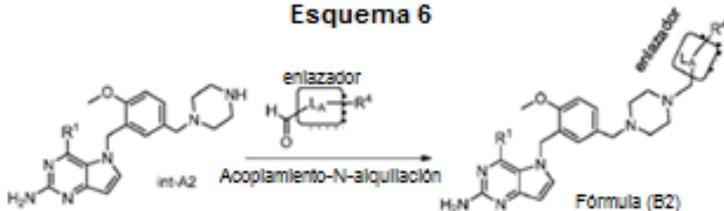
Esquema 5



Una N-alkilación de este tipo se puede lograr utilizando un agente reductor tal como NaCNBH₃, NaBH₄ o NaBH(OAC)₃.

El Esquema 6 ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para preparar ciertos compuestos de Fórmula (B2), en que el resto -enlazador-R⁴ está unido al compuesto intermedio (int-A2) por alquilación de la amina secundaria del compuesto intermedio (int-A2). En el Esquema 6, el enlazador (L_A) se funcionaliza inicialmente con un aldehído terminal (es decir, -L_A-C(=O)H) y luego se hace reaccionar con la amina secundaria del compuesto intermedio (int-A2). También en el Esquema 6, R¹ es como se describe en la presente y R⁴ es un resto reactivo que puede reaccionar con un tiol, un disulfuro, una amina, una cetona, una dicetona, una azida o un alquino.

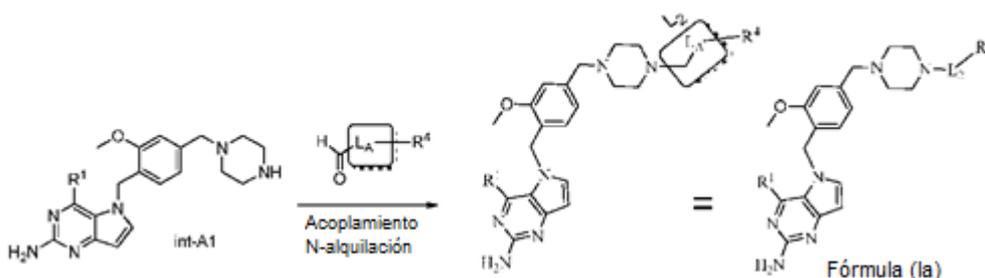
Esquema 6



Una N-alkilación de este tipo se puede lograr utilizando un agente reductor tal como NaCNBH₃, NaBH₄ o NaBH(OAC)₃.

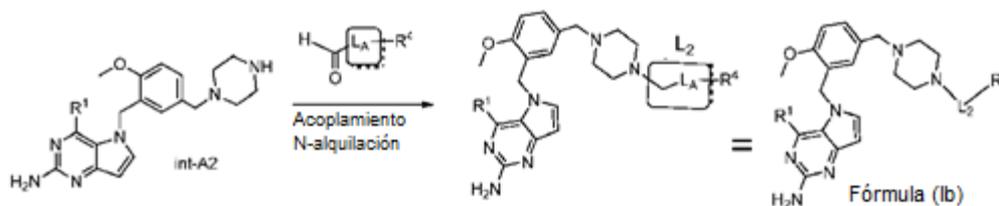
El Esquema 7 ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (Ia), en donde el resto -L₂-R⁴ está unido al compuesto intermedio (int-A1) por alquilación de la amina secundaria del compuesto intermedio (int-A1). En el Esquema 7, el resto enlazador, L_A, inicialmente funcionalizado con un aldehído terminal (es decir, -L_A-C(=O)H) se hace luego reaccionar con la amina secundaria del compuesto intermedio (int-A1), formando con ello el enlazador, L₂, que comprende el resto enlazador L_A con un grupo -CH₂- terminal. Una N-alkilación de este tipo se puede lograr utilizando un agente reductor tal como NaCNBH₃, NaBH₄ o NaBH(OAC)₃.

Esquema 7



El Esquema 8 ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (Ib), en donde el resto -L₂-R⁴ está unido al compuesto intermedio (int-A2) por alquilación de la amina secundaria del compuesto intermedio (int-A2). En el Esquema 8, el resto enlazador (L_A), inicialmente funcionalizado con un aldehído terminal (es decir, -L_A-C(=O)H) se hace luego reaccionar con la amina secundaria del compuesto intermedio (int-A2), formando con ello el enlazador, L₂, que comprende el resto enlazador L_A con un grupo -CH₂- terminal. Una N-alkilación de este tipo se puede lograr utilizando un agente reductor tal como NaCNBH₃, NaBH₄ o NaBH(OAC)₃.

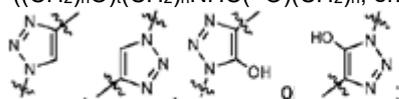
Esquema 8



En los Esquemas 7 y 8,

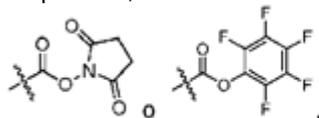
R⁴ es como se define para los Esquemas 3 y 4;

- 5 L_A es -(CH₂)_(n-1)-, -((CH₂)_(n-1)O)((CH₂)_nO)_i(CH₂)_n-, -(CH₂)_(n-1)X₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_(n-1)NHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_(n-1)NHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n- o -((CH₂)_(n-1)O)((CH₂)_nO)_i(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n;
- L₂ es -(CH₂)_n-, -(CH₂)_nO)_i(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n- o -((CH₂)_nO)_i(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n; en que X₁ es

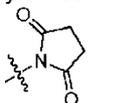


- 10 y
R¹ y R⁷ son como se definen en la presente.

El Esquema 9 ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (A1), en que el resto -enlazador-R⁴ está unido al compuesto intermedio (int-A1) mediante un enlace amida. En el esquema 9, el enlazador es cualquier enlazador (L') que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, -L'-C(=O)). También en el Esquema 9, R¹ es como se describe en la presente, R⁴ es

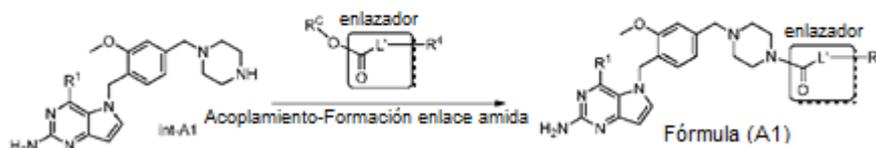


y R^C es



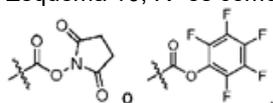
- 20 o
-

Esquema 9

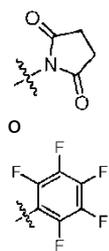


- 25 Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P.

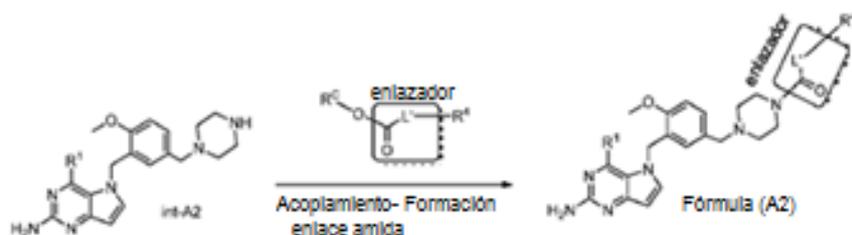
El Esquema 10 ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (A2), en que el resto -enlazador-R⁴ está unido al compuesto intermedio (int-A2) mediante un enlace amida. En el esquema 10, el enlazador es cualquier enlazador (L') que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, -L'-C(=O)). También en el Esquema 10, R¹ es como se describe en la presente, R⁴ es



y R^C es



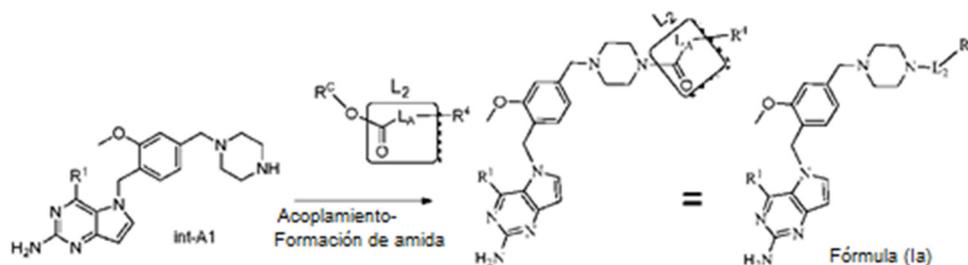
5 **Scheme 10**



Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P.

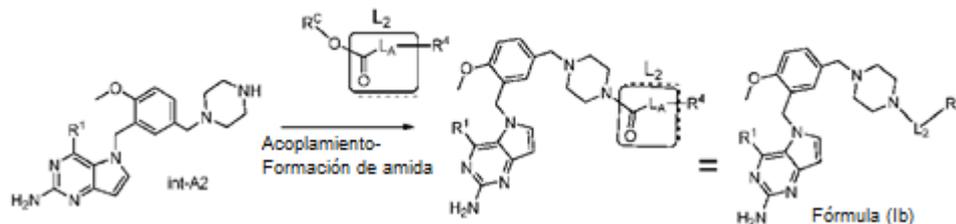
10 El Esquema 11 ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (1a), en donde el resto $-L_2-R^4$ está unido al compuesto intermedio (int-A1) mediante un enlace amida. En el esquema 11, el enlazador (L_2) comprende un resto enlazador (L_A) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L_A-C(=O)-$). Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P.

Esquema 11

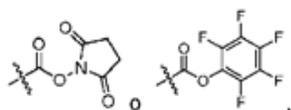


20 El Esquema 12 ilustra un esquema sintético no limitante utilizado para hacer ciertos compuestos de Fórmula (1b), en donde el resto $-L_2-R^4$ está unido al compuesto intermedio (int-A2) mediante un enlace amida. En el esquema 12, el enlazador (L_2) comprende un resto enlazador (L_A) que tiene un resto carbonilo terminal (es decir, $-L_A-C(=O)-$). Una formación de enlaces amida de este tipo se puede lograr utilizando calor, acoplamiento EDCI, acoplamiento HATU, acoplamiento HBTU, acoplamiento TBTU o acoplamiento T3P.

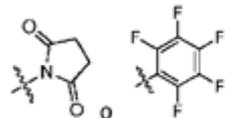
Esquema 12



25 En los Esquemas 11 y 12, R^4 es

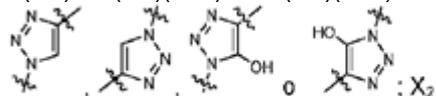


R^C es

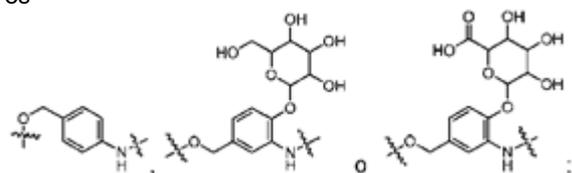


5 L_A es $-(CH_2)_n-$, $-((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-NH((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-X_2X_3C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-X_2C(=O)(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$; en que X₁ es

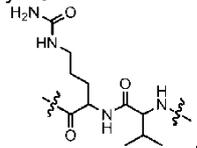
L₂ es $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-C(=O)X_2X_3C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-C(=O)X_2C(=O)(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$ o $-C(=O)(CH_2)_nC(=O)NH(CH_2)_n-$; en que X₁ es



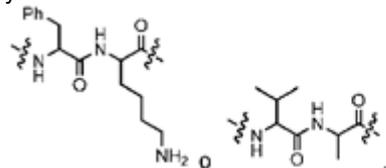
10 es



y X₃ e



15 y



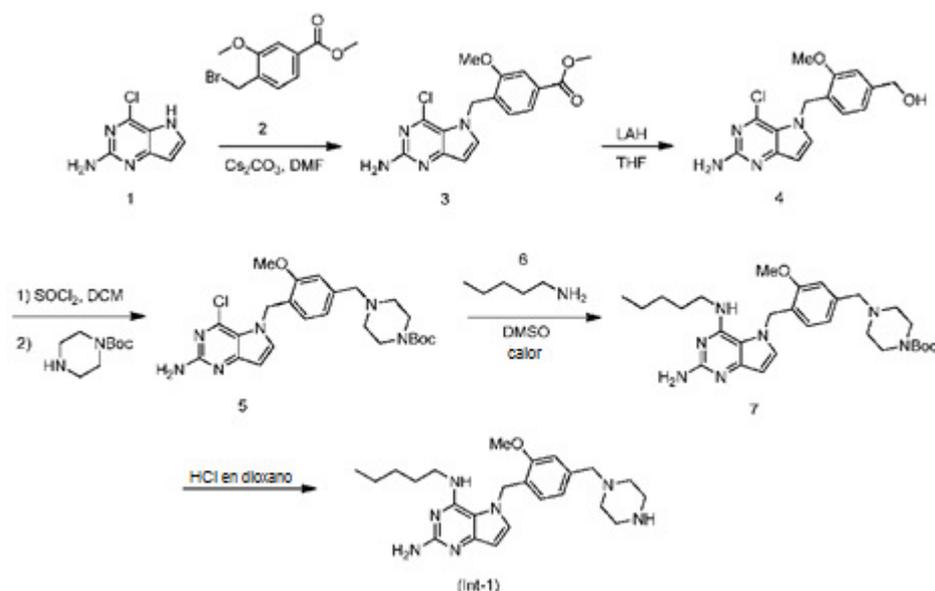
R¹ y R⁷ son como se definen en la presente.

Compuestos Intermedios

20 Se proporcionan a continuación las síntesis de los compuestos intermedios utilizados para preparar los compuestos de Fórmula (I) y sus sub-fórmulas (es decir, compuestos de Fórmula (Ia) y Fórmula (Ib)) de la invención.

Compuesto Intermedio 1

25 **Síntesis de 5-(2-metoxi-4-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirroló[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1)**



Etap 1: Preparación de 4-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibenzoato de metilo (3)

5
 10 Un matraz de fondo redondo se cargó con 4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-2-amina (1, disponible comercialmente, 1,0 equiv.), 4-(bromometil)-3-metoxibenzoato de metilo (2, disponible comercialmente, 1,0 equiv.), carbonato de cesio (1,0 equiv.) y DMF (1,0 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y el disolvente se separó en vacío. A la mezcla resultante se añadió EtOAc y el disolvente se separó en vacío. A esta mezcla se añadió DCM y el disolvente se separó en vacío. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por cromatografía ISCO (MeOH al 0-10%:DCM, gradiente) para proporcionar 4-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibenzoato de metilo (3) en forma de un sólido.

Etap 2: (4-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenil)metanol (4)

15
 20 Se preparó una suspensión de hidruro de litio y aluminio (LAH) (1,0 equiv., polvo) en THF (0,3 M) en un matraz de fondo redondo, se enfrió a 0 °C y se agitó vigorosamente durante 15 minutos. A esta mezcla se añadió en porciones 4-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibenzoato de metilo (3, 1,0 equiv. de la etapa anterior). El baño de hielo se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, añadiéndose LAH adicional hasta que se completó la reacción). Et₂O se añadió a la mezcla de reacción y la mezcla se transfirió después a un matraz Erlenmeyer y se enfrió a 0 °C bajo agitación vigorosa. La reacción se enfrió luego bruscamente mediante la adición lenta de una solución saturada de sulfato de sodio. Se obtuvo un precipitado blanco y la mezcla se filtró a través de una frita que contiene Celite y se lavó con THF y Et₂O. Los componentes volátiles se separaron luego en vacío y el material se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etap 3: 4-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de terc.-butilo (5)

30
 35 A un matraz de fondo redondo se añadió cloruro de tionilo (10,0 equiv.) que contenía 4-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxifenil)metanol (4, 1,0 equiv. De la etapa 2) en DCM (0,1 M) a 0 °C. Luego se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después, la mezcla de reacción se enfrió de nuevo a 0 °C y se enfrió bruscamente lentamente por adición de NaOH (1,0 M, 40,0 equiv.) y NaHCO₃ (ac.) saturado. El material se transfirió a un embudo separador y se lavó con DCM 3 veces. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y los componentes volátiles se separaron en vacío. El producto bruto resultante se disolvió luego en DMF (0,1 M) en un matraz de fondo redondo y se utilizó sin purificación adicional. A este material se añadió piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (1,0 equiv.) y base de Huenig (1,2 equiv.) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó luego con EtOAc, se transfirió a un embudo separador y se lavó con NaCl (ac.) saturado 2 veces y agua 2 veces. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y los componentes volátiles se separaron en vacío. La mezcla de reacción bruta se purificó por cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 10%:DCM, gradiente) para proporcionar 4-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de terc.-butilo (5) en forma de un sólido.

Etap 4: 4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de terc.-butilo (7)

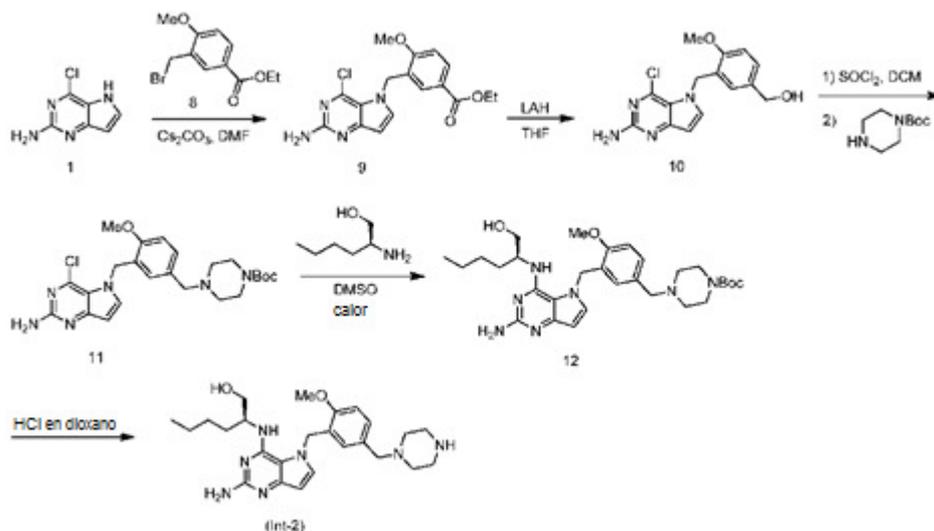
Se cargó un matraz de fondo redondo con 4-(4-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de terc.-butilo (5, 1,0 equiv. de la etapa 3), pentilamina disponible comercialmente (6, 3,0 equiv.), base de Huenig (5,0 equiv.) y DMSO (0,5 M). La mezcla de reacción se calentó a 120 °C y se agitó durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió luego a temperatura ambiente y se añadió agua. Esta mezcla se congeló luego y la mayoría de los componentes volátiles se separaron por liofilización. La mezcla de reacción bruta se purificó por cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 10% (el MeOH contenía NH₃ 0,7 N):DCM, gradiente) para proporcionar 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de terc.-butilo (7) en forma de un sólido.

Etapa 5: 5-(2-metoxi-4-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1)

HCl en dioxano (4,0 M, 20,0 equiv.) se añadió una solución de 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de terc-butilo. (6, 1,0 equiv. de la etapa 4) en DCM (0,1 M) en un matraz de fondo redondo a 0 ° C. Luego se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego se añadió NH₃ en MeOH (0,7 N) a la mezcla de reacción y los componentes volátiles se separaron en vacío. La adición de NH₃ en MeOH (0,7 N) y la separación de componentes volátiles en vacío se repitieron dos veces más. La mezcla de reacción bruta se purificó entonces mediante cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 20% (el MeOH contenía NH₃ 0,7 N):DCM, gradiente) para proporcionar 5-(2-metoxi-4-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1) en forma de un sólido: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,37 (d, 1H), 7,10 (s, 1H), 6,91 (d, 1H), 6,74 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,52 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,61 (s, 2H), 3,54 (t, 2H), 3,35 (s, 3H), 3,22 (m, 4H), 2,69 (m, 4H), 1,51 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,18 (m, 2H), 0,89 (s, 3H). LRMS [M+H] = 438,3.

Compuesto Intermedio 2

Síntesis de (S)-2-((2-amino-5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-il)amino)hexan-1-ol (Int-2)



Etapa 1: Preparación de 3-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibenzoato de etilo (9)

Un matraz de fondo redondo se cargó con 4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-2-amina (1, disponible comercialmente, 1,0 equiv.), 3-(bromometil)-4-metoxibenzoato de etilo (8, disponible comercialmente, 1,0 equiv.), carbonato de cesio (1,0 equiv.) y DMF (1,0 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El disolvente se separó luego en vacío. A esta mezcla se añadió EtOAc y el disolvente se separó en vacío. A esta mezcla se añadió DCM y el disolvente se separó en vacío. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por cromatografía ISCO (MeOH al 0-10%:DCM, gradiente) para proporcionar 3-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibenzoato de etilo (9) en forma de un sólido.

Etapa 2: (3-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxifenil)metanol (10)

Se preparó una suspensión de LAH (1,0 equiv., polvo) en THF (0,3 M) en un matraz de fondo redondo, se enfrió a 0 °C y se agitó vigorosamente durante 15 minutos. A esta mezcla se añadió en porciones 3-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibenzoato de etilo (9, 1,0 equiv. de la etapa 1). Luego se retiró el baño de hielo

y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas (si la reacción no se completaba en este momento, se añadió LAH adicional y la agitación continuó hasta que se completó la reacción). Después, la mezcla de reacción se transfirió a un matraz Erlenmeyer utilizando Et₂O. La mezcla se enfrió a 0 °C y se agitó vigorosamente. La reacción se enfrió luego bruscamente mediante la adición lenta de una solución saturada de sulfato de sodio. Se obtuvo un precipitado blanco y la mezcla se filtró a través de una frita que contiene Celite y se lavó con THF y Et₂O. Los componentes volátiles se separaron luego en vacío y el material se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Etapa 3: 4-(3-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de terc.-butilo (11)

A un matraz de fondo redondo se añadió cloruro de tionilo (10,0 equiv.) que contenía 3-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxifenil)metanol (10, 1,0 equiv. de la etapa 2) en DCM (0,1 M) a 0 °C. Luego se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se enfrió bruscamente lentamente por adición de NaOH (1,0 M, 40,0 equiv.) y NaHCO₃ (ac.) saturado. El material se transfirió a un embudo separador y se lavó con DCM 3 veces. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y los componentes volátiles se separaron en vacío. El producto bruto resultante se disolvió luego en DMF (0,1 M) en un matraz de fondo redondo y se utilizó sin purificación adicional. A este material se añadió piperazina-1-carboxilato de terc-butilo (1,0 equiv.) y base de Huenig (1,2 equiv.) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción se diluyó luego con EtOAc, se transfirió a un embudo separador y se lavó con NaCl (ac.) saturado 2 veces y agua 2 veces. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y los componentes volátiles se separaron en vacío. La mezcla de reacción bruta se purificó por cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 10%:DCM, gradiente) para proporcionar 4-(3-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de terc.-butilo (11) en forma de un sólido.

Etapa 4: 4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc.-butilo (12)

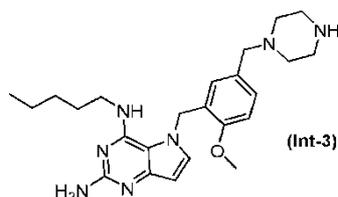
Se cargó un matraz de fondo redondo con 4-(3-((2-amino-4-cloro-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de terc.-butilo (11, 1,0 equiv. de la etapa 3), (S)-2-aminohexan-1-ol disponible comercialmente (3,0 equiv.), base de Huenig (5,0 equiv.) y DMSO (0,5 M). La mezcla de reacción se calentó a 120 °C y se agitó durante 18 horas. La mezcla de reacción se enfrió luego a temperatura ambiente y se añadió agua. Esta mezcla se congeló luego y la mayoría de los componentes volátiles se separaron por liofilización. La mezcla de reacción bruta se purificó por cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 10% (el MeOH contenía NH₃ 0,7 N):DCM, gradiente) para proporcionar 4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc.-butilo (12) en forma de un sólido.

Etapa 5: Ejemplo 1-(S)-2-((2-amino-5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-il)amino)hexan-1-ol (Int-2)

HCl en dioxano (4,0 M, 20,0 equiv.) se añadió una solución de 4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de (S)-terc.-butilo (12, 1,0 equiv. de la etapa 4) en DCM (0,1 M) en un matraz de fondo redondo a 0 °C. Luego se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego se añadió NH₃ en MeOH (0,7 N) a la mezcla de reacción y los componentes volátiles se separaron en vacío. La adición de NH₃ en MeOH (0,7 N) y la separación de componentes volátiles en vacío se repitieron dos veces más. La mezcla de reacción bruta se purificó entonces mediante cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 20% (el MeOH contenía NH₃ 0,7 N):DCM, gradiente) para proporcionar (S)-2-((2-amino-5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-4-il)amino)hexan-1-ol (Int-2) en forma de un sólido: ¹H (CD₃OD): δ 7,50 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 7,09 (d, 1H), 6,63 (s, 1H), 6,29 (d, 1H), 5,69 (d, 1H), 5,40 (d, 1H), 4,34 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,51 (m, 2H), 3,42 (s, 2H), 3,12 (m, 4H), 2,56 (m, 2H), 1,48 (m, 1H), 1,21 (m, 3H), 0,96 (m, 2H), 0,83 (t, 3H). LRMS [M+H] = 468,3.

Compuesto intermedio 3

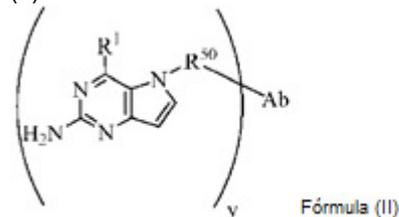
Síntesis de 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-3)



5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrol[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-3) se preparó de acuerdo con la síntesis de (S)-2-((2-amino-5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-4-il)amino)hexan-1-ol (Int-2), excepto que se utilizó N-pentilamina disponible comercialmente en lugar de (S)-2-aminohexan-1-ol en la Etapa 4. ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,42 (d, 1H), 7,32 (d, 1H), 7,09 (d, 1H), 6,70 (s, 1H), 6,25 (d, 1H), 5,54 (d, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,52 (t, 2H), 3,46 (s, 2H), 3,14 (m, 4H), 2,60 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,13 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H] = 438,3.

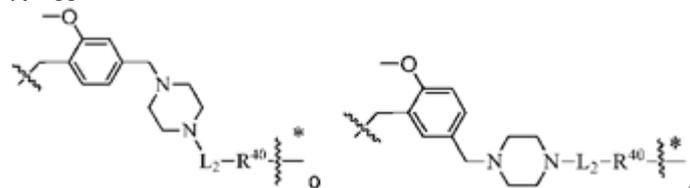
Conjugados de anticuerpos de la invención

Los conjugados de anticuerpos de la invención comprenden un agonista de TLR7 y tienen la estructura de Fórmula (II):



en donde:

R⁵⁰ es



en que el * indica el punto de unión a Ab;

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m;

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

-((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,

C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

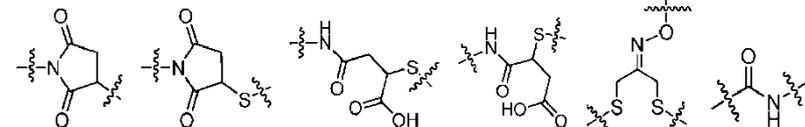
C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-,

C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-,

C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-,

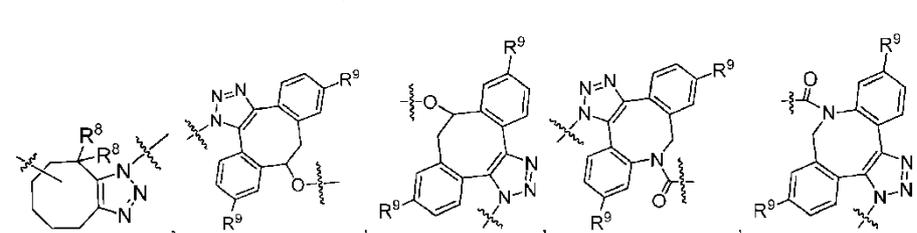
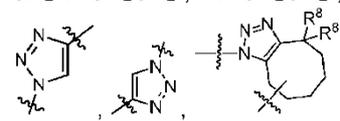
C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

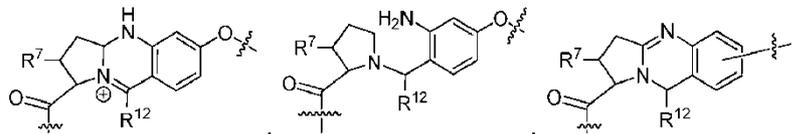
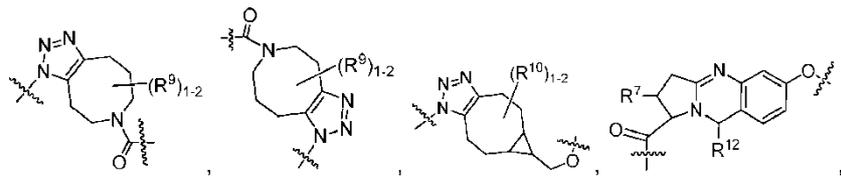
R⁴⁰ es



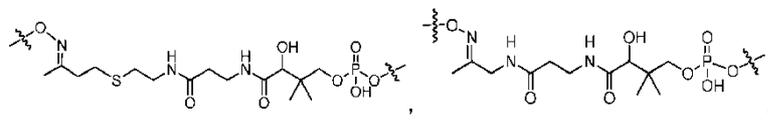
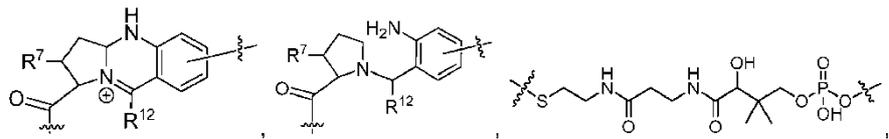
-S-, -NHC(=O)CH₂-, -S(=O)₂CH₂CH₂-, -(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-, -NHS(=O)₂CH₂CH₂-, -NHC(=O)CH₂CH₂-,

CH₂NHCH₂CH₂-, -NHCH₂CH₂-,

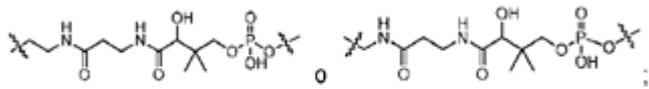
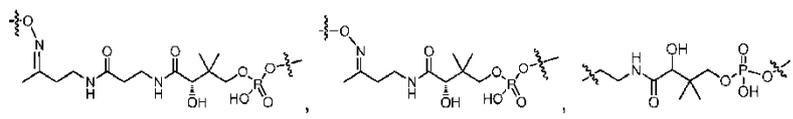




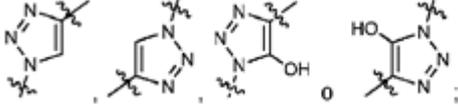
5



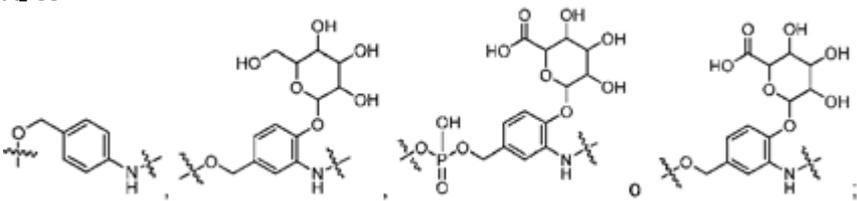
10



X₁ es

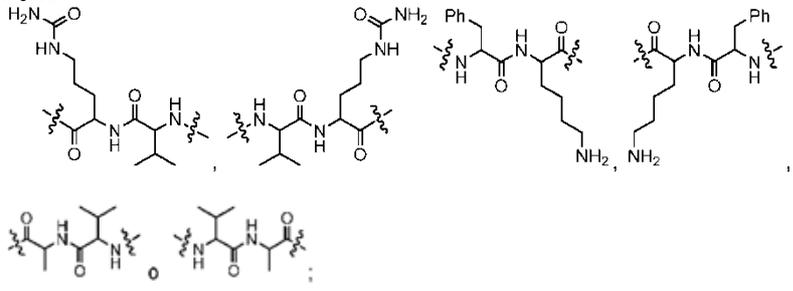


X₂ es



15

X₃ es



- 20 cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;
 cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;
 cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂,
 -CN, -NO₂ y -OH;
 cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH,
 25 bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

R¹² es H, metilo o fenilo;

cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y

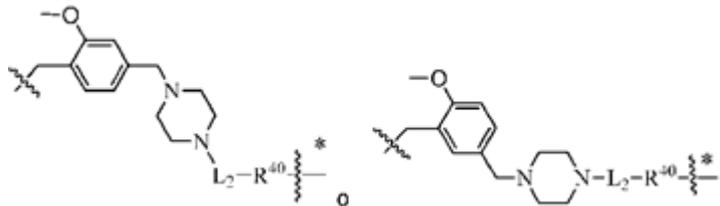
5 y es un número entero de 1 a 16.

Determinados aspectos y ejemplos de los compuestos de la invención se proporcionan en la siguiente lista de realizaciones enumeradas adicionales. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización se pueden combinar con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales de la presente invención.

10

Realización 58. Los conjugados de anticuerpos de Fórmula (II), en donde:

R⁵⁰ es



en que el * indica el punto de unión a Ab;

15 Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

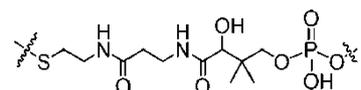
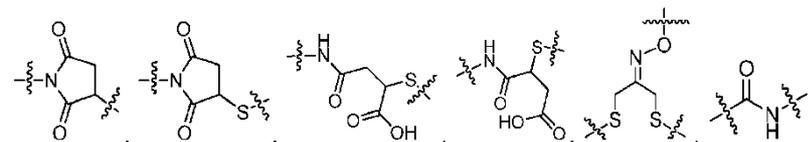
R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

R³ es L₁OH;

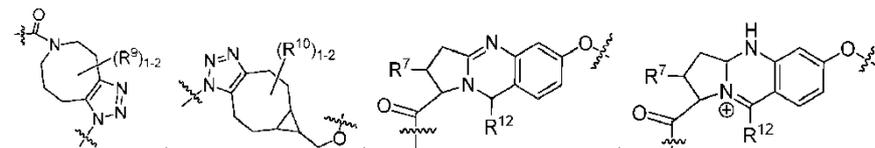
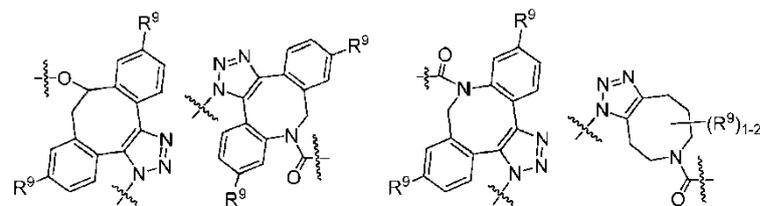
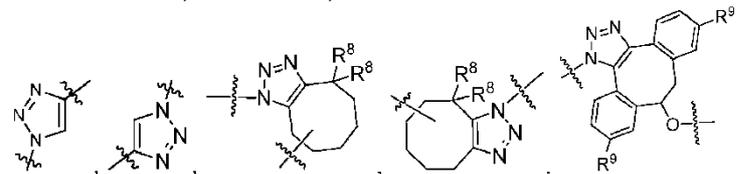
L₁ es -(CH₂)_m;

20 L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,
 -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -
 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

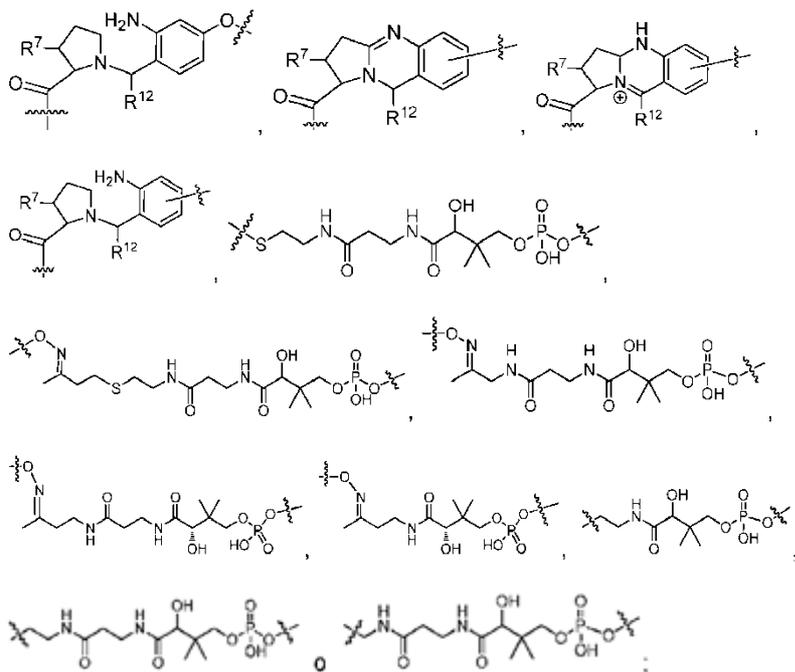
25 R⁴⁰ es



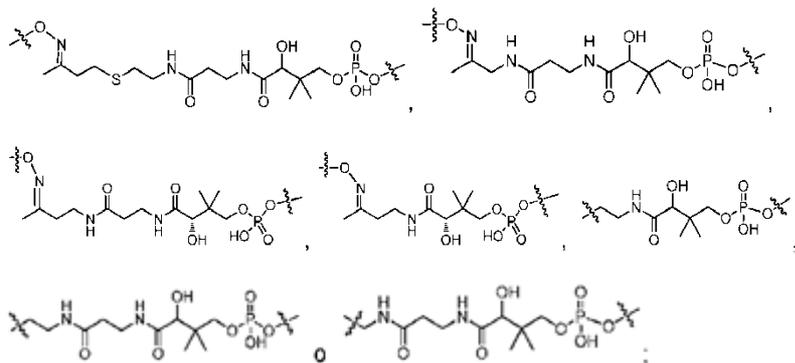
30 -S-, -NHC(=O)CH₂-, -S(=O)₂CH₂CH₂-, -(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-, -NHS(=O)₂CH₂CH₂-, -NHC(=O)CH₂CH₂-,
 CH₂NHCH₂CH₂-, -NHCH₂CH₂-,



35

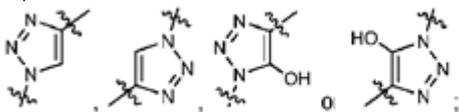


5

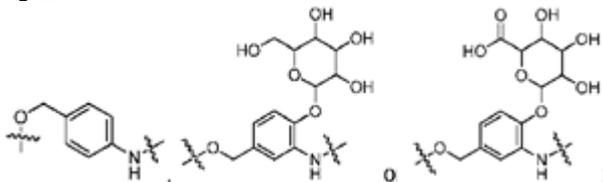


10

X₁ es

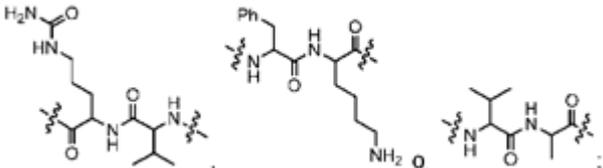


X₂ es



15

X₃ es

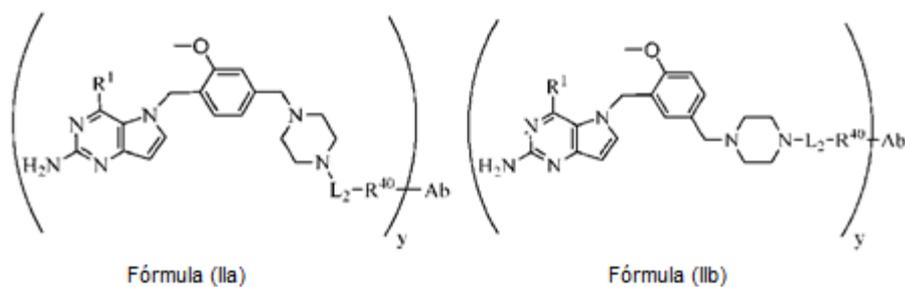


20

25

cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;
 cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;
 cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;
 cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;
 R¹² es H, metilo o fenilo;
 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y es un número entero de 1 a 16.

Realización 59. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II) que tiene la estructura de Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), y sus sales farmacéuticamente aceptables,



en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

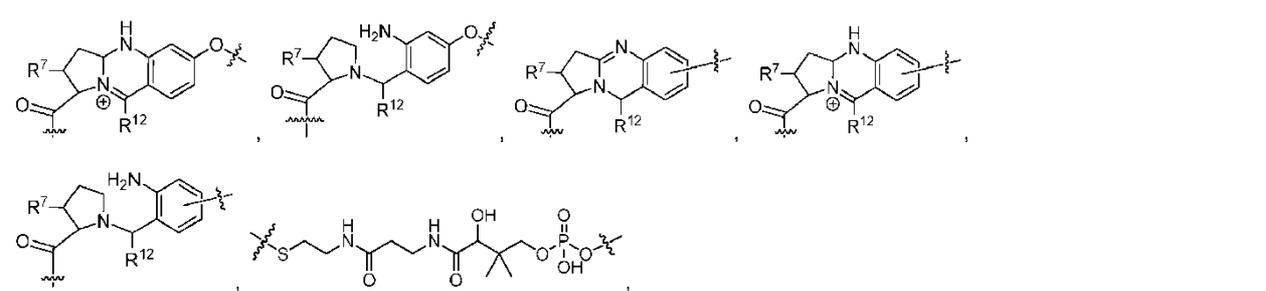
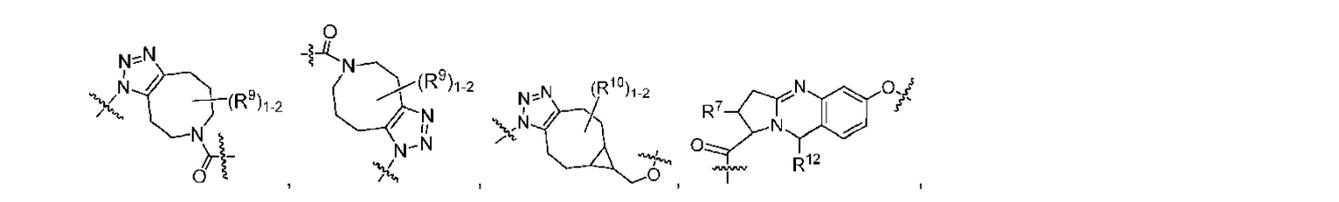
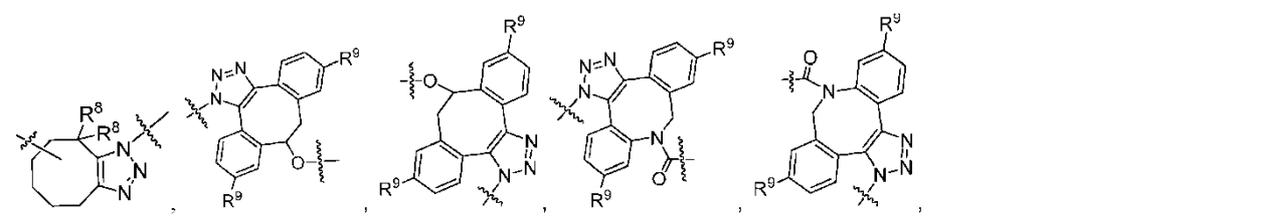
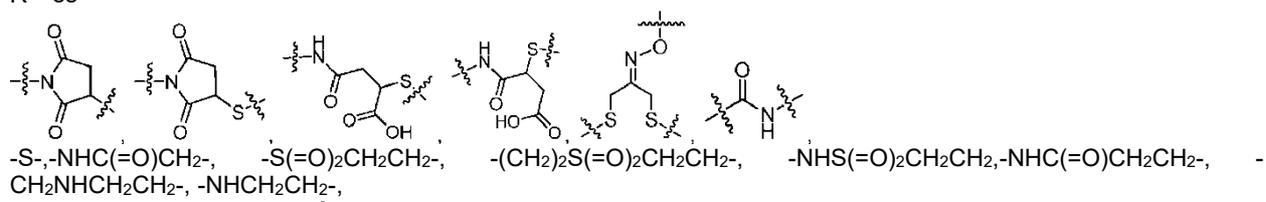
5 R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

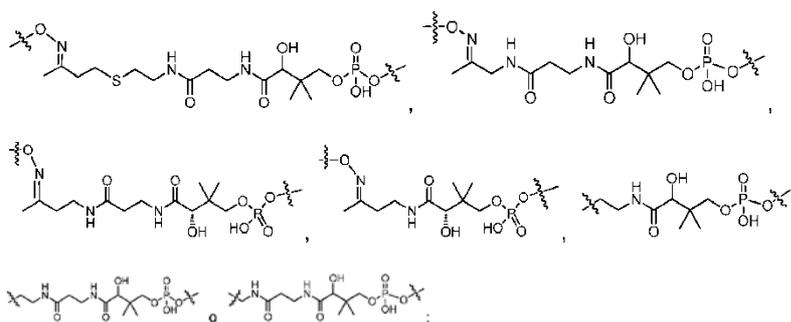
R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m;

10 L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-,
 C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,
 C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-,
 C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-,
 C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, o
 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

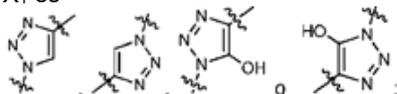
15 R⁴⁰ es



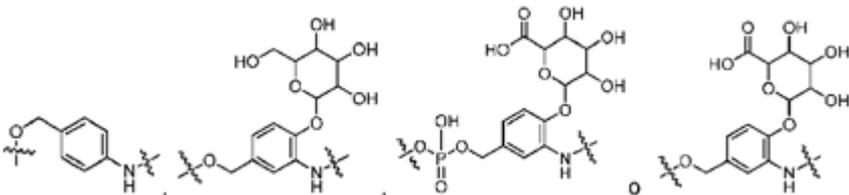


5

X1 es

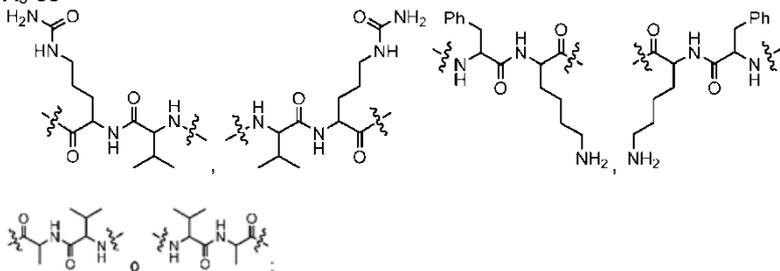


X2 es



10

X3 es



15

cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;

cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;

cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

20

R¹² es H, metilo o fenilo;

cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y es un número entero de 1 a 16.

25

Realización 60. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), y sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

30

R³ es L₁OH;

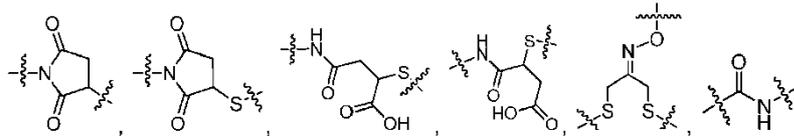
L₁ es -(CH₂)_m;

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -

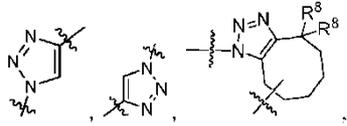
35

C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

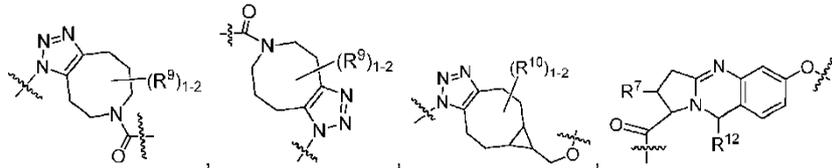
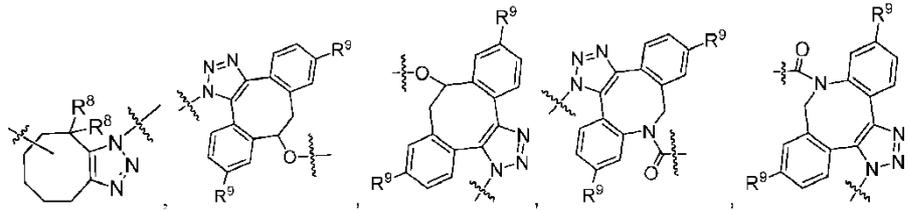
R⁴⁰ es



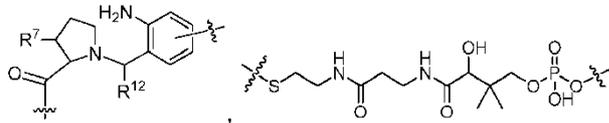
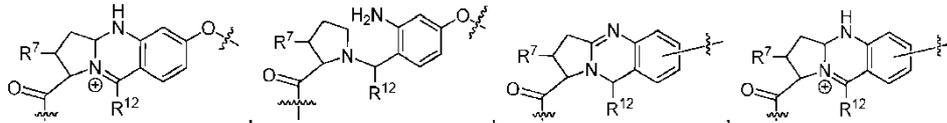
-S-, -NHC(=O)CH₂-, -S(=O)₂CH₂CH₂-, -(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-, -NHS(=O)₂CH₂CH₂-, -NHC(=O)CH₂CH₂-, -CH₂NHCH₂CH₂-, -NHCH₂CH₂-,



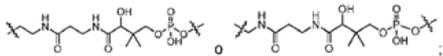
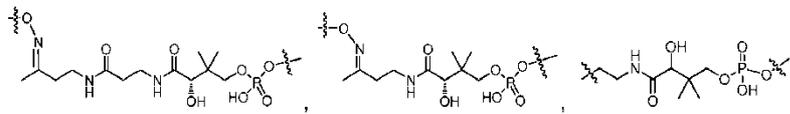
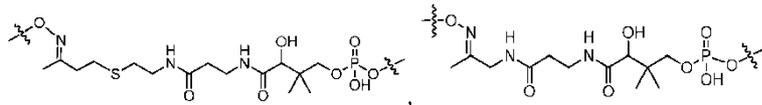
5



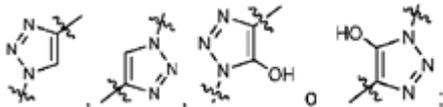
10



15

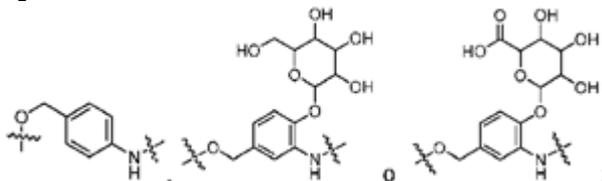


X1 es

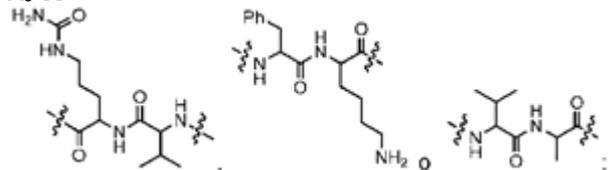


20

X2 es



X₃ es



cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁₋₆;

cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁₋₆, F, Cl y -OH;

5 cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;

cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁₋₆, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁₋₄ sustituido con -C(=O)OH;

R¹² es H, metilo o fenilo;

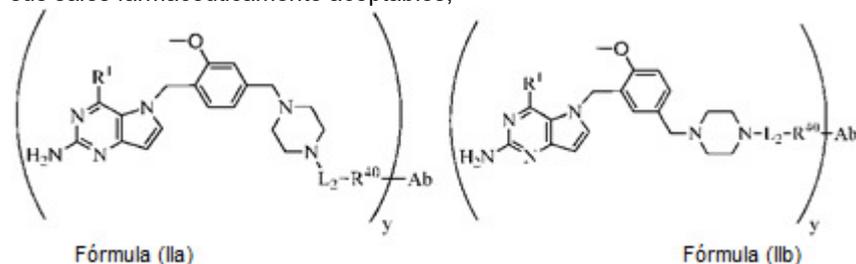
10 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y y es un número entero de 1 a 16.

Realización 61. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II) que tiene la estructura de Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), y sus sales farmacéuticamente aceptables,

15



donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

20 R² es -alquilo C₃₋₆ o -alquilo C₄₋₆;

R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m;

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

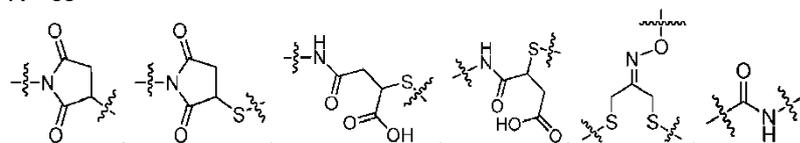
25 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -

C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -

C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -

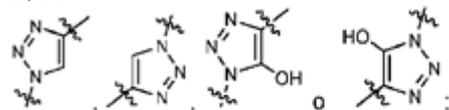
C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

R⁴⁰ es

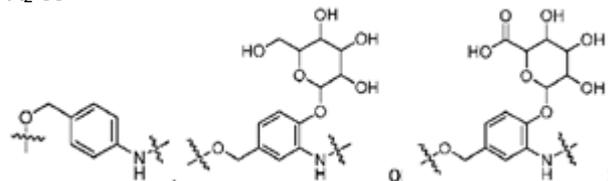


30 o -S-;

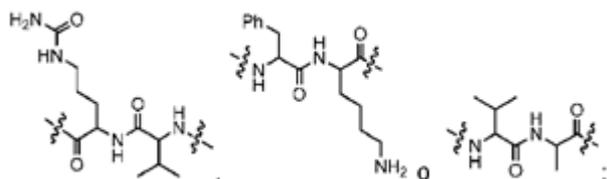
X₁ es



X₂ es



35 X₃ es



cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

5 cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y es un número entero de 1 a 16.

Realización 62. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

10 R² es alquilo C₄-C₆;

R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m-;

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

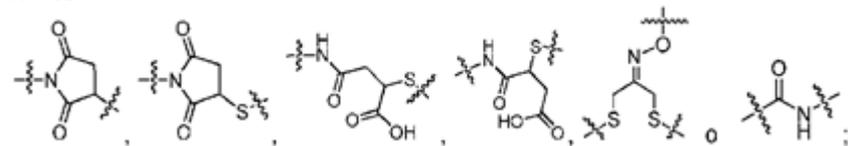
15 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -

C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -

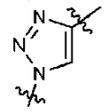
C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -

C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

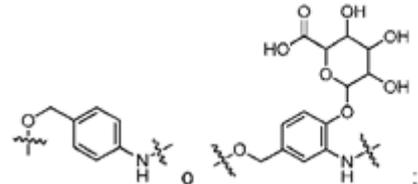
R⁴⁰ es



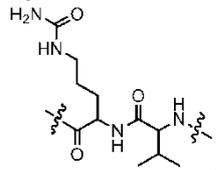
20 X₁ es



X₂ es



X₃ es



25 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y

y es un número entero de 1 a 16.

30 Realización 63. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR²;

R² es alquilo C₄-C₆;

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

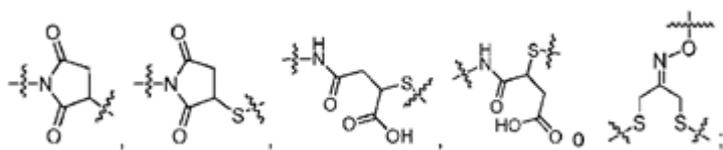
35 -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -

C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -

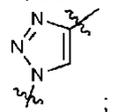
C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -

C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

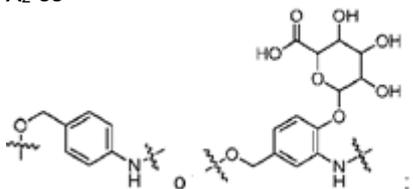
R⁴⁰ es



X₁ es

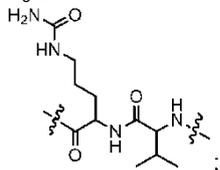


X₂ es



5

X₃ es



cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y es un número entero de 1 a 16.

10

Realización 64. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

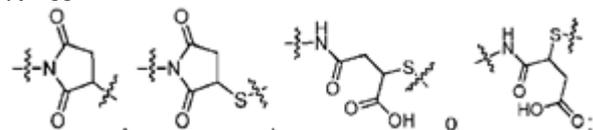
R¹ es -NHR²;

R² es alquilo C₄-C₆;

15

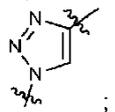
L₂ es $-(CH_2)_n-$, $-((CH_2)_n)_t(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$, $-C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH((CH_2)_nO)_t(CH_2)_nX_1(CH_2)_n-$, $-C(=O)X_2X_3C(=O)((CH_2)_nO)_t(CH_2)_n-$ o $-C(=O)X_2C(=O)(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$;

R⁴⁰ es

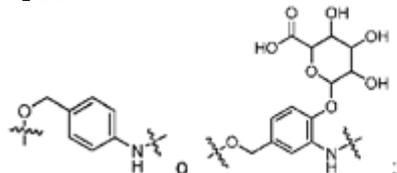


20

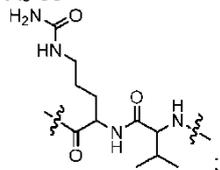
X₁ es



X₂ es



X₃ es



25

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y es un número entero de 1 a 16.

Realización 65. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde:

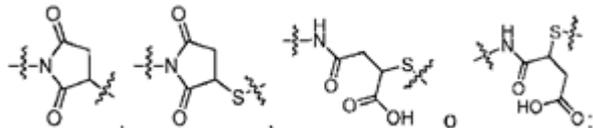
Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR²;

R² es alquilo C₄-C₆;

L₂ es -(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_n;

5 R⁴⁰ es



y

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4, e

y es un número entero de 1 a 16.

10 Realización 66. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

R¹ es -NHR²;

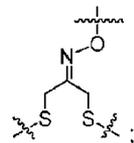
R² es alquilo C₄-C₆;

15 L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-,

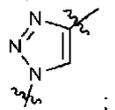
C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, - C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n- o -

C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-;

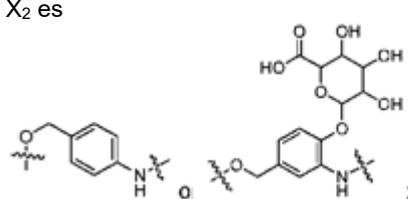
R⁴⁰ es



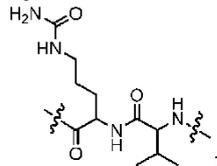
X₁ es



20 X₂ es



X₃ es



25 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, y es un número entero de 1 a 16.

Realización 67. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R¹ es -NHR².

Realización 68. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R¹ es -NHCHR²R³.

30 Realización 69. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R² es -alquilo C₄.

Realización 70. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R² es -alquilo C₅.

Realización 71. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R² es -alquilo C₆.

Realización 72. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R³ es L₁OH;

Realización 73. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: L₁ es -(CH₂)_n-.

35 Realización 74. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: L₁ es -(CH₂CH₂)_n-.

Realización 75. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde:

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, - (CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

-((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n.

Realización 76. El compuesto de Fórmula (I), Fórmula (Ia) o Fórmula (Ib), en donde: L₂ es -C(=O)(CH₂)_n-, -

40 C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, - C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -

C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, - C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -

C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-.

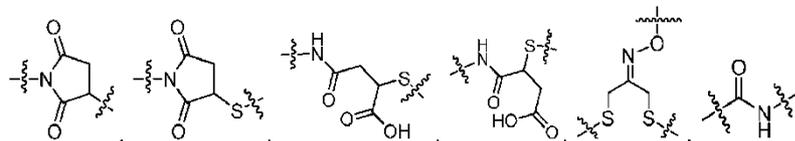
Realización 77. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: L₂ es -(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_n-

Realización 78. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: L₂ es -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_i(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n- o - (CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_i(CH₂)_n-.

5

Realización 79. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde:

R⁴⁰ es

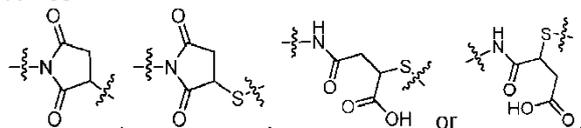


o -S-

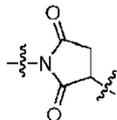
10

Realización 80. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde:

R⁴⁰ es

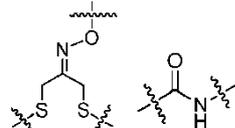


Realización 81. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R⁴⁰ es



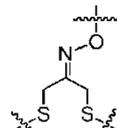
15

Realización 82. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R⁴⁰ es



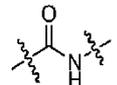
o -S-

Realización 83. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R⁴⁰ es



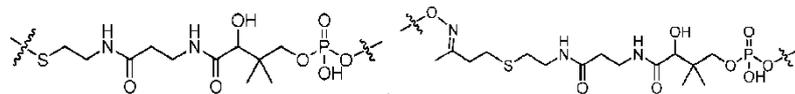
20

Realización 84. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: R⁴⁰ es

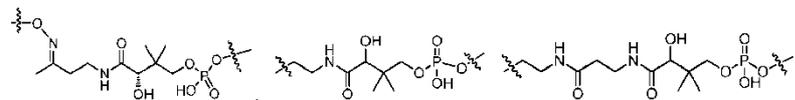
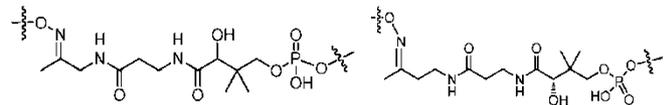


Realización 85. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde:

R⁴⁰ es



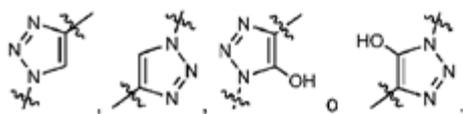
25



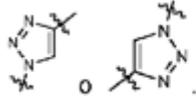
o

30

Realización 86. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₁ es



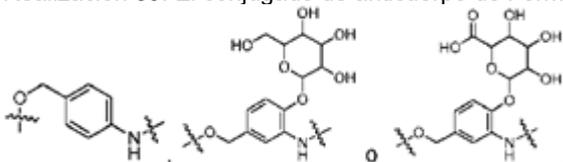
Realización 87. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₁ es



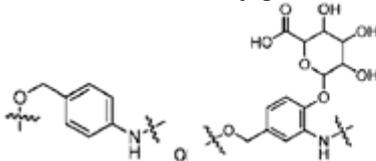
Realización 88. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₁ es



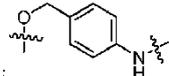
5 Realización 89. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₂ es



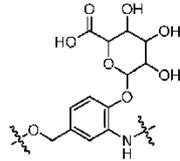
Realización 90. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₂ es



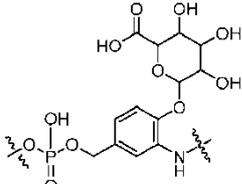
10 Realización 91. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₂ es



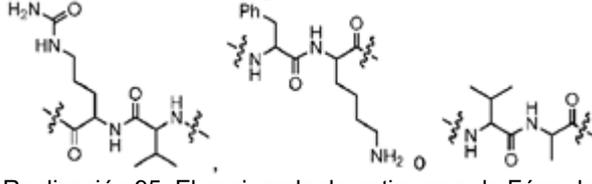
Realización 92. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₂ es



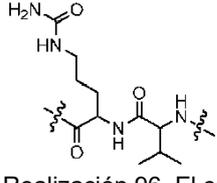
Realización 93. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₂ es



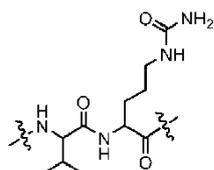
15 Realización 94. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₃ es



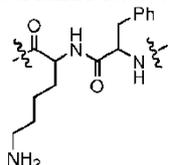
Realización 95. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₃ es



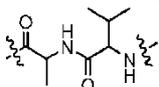
20 Realización 96. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₃ es



Realización 97. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₃ es



Realización 98. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: X₃ es



5 Realización 99. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4.

Realización 100. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde cada uno de los m es 1 o 2.

10 Realización 101. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4.

Realización 102. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde cada uno de los n es 2 o 3.

15 Realización 103. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde: cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

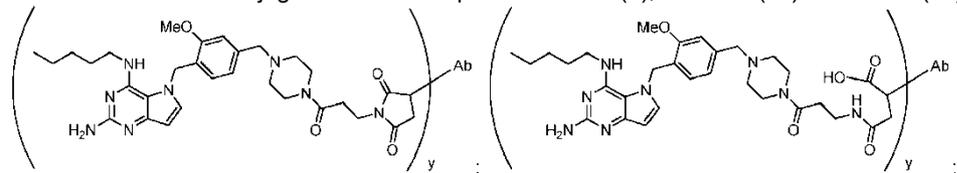
Realización 104. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Realización 105. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde y es un número entero de 1 a 16.

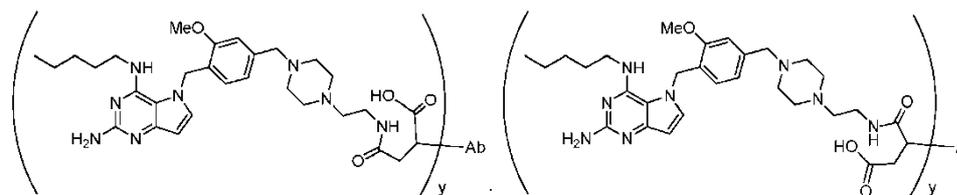
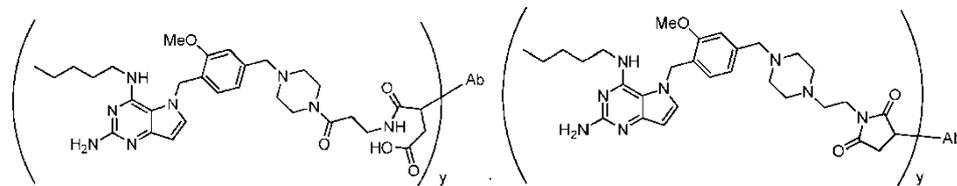
20 Realización 106. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde y es un número entero de 1 a 8.

Realización 107. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), en donde y es un número entero de 1 a 4.

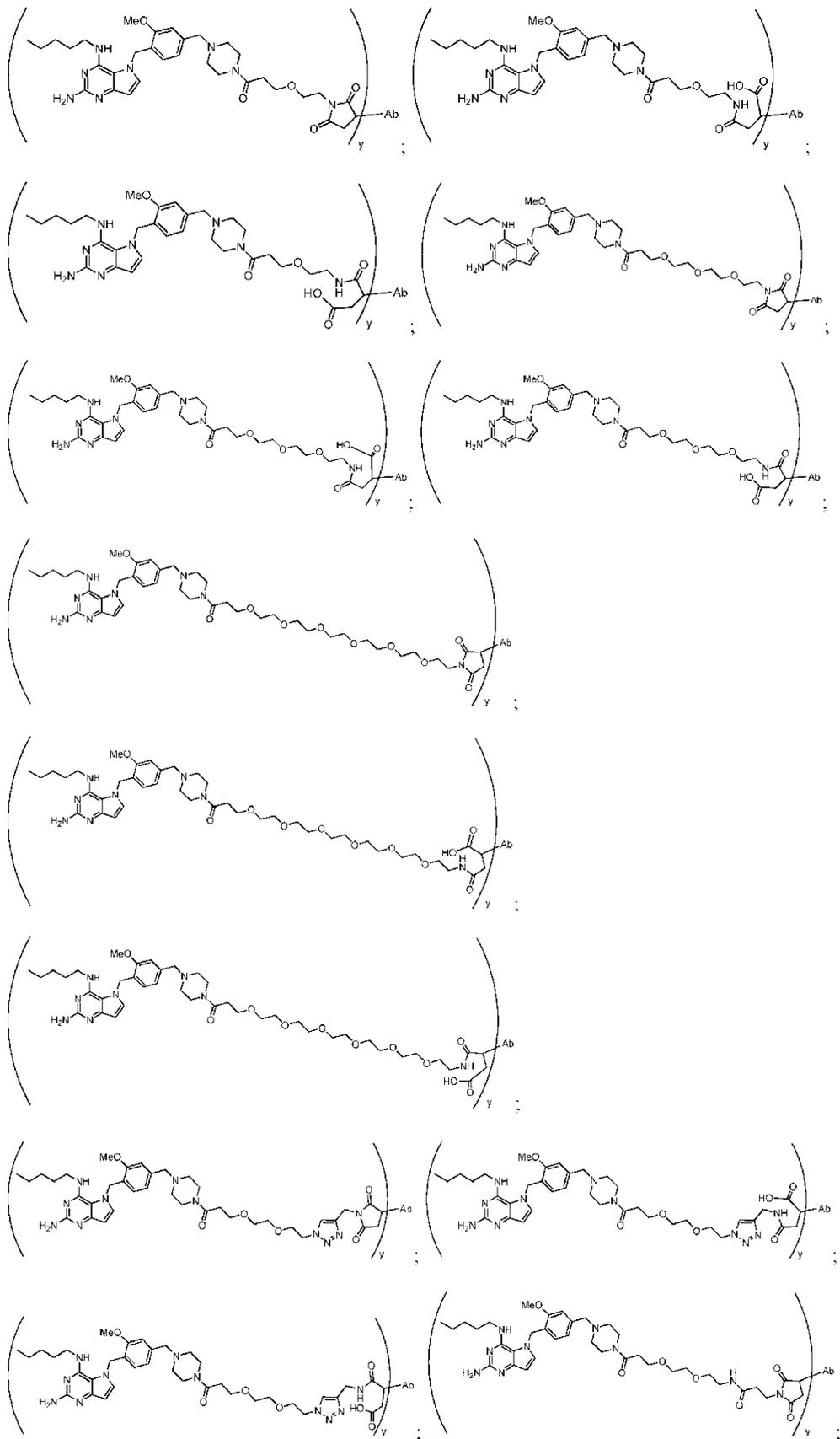
Realización 108. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), seleccionado de:

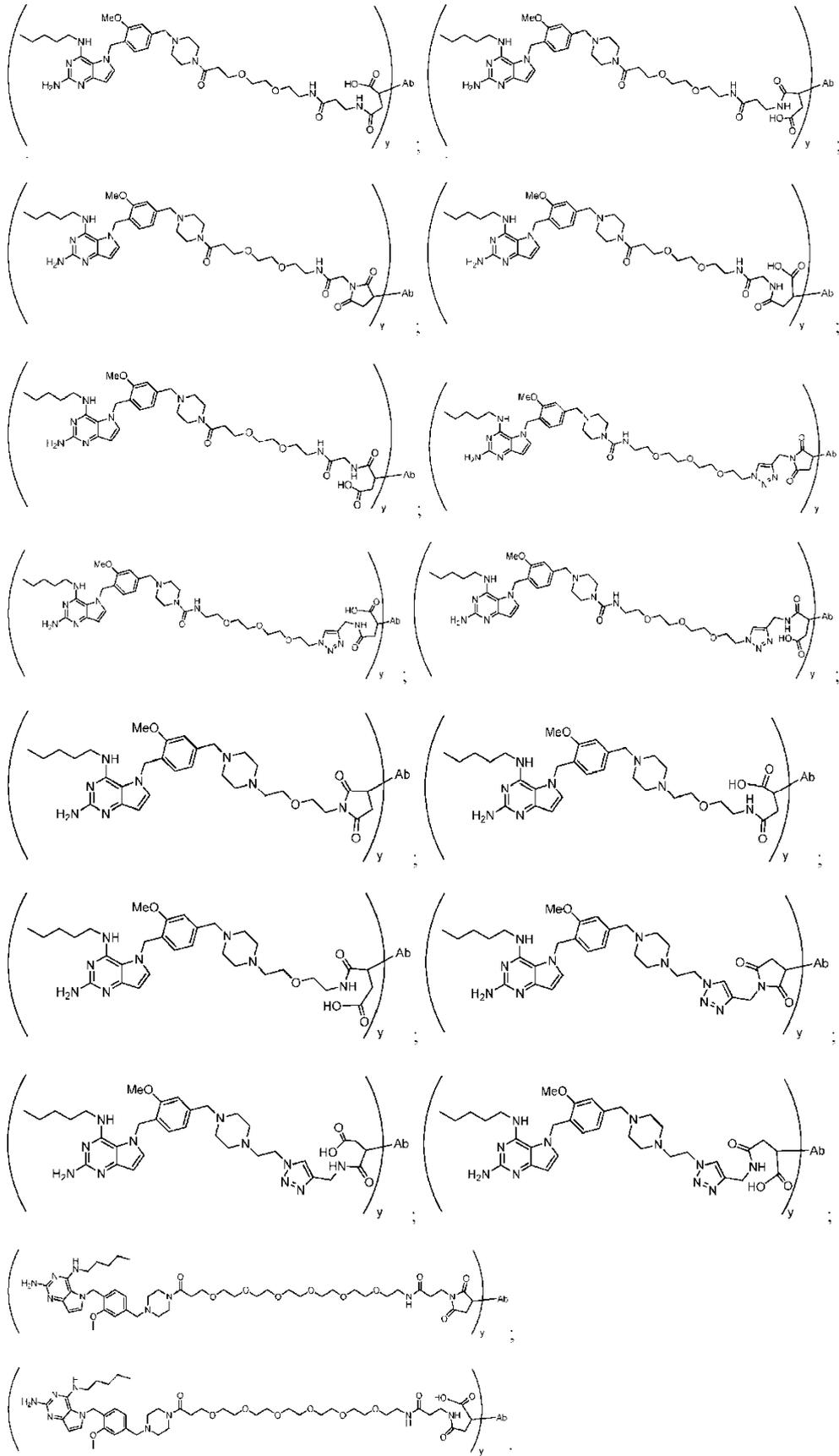


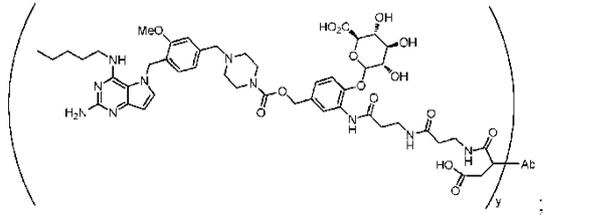
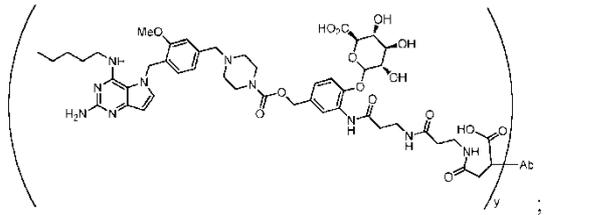
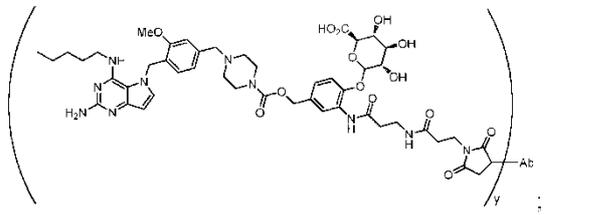
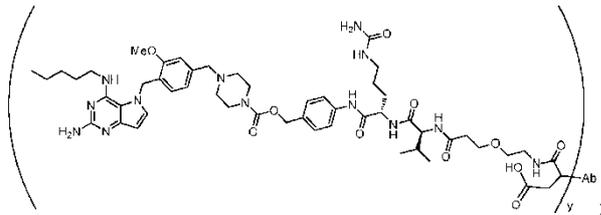
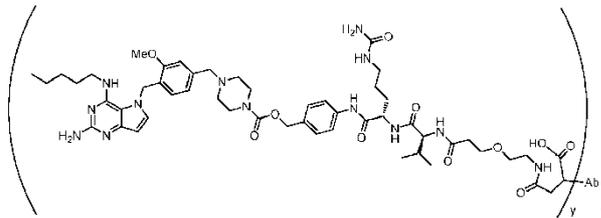
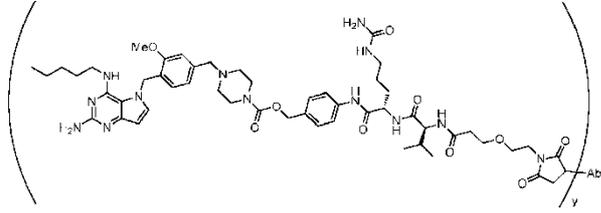
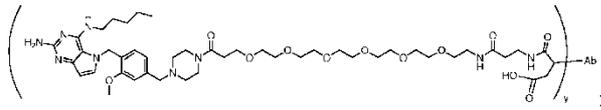
25

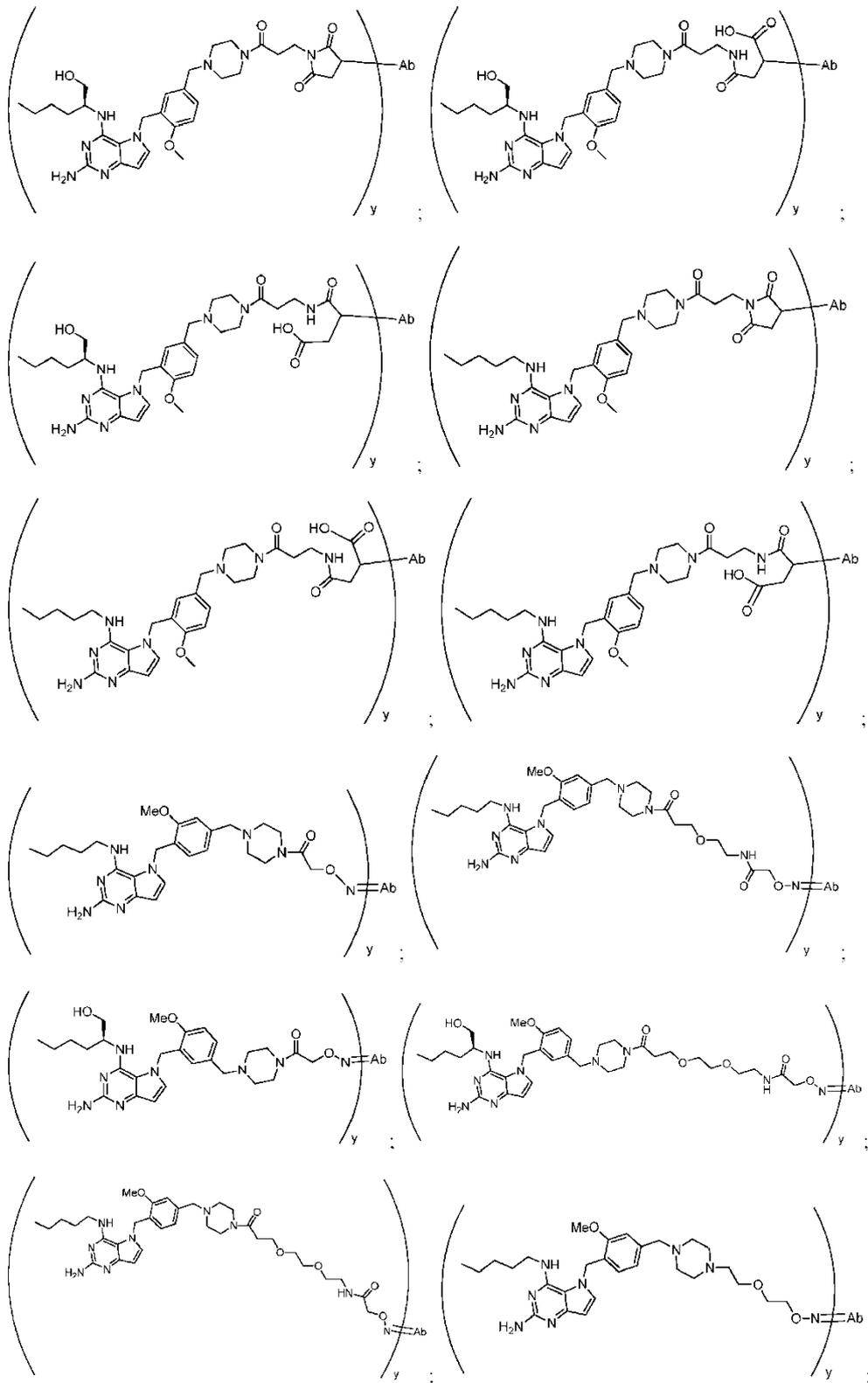


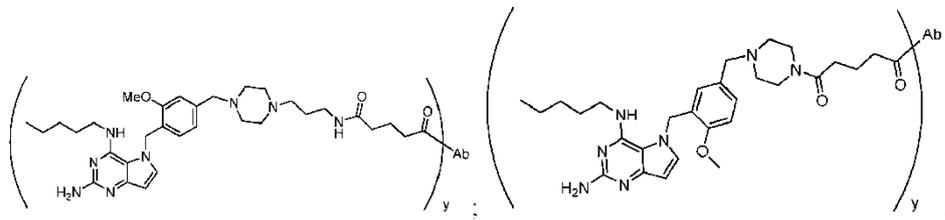
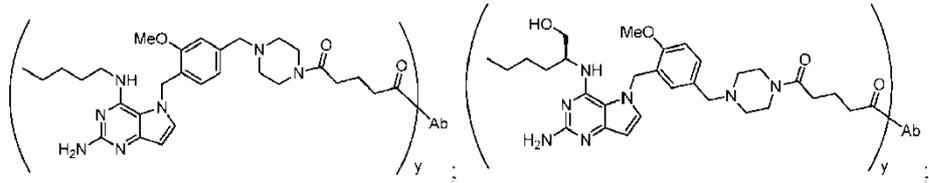
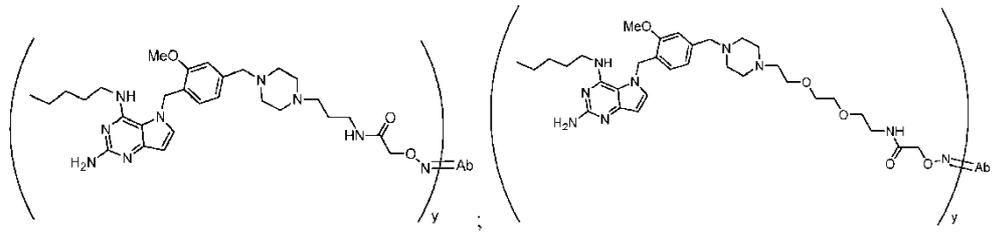
30



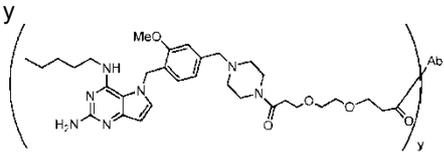
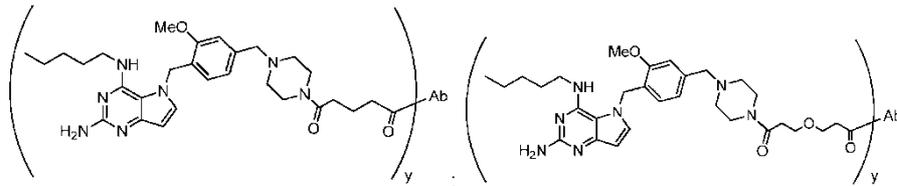








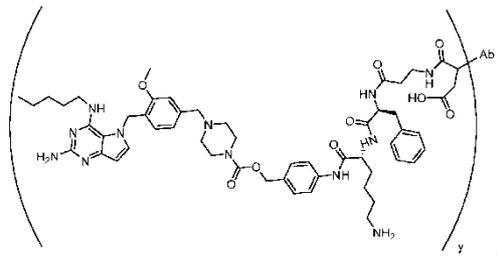
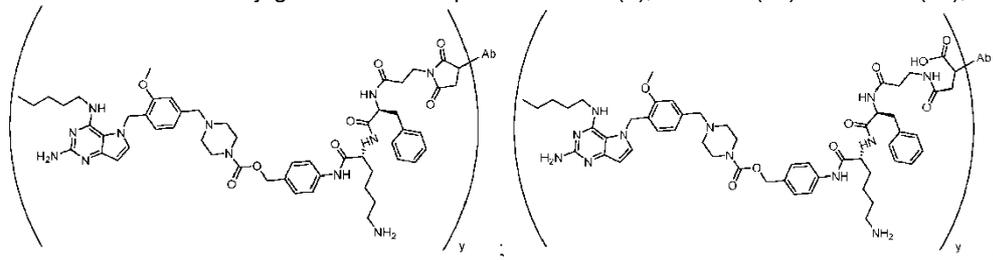
5



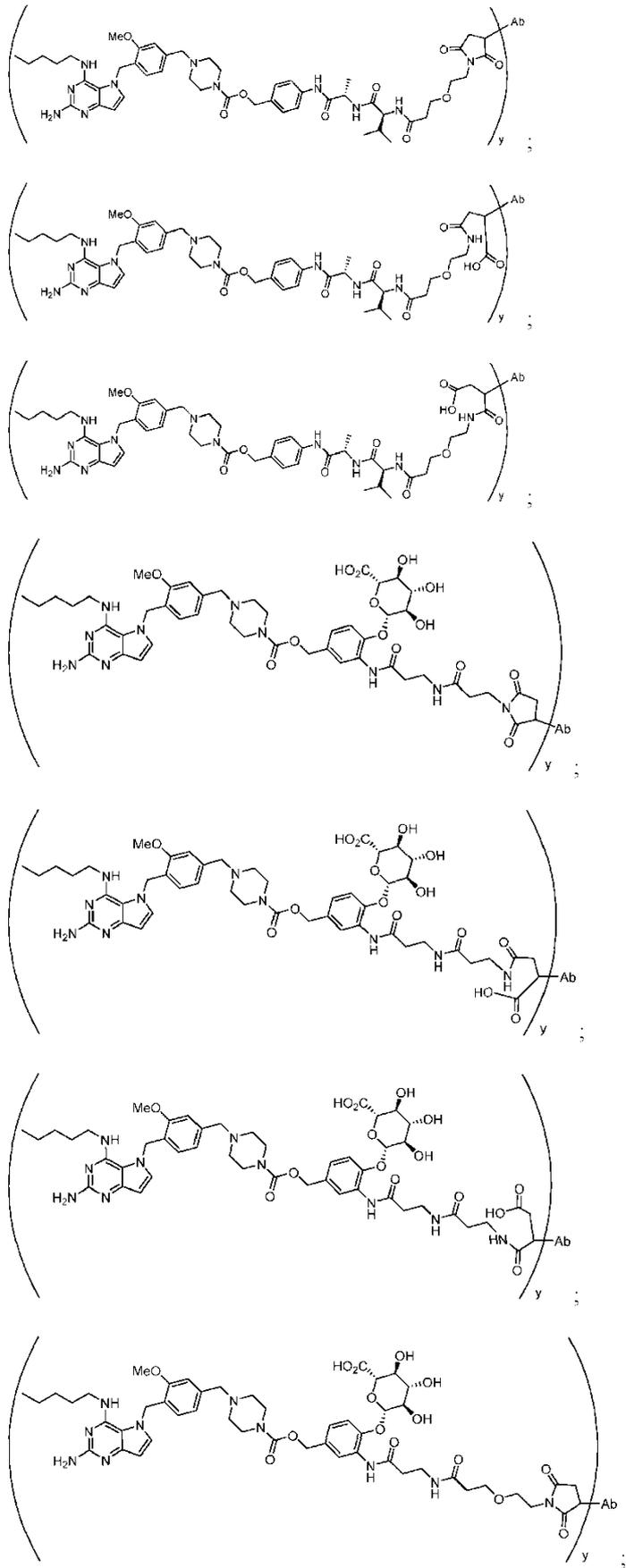
y

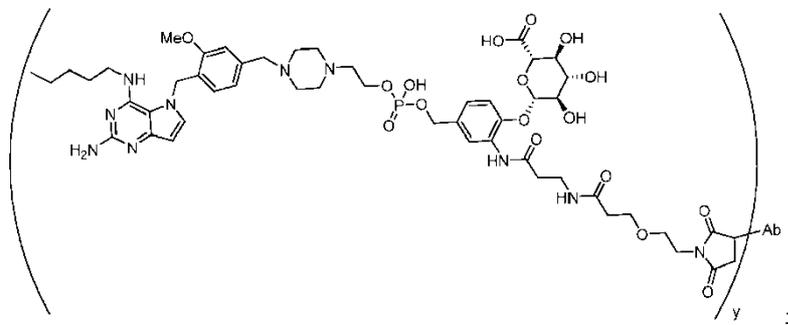
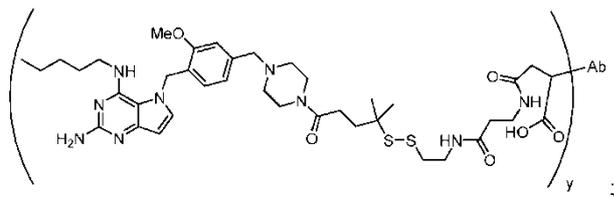
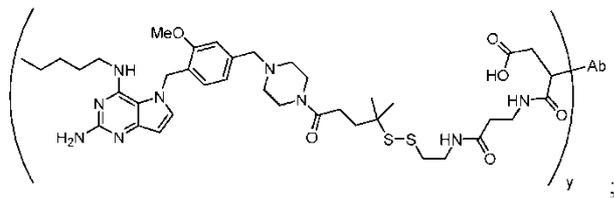
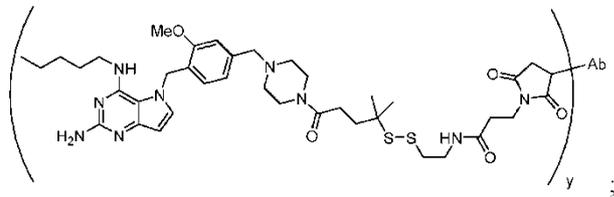
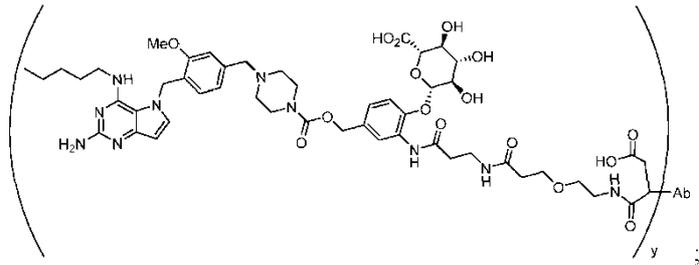
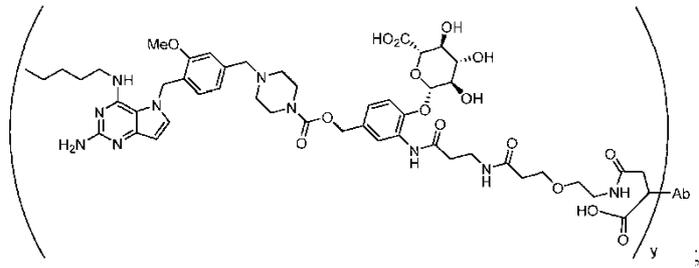
10 en donde y es un número entero de 1 a 4 y Ab es un anticuerpo anti-HER2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

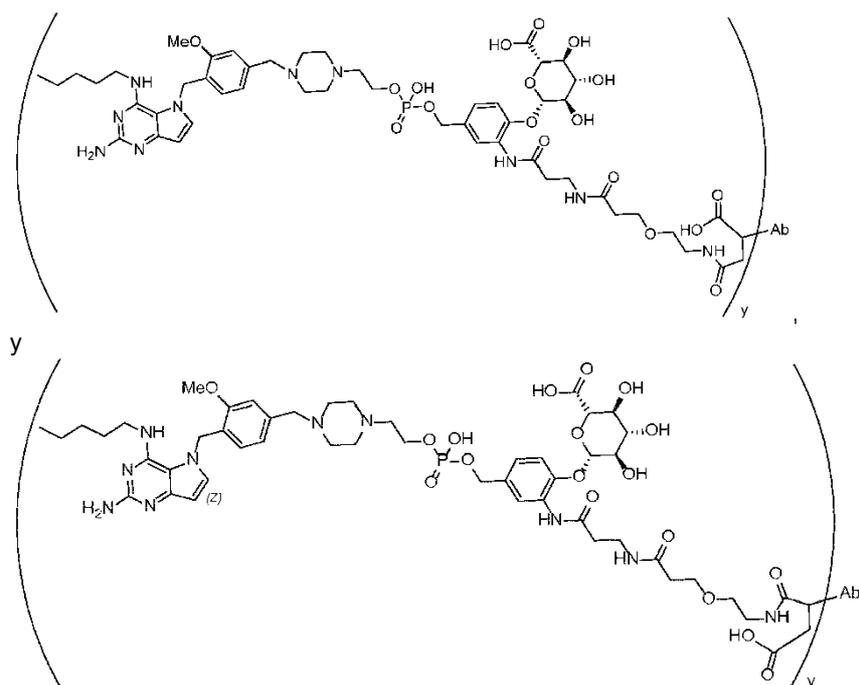
Realización 109. El conjugado de anticuerpo de Fórmula (II), Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb), seleccionado de:



15







- 5 También se proporcionan protocolos para algunos aspectos de la metodología analítica para evaluar los conjugados de anticuerpos de la invención. Una metodología analítica de este tipo y los resultados pueden demostrar que los conjugados tienen propiedades favorables, por ejemplo, propiedades que los harían más fáciles de fabricar, más fáciles de administrar a los pacientes, más eficaces y/o potencialmente más seguros para los pacientes. Un ejemplo es la determinación del tamaño molecular mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en la que la cantidad de especies de anticuerpos deseadas en una muestra se determina en relación con la cantidad de contaminantes de alto peso molecular (p. ej., dímero, multímero o anticuerpo agregado) o contaminantes de bajo peso molecular (p. ej., fragmentos de anticuerpos, productos de degradación o cadenas de anticuerpos individuales) presentes en la muestra. En general, es deseable tener mayores cantidades de monómero y menores cantidades de, por ejemplo, anticuerpos agregados debido al impacto de, por ejemplo, los agregados en otras propiedades de la muestra de anticuerpos, tal como la tasa de aclaramiento, la inmunogenicidad y la toxicidad. Un ejemplo adicional es la determinación de la hidrofobicidad por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), en donde la hidrofobicidad de una muestra se evalúa en relación con un conjunto de anticuerpos estándares de propiedades conocidas. En general, es deseable tener una baja hidrofobicidad debido al impacto de la hidrofobicidad en otras propiedades de la muestra de anticuerpos, tales como agregación, agregación a lo largo del tiempo, adherencia a las superficies, hepatotoxicidad, tasas de aclaramiento y exposición farmacocinética. Véase See Damle, N.K., Nat Biotechnol. 2008; 26(8):884-885; Singh, S.K., Pharm Res. 2015; 32(11):3541-71. Cuando se mide por cromatografía de interacción hidrofóbica, las puntuaciones más altas del índice de hidrofobicidad (es decir, elución más rápida de la columna HIC) reflejan una hidrofobicidad más baja de los conjugados. Como se muestra en el Ejemplo 70 y la Tabla 3, la mayoría de los conjugados de anticuerpos testados mostraron un índice de hidrofobicidad superior a 0,8. En algunas realizaciones, se proporcionan conjugados de anticuerpos que tienen un índice de hidrofobicidad de 0,8 o mayor, según se determina por cromatografía de interacción hidrofóbica.

Anticuerpo anti-HER2

- 30 Conjugados de anticuerpos proporcionados en la presente incluyen un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo (p. ej., fragmento de unión a antígeno) que se une específicamente a HER2 humano (anticuerpo anti-HER2). La sobre-expresión de HER2 se observa en muchos tipos de cánceres, tales como cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, osteosarcoma, neuroblastoma o cáncer de cabeza y cuello. Conjugados de anticuerpos que comprenden un anticuerpo anti-HER2 pueden fijar específicamente como objetivo cánceres o tumores HER2-positivos.

- En algunas realizaciones, los conjugados de anticuerpos proporcionados en la presente incluyen un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo del mismo que se une específicamente a HER2 humano, p. ej., un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humano o humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une específicamente a HER2 humano puede seleccionarse de trastuzumab, pertuzumab, margetuximab o HT-19, o un fragmento de anticuerpo del mismo o un mutante de cisteína específico del sitio.

Trastuzumab (nombre comercial Herceptin o Herclon) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a la porción yuxtamembrana del dominio extracelular del receptor de HER2 (Hudis CA, N Engl J Med. 2007; 357(1):39-51). Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de trastuzumab se describieron en la Patente de EE.UU. N° 5.821.337. Trastuzumab interactúa con tres regiones de bucle formadas por los residuos 557-561, 570-573 y 593-603 de HER2 humano (Cho et al., Nature 421: 756-760, 2003). Trastuzumab interfiere con la señalización de HER2 posiblemente mediante la prevención de la dimerización del receptor de HER2, la facilitación de la destrucción endocitótica del receptor de HER2, la inhibición del desprendimiento del dominio extracelular (Hudis CA, N Engl J Med. 2007; 357(1):39-51). Otro mecanismo de acción importante de un anticuerpo anti-HER2 es la mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En la ADCC, el anticuerpo anti-HER2 se une a células tumorales y luego recluta células inmunes, tales como los macrófagos, a través de las interacciones del receptor Fcγ (FcγR). Trastuzumab tiene una región Fc de IgG humana conservada y es capaz de reclutar células efectoras inmunes que son responsables de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Hudis CA, N Engl J Med. 2007; 357(1):39-51). Trastuzumab obtuvo la aprobación de la FDA de EE. UU. en septiembre de 1998 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico en pacientes cuyos tumores sobre-expresan HER2 y que recibieron uno o más regímenes de quimioterapia para su enfermedad metastásica.

Pertuzumab (también denominado 2C4, Omnitarg, Perjeta) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al dominio extracelular del receptor de HER2 e inhibe la dimerización de HER2 con otros receptores de HER. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de pertuzumab se describieron en la Patente de EE.UU. N° 7.560.111. Pertuzumab interactúa principalmente con los residuos dentro de la región 245-333 de HER2 humano, particularmente los residuos His 245, Val 286, Ser 288, Leu 295, His 296 o Lys 311 (Franklin et al., Cancer Cell 5: 317-328, 2004). Se demostró que pertuzumab es más efectivo que trastuzumab en la interrupción de la formación de los complejos HER1-HER2 y HER3-HER2 en líneas celulares de cáncer de mama y próstata (Agus et al., J Clin Oncol. 2005; 23(11):2534-43. Epub, 7 de febrero de 2005). Pertuzumab no requiere citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos para su eficacia, porque no se requiere una región Fc intacta para su actividad (Agus et al., J Clin Oncol. 2005; 23(11):2534-43. Epub, 7 de febrero de 2005). Pertuzumab recibió la aprobación de la FDA de EE. UU. para su uso en combinación con trastuzumab y docetaxel para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico HER2-positivo que no recibieron terapia anti-HER2 o quimioterapia para la enfermedad metastásica en junio de 2012.

Margetuximab (también denominado MGAH22) es otro anticuerpo monoclonal anti-HER2 (Véase <http://www.macrogenics.com/products-margetuximab.html>). La región Fc de margetuximab se optimizó de modo que haya aumentado la unión a los FcγR activadores, pero disminuyó la unión a los FcγR inhibitorios en las células efectoras inmunes. Margetuximab se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama avanzado recidivante o refractario cuyos tumores expresan HER2 en el nivel 2+ por inmunohistoquímica y carecen de evidencia de amplificación del gen HER2 por FISH.

HT-19 es otro anticuerpo monoclonal anti-HER2 que se une a un epítipo en HER2 humano distinto del epítipo de trastuzumab o pertuzumab y se demostró que inhibe la señalización de HER2 de manera equiparable a trastuzumab y potencia la degradación de HER2 en combinación con trastuzumab y pertuzumab (Bergstrom D.A. et al., Cancer Res.2015; 75:LB-231).

Otros anticuerpos monoclonales anti-HER2 adecuados incluyen los anticuerpos anti-HER2 descritos en las patentes de EE.UU. N°.: 9.096.877; 9.017.671; 8.975.382; 8.974.785; 8.968.730; 8.937.159; 8.840.896; 8.802.093; 8.753.829; 8.741.586; 8.722.362; 8.697.071; 8.652.474; 8.652.466; 8.609.095; 8.512.967; 8.349.585; 8.241.630; 8.217.147; 8.192.737; 7.879.325; 7.850.966; 7.560.111; 7.435.797; 7.306.801; 6.399.063; 6.387.371; 6.165.464; 5,772,997; 5,770,195; 5.725.856; 5.720.954; 5.677.171.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de anticuerpo (*p. ej.*, un fragmento de unión a antígeno) comprende un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VH descrito en la Tabla 1. Otros anticuerpos anti-HER2 adecuados o fragmentos de anticuerpo (*p. ej.*, fragmentos de unión a antígeno) pueden incluir aminoácidos que han sido mutados, pero que tienen al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad en el dominio VH con las regiones VH representadas en las secuencias descritas en la Tabla 1. La presente divulgación en ciertas realizaciones también proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, fragmentos de unión a antígeno) que específicamente se unen a HER2, en el que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, fragmentos de unión a antígeno) comprenden una VH CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las VH CDR enumeradas en la Tabla 1. En realizaciones particulares, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a HER2, que comprende (o alternativamente, consiste en) una, dos, tres, cuatro, cinco o más VH CDR que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VH CDR enumeradas en la Tabla 1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-HER2 o fragmento de anticuerpo (*p. ej.*, un fragmento de unión a antígeno) comprende un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquier dominio VL descrito en la Tabla 1. Otros anticuerpos anti-HER2 o fragmentos de anticuerpo (*p. ej.*, fragmentos de unión a antígeno) adecuados pueden incluir aminoácidos que han sido mutados, pero que tienen al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad en el dominio VL con las regiones VL representadas en las secuencias descritas en la Tabla 1. La presente

5 divulgación también proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, fragmentos de unión a antígeno) que específicamente se unen a HER2, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, fragmentos de unión a antígeno) comprenden una VL CDR que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las VL CDR enumeradas en la Tabla 1. En particular, la invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a HER2, que comprende (o alternativamente, consiste en) una, dos, tres o más VL CDR que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las VL CDR enumeradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de anticuerpos monoclonales anti-HER2 ilustrativas

mAb1 anti-HER2		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	DTYIH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	RIYPTNGYTRYADSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GFNIKDT
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Chothia)	YPTNGY
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 6	HCDR1 (Combinado)	GFNIKDTYIH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinado)	RIYPTNGYTRYADSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinado)	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWRQAPGKGLEWARIYPTNGYTRYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 8	ADN VH	GAGGTTCACTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCT GGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCCCT GTGCAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCT ATATACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAG GGCCTGGAATGGGTTGCAAGGATTTATCCTAC GAATGGTTATACTAGATATGCCGATAGCGTCAA GGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCA AAAACACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTTCT AGATGGGGAGGGGACGGCTTCTATGCTATGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCG
SEQ ID NO: 9	Cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWRQAPGKGLEWARIYPTNGYTRYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA

mAb1 anti-HER2		
		<p>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHN HYTQKSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO: 10	ADN Cadena Pesada	<p>GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCT GGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCTCT GTGCAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCT ATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAG GGCCTGGAATGGGTTGCAAGGATTTATCCTAC GAATGGTTATACTAGATATGCCGATAGCGTCAA GGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCA AAAACACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTTCT AGATGGGGAGGGGACGGCTTCTATGCTATGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCGGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTGTGTTT CCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGG CGGAACTGCTGCCCTGGGTTGCCTGGTGAAGG ACTACTTCCCCTGTCCCCTGACAGTGTCTCTGG AACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACAC CTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCCTGT ACAGCCTGAGCAGCGTGGTGCAGTGCCTCC AGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGA CCCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCC CCCCAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCA GGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGA CGTGTCACAGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAA CAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCG TGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAA TACAAGTCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCC AGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGCAAGGCCA AGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACAC CCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCCTGTGATATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAG ACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGACGGCA GCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCA CTGCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCC</p>
		GGCAAG
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	RASQDVNTAVA

ES 2 798 649 T3

mAb1 anti-HER2		
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	SASFL YS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	SQDVNTA
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	SAS
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	HYTTPP
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Combinado)	RASQDVNTAVA
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Combinado)	SASFL YS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Combinado)	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 18	ADN VL	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCT GTCCGCCTCTGTGGCGATAGGGTCACCATCA CCTGCCGTGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCT GTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGC TCCGAACTACTGATTTACTCGGCATCCTTCCT CTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATC CAGATCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATCA GCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTAT TACTGTCAGCAACATTATACTACTCCTCCCACG TTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA
SEQ ID NO: 19	Cadena Ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 20	ADN Cadena Ligera	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCT GTCCGCCTCTGTGGCGATAGGGTCACCATCA CCTGCCGTGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCT GTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGC TCCGAACTACTGATTTACTCGGCATCCTTCCT CTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATC CAGATCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATCA GCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTAT TACTGTCAGCAACATTATACTACTCCTCCCACG TTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACG TACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGTGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCT ACCCCGGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGT GGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACT CCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA

ES 2 798 649 T3

mAb1 anti-HER2		
		GTGC
mAb2 anti-HER2		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	DTYIH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	RIYPTNGYTRYADSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GFNIKDT
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Chothia)	YPTNGY
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 6	HCDR1 (Combinado)	GFNIKDTYIH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinado)	RIYPTNGYTRYADSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinado)	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 8	ADN VH	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCT GGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCT GTGCAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCT ATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAG GGCCTGGAATGGGTTGCAAGGATTTATCCTAC GAATGGTTATACTAGATATGCCGATAGCGTCAA GGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCA AAAACACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTTCT AGATGGGGAGGGGACGGCTTCTATGCTATGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCG
SEQ ID NO: 21	Cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK
SEQ ID NO: 22	ADN Cadena Pesada	

ES 2 798 649 T3

mAb1 anti-HER2		
		<p>GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCT GGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCCCT GTGCAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCT ATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCGGGTAAG GGCCTGGAATGGGTTGCAAGGATTTATCCTAC GAATGGTTATACTAGATATGCCGATAGCGTCAA GGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCA AAAACACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTTCT AGATGGGGAGGGGACGGCTTCTATGCTATGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCT</p>
		<p>CCTCGGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCC CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA GGACTACTTCCCTTGTCCTCGTGACCGTGCTCCT GGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGA CAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCAGCCC CAGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTG TTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCA GTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGCCGTGC TGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGC CCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCA AGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCTGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAAC TACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGA CGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTG TCCCCCGGCAAG</p>
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	RASQDVNTAVA
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	SASFL YS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	SQDVNTA
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	SAS
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	HYTTPP
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Combinado)	RASQDVNTAVA

ES 2 798 649 T3

mAb1 anti-HER2		
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Combinado)	SASFL YS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Combinado)	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTLSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 18	ADN VL	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCT GTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCA CCTGCCGTGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCT GTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGC
		TCCGAAACTACTGATTTACTCGGCATCCTTCCT CTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATC CAGATCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATCA GCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTAT TACTGTCAGCAACATTATACTACTCCTCCCACG TTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAA
SEQ ID NO: 19	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTLSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 34	ADN Cadena Ligera	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCT GTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCA CCTGCCGTGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCT GTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGC TCCGAAACTACTGATTTACTCGGCATCCTTCCT CTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATC CAGATCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATCA GCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTAT TACTGTCAGCAACATTATACTACTCCTCCCACG TTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACG AACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCT ACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGT GGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACT CCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC

mAb3 anti-HER2		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	DTYIH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	RIYPTNGYTRYADSVKG

ES 2 798 649 T3

mAb3 anti-HER2		
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GFNIKDT
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Chothia)	YPTNGY
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 6	HCDR1 (Combinado)	GFNIKDTYIH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinado)	RIYPTNGYTRYADSVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinado)	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 8	ADN VH	GAGGTTCACTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCT GGTGCAGCCAGGGGCTCACTCCGTTTGTCCCT GTGCAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCT ATATACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAG GGCCTGGAATGGGTGCAAGGATTTATCCTAC GAATGGTTATACTAGATATGCCGATAGCGTCAA
		GGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCA AAAACACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTTCT AGATGGGGAGGGGACGGCTTCTATGCTATGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCG
SEQ ID NO: 23	Cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 24	ADN Cadena Pesada	

ES 2 798 649 T3

mAb3 anti-HER2		
		<p>GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGTGGCCT GGTGCAGCCAGGGGGCTCACTCCGTTTGTCT GTGCAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCT ATATACTGGGTGCGTCAGGCCCGGGTAAG GGCCTGGAATGGGTTGCAAGGATTTATCCTAC GAATGGTTATACTAGATATGCCGATAGCGTCAA GGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCA AAAACACAGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTG CGTGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTTCT AGATGGGGAGGGGACGGCTTCTATGCTATGGA CTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGTCACCGTCT CCTCGGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTC CCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCG GCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTCT GGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGC CTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGA CAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCC CAGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTCTG TTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGAT CAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCA GTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGC TGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGC</p>
		<p>CCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCA AGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAAC TACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGA CGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCG TGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTACAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTG TCCCCCGGCAAG</p>
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	RASQDVNTAVA
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	SASFL YS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	SQDVNTA
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	SAS
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	HYTTPP
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Combinado)	RASQDVNTAVA

ES 2 798 649 T3

mAb3 anti-HER2		
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Combinado)	SASFL YS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Combinado)	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 17	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 18	ADN VL	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCT GTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCA CCTGCCGTGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCT GTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGC TCCGAACTACTGATTTACTCGGCATCCTTCCT CTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATC CAGATCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATCA GCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTAT TACTGTCAGCAACATTATACTACTCCTCCCACG TTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA
SEQ ID NO: 19	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSG TDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFRGEC
SEQ ID NO: 34	ADN Cadena Ligera	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCT GTCCGCCTCTGTGGGCGATAGGGTCACCATCA CCTGCCGTGCCAGTCAGGATGTGAATACTGCT GTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGC TCCGAACTACTGATTTACTCGGCATCCTTCCT CTACTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCTCTGGATC CAGATCTGGGACGGATTTCACTCTGACCATCA GCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAACTTAT TACTGTCAGCAACATTATACTACTCCTCCCACG TTCGGACAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACG
		AACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCC CCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCAC CGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTCT ACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT GGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACT CCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
mAb4 anti-HER2		
SEQ ID NO: 30	Cadena pesada	

mAb3 anti-HER2		
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 19	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

mAb5 anti-HER2		
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPEGDSLDMLEWSLM NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 32	Cadena pesada	
SEQ ID NO: 19	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

5 Otros anticuerpos anti-HER2 o fragmentos de anticuerpo (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) descritos en la presente incluyen aminoácidos que han sido mutados, pero que tienen al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad en las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, incluye secuencias de aminoácidos mutantes en las que no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones CDR en comparación con las regiones CDR representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1.

10

También se proporcionan en la presente secuencias de ácidos nucleicos que codifican VH, VL, cadena pesada de longitud completa y cadena ligera de longitud completa de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a HER2, p. ej., las secuencias de ácidos nucleicos en la Tabla 1. Secuencias de ácidos nucleicos de este tipo pueden optimizarse para la expresión en células de mamíferos.

Otros anticuerpos anti-HER2 descritos en la presente incluyen aquellos en los que los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos han sido mutados, pero tienen al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 1. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en las que no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones variables en comparación con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla 1, al tiempo que conserva sustancialmente la misma actividad terapéutica.

Dado que cada uno de los anticuerpos proporcionados se une a HER2, las secuencias VH, VL, de cadena ligera de longitud completa y de cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) se pueden "mezclar y combinar" para crear otros anticuerpos de unión a HER2 descritos en la presente. Dichos anticuerpos de unión a HER2 "mezclados y emparejados" se pueden testar utilizando ensayos de unión conocidos en la técnica (p. ej., ELISA, ensayos descritos en la Ejemplificación). Cuando las cadenas se mezclan y emparejan, una secuencia VH de un emparejamiento VH/VL particular debe reemplazarse por una secuencia VH estructuralmente similar. Una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un emparejamiento particular de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa debe reemplazarse por una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Una secuencia VL de un emparejamiento VH/VL particular debe reemplazarse por una secuencia VL estructuralmente similar. Una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un emparejamiento particular de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa debe reemplazarse por una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar.

Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una región de unión a antígeno del mismo que tiene: una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17; en donde el anticuerpo se une específicamente a HER2. En otra realización, la invención proporciona (i) un anticuerpo monoclonal aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 9, 21, 23, 30 o 32; y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; o (ii) una proteína funcional que comprende una porción de unión a antígeno de la misma.

En otra realización, la presente divulgación proporciona anticuerpos de unión a HER2 que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera tal como se describe en la Tabla 1, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 1, 4 y 6. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 2 y 5. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VH de los anticuerpos se muestran en la SEQ ID NO: 3. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 11 y 14. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO 12 y 15. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 13 y 16.

Dado que cada uno de los anticuerpos se une a HER2 y que la especificidad de unión al antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VL y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VK se pueden "mezclar y emparejar" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y emparejar, aunque cada uno de los anticuerpos debe contener una CDR1, CDR2 y CDR3 de VH y una CDR1, CDR2 y CDR3 de VL para crear otras moléculas de unión a HER2 descritas en la presente. Anticuerpos de unión a HER-2 "mezclados y emparejados" de este tipo pueden testarse utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica y los descritos en los Ejemplos (p. ej., ELISA). Cuando las secuencias de CDR de VH se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VH particular debe ser reemplazada por una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. De igual manera, cuando las secuencias de CDR de VL se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VL particular debe ser reemplazada por una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Resultará fácilmente aparente para el experto ordinario en la técnica que se pueden crear nuevas secuencias de VH y VL sustituyendo una o más secuencias de la región VH y/o VL CDR con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR mostradas en la presente para los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una región de unión a antígeno del mismo que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID NO: 1, 4 y 6; una CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 5; una CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11 y 14; una CDR2 de cadena ligera

que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y 15; y una CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13 y 16; en donde el anticuerpo se une específicamente a HER2.

5 En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une específicamente a HER2 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmento de unión a antígeno) que se describe en la Tabla 1.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HER2 humano comprende una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HER2 humano comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HER2 humano comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

30 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HER2 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

35 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HER2 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HER2 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HER2 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HER2 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

55 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a un epítipo en HER2 humano. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a un epítipo en HER2 humano, en donde el epítipo comprende uno o más de los residuos 557-561, 570-573 y 593- 603 de SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a un epítipo en HER2 humano, en donde el epítipo comprende uno o más de los residuos 245- 333 de SEQ ID NO: 26. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a un epítipo en HER2 humano, en donde el epítipo comprende uno o más de los siguientes residuos: His 245, Val 286, Ser 288, Leu 295, His 296, o Lys 311 de SEQ ID NO: 26.

60 Una vez que se determina un epítipo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos para ese epítipo, p. ej., utilizando las técnicas descritas en la presente invención. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos puede dilucidar información sobre epítopos deseables. A partir de esta información, es posible después cribar competitivamente anticuerpos que se unan al mismo epítipo. Un método para lograr esto es realizar estudios de competencia cruzada para encontrar anticuerpos que se unan de manera competitiva entre sí, p. ej., los anticuerpos compiten por unirse al antígeno. En la Solicitud de Patente Internacional N°

WO 2003/48731 se describe un procedimiento de alto rendimiento para anticuerpos de "agrupación" basado en su competencia cruzada. Como apreciará un experto en la materia, prácticamente cualquier cosa a la que un anticuerpo pueda unirse específicamente podría ser un epítipo. Un epítipo puede comprender aquellos residuos a los que se une el anticuerpo.

5

Modificación del Marco o Región Fc

Anticuerpos y conjugados de anticuerpos descritos en la presente pueden comprender anticuerpos modificados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden modificaciones a los residuos marco dentro de VH y/o VL, p. ej., para mejorar las propiedades del conjugado anticuerpo/anticuerpo.

10

En algunas realizaciones, se realizan modificaciones en el marco para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "retro-mutar" uno o más residuos marco a una secuencia de la línea germinal correspondiente. Dichos residuos pueden identificarse comparando las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las cuales se deriva el anticuerpo. Para "hacer coincidir" las secuencias de la región marco con la configuración de la línea germinal deseada, los residuos pueden "retro-mutar" a una secuencia de la línea germinal correspondiente mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio. Dichos anticuerpos "retro-mutados" también pretenden ser abarcados por la invención.

15

Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de una región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para separar los epítopos de células T para reducir con ello la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. A este enfoque también se le alude como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de EE.UU. N° 20030153043 de Carr et al.

20

Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de un marco o regiones CDR, los anticuerpos descritos en la presente pueden modificarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno.

25

Además, un anticuerpo descrito en la presente puede modificarse químicamente (p. ej., uno o más restos químicos pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación.

30

En una realización, la región de bisagra de CH1 se modifica de manera que el número de residuos cisteína en la región de bisagra se altera, p. ej., aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la Patente de EE.UU. N° 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

35

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmento de unión a antígeno) útiles en conjugados de anticuerpos descritos en la presente incluyen anticuerpos modificados o modificados genéticamente, tales como un anticuerpo modificado para introducir uno o más residuos cisteína como sitios para la conjugación a un resto de fármaco (Junutula JR, et al.: Nat Biotechnol 2008, 26: 925-932). En una realización, la invención proporciona un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en las posiciones descritas en la presente. Los sitios para la sustitución de cisteína están en las regiones constantes del anticuerpo y, por lo tanto, son aplicables a una diversidad de anticuerpos, y los sitios se seleccionan para proporcionar conjugados estables y homogéneos. Un anticuerpo o fragmento modificado puede tener dos o más sustituciones de cisteína, y estas sustituciones pueden utilizarse en combinación con otros métodos de modificación y conjugación de anticuerpos tal como se describe en la presente. Métodos para insertar cisteína en ubicaciones específicas de un anticuerpo son conocidos en la técnica, véase, p. ej., Lyons et al, (1990) Protein Eng., 3:703-708, documentos WO 2011/005481, WO2014/124316, WO 2015/138615. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada de las posiciones 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 y 422 de una cadena pesada del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema de la UE. En algunas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo comprende una sustitución de uno o más aminoácidos con cisteína en su región constante seleccionada de las posiciones 107, 108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199, y 203 de una cadena ligera del anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema de la UE y en donde la cadena ligera es un cadena ligera kappa humana. En ciertas realizaciones, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo del mismo comprende una combinación de sustitución de dos o más aminoácidos con cisteína en sus regiones constantes, en donde las combinaciones comprenden sustituciones en las posiciones 375 de una cadena pesada de anticuerpo, posición 152 de una cadena pesada de anticuerpo, posición 360 de una cadena pesada de anticuerpo, o posición 107 de una cadena ligera de anticuerpo y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema de la UE. En ciertas realizaciones,

40

45

50

55

60

65

un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo del mismo comprende una sustitución de un aminoácido con cisteína en sus regiones constantes, en donde la sustitución es la posición 375 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 152 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 360 de una cadena pesada de anticuerpo, la posición 107 de una cadena ligera de anticuerpo, la posición 165 de una cadena ligera de anticuerpo o la posición 159 de una cadena ligera de anticuerpo y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema de la UE, y en donde la cadena ligera es una cadena kappa.

En realizaciones particulares, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo del mismo comprende una combinación de sustitución de dos aminoácidos con cisteína en sus regiones constantes, en donde el anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo del mismo comprende cisteínas en las posiciones 152 y 375 de una cadena pesada de anticuerpo, en donde las posiciones están numerados de acuerdo con el sistema de la UE.

En otras realizaciones particulares, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo del mismo comprende una sustitución de un aminoácido con cisteína en la posición 360 de una cadena pesada de anticuerpo y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema de la UE.

En otras realizaciones particulares, un anticuerpo modificado o fragmento de anticuerpo del mismo comprende una sustitución de un aminoácido con cisteína en la posición 107 de una cadena ligera de anticuerpo y en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el sistema de la UE, y en donde la cadena ligera es una cadena kappa.

En realizaciones adicionales, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p ej., fragmento de unión a antígeno) útiles en conjugados de anticuerpos descritos en la presente incluyen anticuerpos modificados o modificados genéticamente, tales como un anticuerpo modificado para introducir uno o más de otros aminoácidos reactivos (distintos de cisteína), incluyendo Pcl, pirrolisina, etiquetas de péptidos (tales como etiquetas S6, A1 e ybbR) y aminoácidos no naturales, en lugar de al menos un aminoácido de la secuencia nativa, proporcionando así un sitio reactivo en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para conjugación con un resto de fármaco de Fórmula (I) o sub-fórmulas de la misma. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden modificarse para incorporar Pcl o pirrolisina (W. Ou et al. (2011) PNAS 108 (26), 10437-10442; documento WO2014124258) o aminoácidos no naturales (J.Y. Axup, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 109 (2012), págs. 16101-16106; para revisión, véase C.C. Liu y P.G. Schultz (2010) Annu Rev Biochem 79, 413-444; C.H. Kim, et al., (2013) Curr Opin Chem Biol. 17, 412-419) como sitios para la conjugación a un fármaco. De forma similar, se pueden introducir en un anticuerpo etiquetas peptídicas para los métodos de conjugación enzimática (Strop P. et al. Chem Biol. 2013, 20(2):161-7; Rabuka D., Curr Opin Chem Biol. 2010 Dec;14(6):790-6; Rabuka D, et al., Nat Protoc. 2012, 7(6):1052-67). Otro ejemplo es el uso de 4'- fosfopanteteinil transferasas (PPTasa) para la conjugación de análogos de Coenzima A (documento WO2013184514). Los métodos para conjugar dichos anticuerpos alterados o modificados con cargas o combinaciones de enlazador-carga son conocidos en la técnica.

En otra realización, una región de bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra de Fc de modo que el anticuerpo ha deteriorado la unión de la Proteína A de *Staphylococcus* (SpA) con respecto a la unión SpA del dominio de bisagra de Fc nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. N° 6.165.745 de Ward et al.

En aún otras realizaciones, se altera una región Fc reemplazando al menos un residuo aminoácido por un residuo aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden reemplazarse por un residuo aminoácido diferente, de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector en el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe, p. ej., en las patentes de EE.UU. N° 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter et al.

En otra realización, puede remplazarse uno o más aminoácidos seleccionados de restos aminoacídicos con un residuo aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga unión alterada a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Este enfoque se describe, p. ej., en la Patente de EE.UU. N° 6,194,551 de Idusogie et al.

En otra realización, se altera uno o más restos aminoacídicos para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo de fijar el complemento. Este enfoque se describe, p. ej., en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al. Los residuos de aminoácidos alotípicos incluyen la región constante de una cadena pesada de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3, así como la región constante de una cadena ligera del isotipo kappa tal como se describe por Jefferis et al., MAbs. 1: 332-338 (2009).

En aún otra realización, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), por ejemplo, modificando uno o más residuos aminoácidos para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor activador de Fcγ, o para disminuir la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ inhibitor. Los receptores Fcγ

activadores humanos incluyen FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb, y el receptor Fcγ inhibidor humano incluye FcγRIIb. Este enfoque se describe, p. ej., en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han mapeado sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields et al., J. Biol. Chem. 276: 6591-6604, 2001). Se ha descrito la optimización de las funciones efectoras mediadas por Fc de anticuerpos monoclonales, tales como la función ADCC/ADCP incrementada (véase Strohl, W.R., Current Opinion in Biotechnology 2009; 20: 685-691.) En algunas realizaciones, un conjugado de anticuerpo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una mutación o una combinación de mutaciones que confieren una función ADCC/ADCP potenciada, p. ej., una o más mutaciones seleccionadas de G236A, S239D, F243L, P247I, D280H, K290S, R292P, S298A, S298D, S298V, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339D, A339Q, A339T, P396L (todas las posiciones por numeración de la UE).

En otra realización, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar en la ADCC y/o ADCP, por ejemplo, modificando uno o más aminoácidos para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor activador que típicamente no reconocería el anticuerpo precursor, tal como FcαRI. Este enfoque se describe en, p. ej., Borrok et al., mAbs. 7(4):743-751. En realizaciones particulares, un conjugado de anticuerpo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una mutación o una fusión de una o más secuencias de anticuerpos que confieren una función ADCC y/o ADCP potenciada.

En todavía otra realización, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del marco de la región variable para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Una aglicosilación de este tipo puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Un enfoque de este tipo se describe, p. ej., en las patentes de EE.UU. N° 5.714.350 y 6.350.861, por Co et al.

Adicionalmente o de forma alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga cantidades mayores de estructuras de GlcNac entrecruzadas. Se ha demostrado que patrones de glicosilación alterados de este tipo aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Modificaciones de este tipo de los carbohidratos se pueden conseguir, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con una maquinaria de glicosilación alterada y estas se pueden utilizar como células hospedadoras en las que se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con una glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, células LecI3, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados a Asn (297), que también resulta en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields et al., (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). Publicación PCT WO 99/54342 por Umana et al. describe líneas celulares diseñadas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteína (p. ej., beta (1,4) -N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiben estructuras de GlcNac bisectantes incrementadas que dan como resultado una actividad incrementada de ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al., Nat. Biotech. 17:176-180, 1999).

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles varios enfoques. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6277375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión a receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG tal como se describe en las patentes de EE.UU. N° 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

Producción de Anticuerpos anti-HER2

Anticuerpos anti-HER2 y fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) de los mismos pueden producirse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo expresión recombinante, síntesis química y digestión enzimática de tetrámeros de anticuerpos, mientras que los anticuerpos monoclonales de longitud completa pueden obtenerse mediante, p. ej., hibridoma o producción recombinante. La expresión recombinante puede ser a partir de cualesquiera células huéspedes apropiadas conocidas en la técnica, por ejemplo, células huéspedes de mamífero, células huéspedes bacterianas, células huéspedes de levadura, células huéspedes de insecto, etc.

También se proporcionan en la presente polinucleótidos que codifican anticuerpos descritos en la presente, p. ej., polinucleótidos que codifican regiones o segmentos variables de cadena pesada o ligera que comprenden regiones determinantes de la complementariedad tal como se describe en la presente. En algunas realizaciones, un

polinucleótido que codifica las regiones variables de la cadena pesada tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica las regiones variables de la cadena ligera tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NO: 18.

En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica las regiones variables de la cadena pesada tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NO: 10, 22 o 24. En algunas realizaciones, un polinucleótido que codifica la cadena ligera tiene al menos 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% identidad de secuencia de ácido nucleico con un polinucleótido de SEQ ID NO: 20 o 34.

Algunos polinucleótidos descritos en la presente codifican una región variable de un anticuerpo anti-HER2. Algunos polinucleótidos descritos en la presente codifican tanto una región variable como una región constante de un anticuerpo anti-HER2. Algunas secuencias de polinucleótidos codifican un polipéptido que comprende regiones variables tanto de una cadena pesada como de una cadena ligera de un anticuerpo anti-HER2. Algunos polinucleótidos codifican dos segmentos de polipéptidos que respectivamente son sustancialmente idénticos a las regiones variables de una cadena pesada y una cadena ligera de cualesquiera anticuerpos anti-HER2 descritos en la presente.

Secuencias de polinucleótidos se pueden producir mediante síntesis de ADN de fase sólida de novo o mediante mutagénesis por PCR de una secuencia existente (*p. ej.*, secuencias tal como se describen en los Ejemplos que figuran más adelante) que codifica un anticuerpo anti-HER2 o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos se puede lograr mediante métodos conocidos en la técnica tales como el método del fosfotriéster de Narang et al., *Meth. Enzymol.* 68:90, 1979; el método de fosfodiéster de Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979; el método de dietilfosforoamidita de Beaucage et al., *Tetra. Lett.*, 22:1859, 1981; y el método del soporte sólido de la patente de EE.UU. N.º 4 458 066. La introducción de mutaciones a una secuencia de polinucleótidos por PCR se puede realizar tal como se describe en, *p. ej.*, *PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; y Eckert et al., *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

También se proporcionan vectores de expresión y células huéspedes para producir anticuerpos anti-HER2 arriba descritos. Se pueden emplear diversos vectores de expresión para expresar polinucleótidos que codifican cadenas de anticuerpos anti-HER2 o fragmentos de unión. Tanto los vectores de expresión basados en virus como los no virales pueden utilizarse para producir anticuerpos en una célula huésped de mamífero.

Vectores no virales y sistemas incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, *p. ej.*, Harrington et al., *Nat Genet* 15: 345, 1997). Por ejemplo, vectores no virales útiles para la expresión de polinucleótidos y polipéptidos anti-HER2 en células de mamíferos (*p. ej.*, seres humanos) incluyen pThioHis A, B y C, pCDNATM3.1/His, pEBVHis A, B y C (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV y numerosos otros vectores conocidos en la técnica para expresar otras proteínas. Vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores del virus vaccinia y virus Semliki Forest (SFV). Véase, Brent *et al.*, *supra*; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; y Rosenfeld et al., *Cell* 68:143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células huéspedes previstas en las que se ha de expresar un vector. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (*p. ej.*, potenciadores) que están operativamente enlazados a polinucleótidos que codifican una cadena o fragmento de anticuerpo anti-HER2. En algunas realizaciones, se emplea un promotor inducible para evitar la expresión de secuencias insertadas excepto en condiciones inductoras. Promotores inducibles incluyen, *p. ej.*, arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Cultivos de organismos transformados pueden expandirse en condiciones no inductoras sin influenciar a la población para secuencias codificantes, cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huéspedes. Además de promotores, también se pueden requerir o desear otros elementos reguladores para la expresión eficiente de una cadena o fragmento de anticuerpo anti-HER2. Elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión al ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, *p. ej.*, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125, 1994; y Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153: 516, 1987). Por ejemplo, se puede utilizar un potenciador de SV40 o un potenciador de CMV para aumentar la expresión en células huéspedes de mamífero.

Vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpo anti-HER2 insertadas. Más a menudo, secuencias de anticuerpos anti-HER2 insertadas se enlazan a una secuencia señal antes de su inclusión en

el vector. Vectores a utilizar para recibir secuencias que codifican dominios variables de cadena ligera y pesada de anticuerpo anti-HER2 a veces también codifican regiones constantes o partes de las mismas. Dichos vectores permiten la expresión de regiones variables como proteínas de fusión con regiones constantes, conduciendo con ello a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Típicamente, dichas regiones constantes son humanas.

Células huéspedes para albergar y expresar cadenas de anticuerpos anti-HER2 pueden ser procariotas o eucariotas. *E. coli* es un huésped procariota útil para clonar y expresar polinucleótidos de la presente divulgación. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriaceae, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariotas, también se pueden preparar vectores de expresión, que contienen habitualmente secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huéspedes (*p. Ej.*, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una diversidad de promotores bien conocidos, tales como un sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor de fago lambda. Los promotores habitualmente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitio de unión a ribosomas, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. También se pueden emplear otros microbios, tales como levaduras, para expresar polipéptidos anti-HER2 descritos en la presente. También se pueden utilizar células de insectos combinadas con vectores de baculovirus.

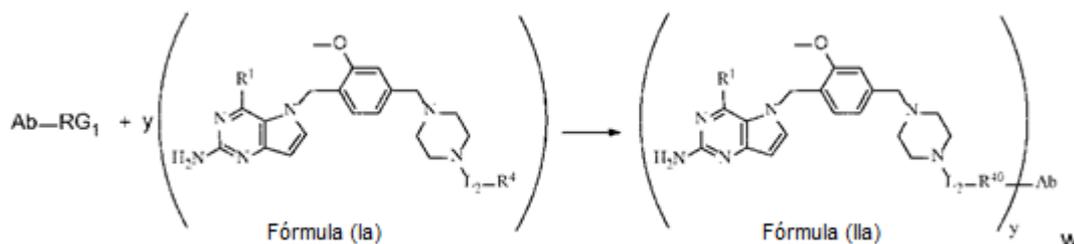
En algunas realizaciones particulares, las células huéspedes de mamífero se utilizan para expresar y producir polipéptidos anti-HER2 de la presente divulgación. Por ejemplo, pueden ser una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógena (*p. ej.*, clones de hibridoma de mieloma) o una línea celular de mamífero que alberga un vector de expresión exógeno (*p. ej.*, las células de mieloma SP2/0). Estas incluyen cualquier célula animal o humana normal mortal o normal o anómala inmortal. Por ejemplo, se ha desarrollado un cierto número de líneas celulares huéspedes adecuadas, capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluidas diversas líneas celulares CHO, líneas celulares Cos, células HeLa, líneas celulares de mieloma, células B transformadas e hibridomas. El uso del cultivo de células de tejidos de mamíferos para expresar polipéptidos se discute generalmente en, *p. ej.*, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Vectores de expresión para células huéspedes de mamíferos pueden incluir secuencias de control de la expresión, tal como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (véase, *p. ej.*, Queen et al., *Immunol. Rev.* 89: 49-68, 1986), y los sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Los vectores de expresión contienen habitualmente promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos para el tipo de célula, específicos para el estadio y/o modulables o regulables. Promotores útiles incluyen, un promotor de metalotioneína, un promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, un promotor MMTV inducible por dexametasona, un promotor SV40, un promotor MRP polIII, un promotor constitutivo MPSV, un promotor CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor CMV inmediato-temprano humano), un promotor constitutivo de CMV y combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

Métodos para introducir vectores de expresión que contienen secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden utilizar para otros huéspedes celulares (véase generalmente Sambrook *et al.*, supra). Otros métodos incluyen, *p. ej.*, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, conjugados de polimerización:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, *Cell* 88:223, 1997), absorción de ADN potenciada por el agente y transducción *ex vivo*. Para la producción a largo plazo de alto rendimiento de proteínas recombinantes, a menudo se deseará una expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresan de manera estable cadenas de anticuerpos anti-HER2 o fragmentos de unión pueden prepararse utilizando vectores de expresión descritos en la presente que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células se multipliquen durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiar al medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite la multiplicación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Células resistentes, transfectadas de forma estable, pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo tisular apropiadas para el tipo de célula.

Procedimientos para Hacer conjugado de Anticuerpo de Fórmula (IIa) y Fórmula (IIb)

Un esquema de reacción general para la formación de conjugados inmunoestimuladores de Fórmula (II) se muestra en el Esquema 13 que figura más adelante:

Scheme 13

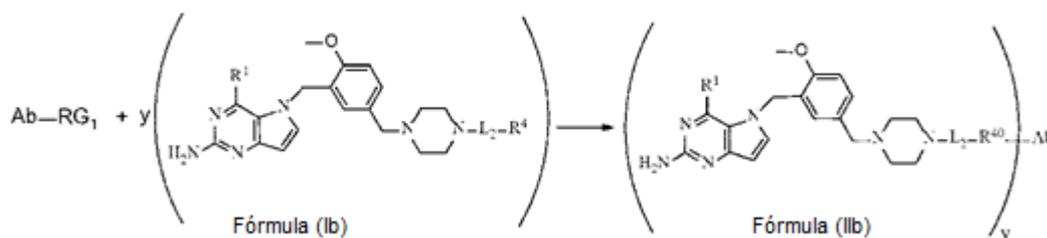


aquí: RG₁ es un grupo reactivo que reacciona con un grupo R⁴ compatible de un compuesto de Fórmula (Ia) para formar un correspondiente grupo R⁴⁰, tal como maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo de succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima; R¹, R⁴, L₂, Ab y R⁴⁰ son como se definen en la presente.

5

Un esquema de reacción general para la formación de conjugados inmunoestimuladores de Fórmula (IIb) se muestra en el Esquema 14 que figura más adelante:

Esquema 14



en que: RG₁ es un grupo reactivo que reacciona con un grupo R⁴ compatible de un compuesto de Fórmula (Ib) para formar un correspondiente grupo R⁴⁰, tal como maleimida que reacciona con un tiol para dar un anillo de succinimida, o una hidroxilamina que reacciona con una cetona para dar una oxima; R¹, R⁴, L₂, Ab y R⁴⁰ son como se definen en la presente.

10

15 Usos terapéuticos

Los conjugados de anticuerpos proporcionados son útiles en una diversidad de aplicaciones que incluyen el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer HER2 positivo. En ciertas realizaciones, los conjugados de anticuerpos proporcionados en la presente son útiles para inhibir el crecimiento del tumor, reducir el volumen del tumor, inducir la diferenciación y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor, p. ej., un tumor sólido HER2. Los métodos de uso pueden ser métodos *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*.

20

En algunas realizaciones, en la presente se proporciona el uso de los conjugados de anticuerpos de la invención para tratar o prevenir enfermedades en un sujeto, p. ej., un paciente humano. Además se proporciona el uso de conjugados de anticuerpos en el tratamiento o la prevención de enfermedades en un sujeto. En algunas realizaciones, se proporcionan conjugados de anticuerpos para uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades en un sujeto. En ciertas realizaciones, la enfermedad tratada con conjugados de anticuerpos es un cáncer, p. ej., un cáncer HER2-positivo. Diversos cánceres que pueden tratarse con los conjugados de anticuerpos se enumeran en la sección de definiciones anterior. El cáncer HER2-positivo puede ser cualquier cáncer que comprenda células que tengan proteína HER2 presente en su superficie celular. Por ejemplo, un cáncer HER2-positivo puede ser tumor primario o metástasis de cualquiera de cáncer gástrico, cáncer esofágico, adenocarcinoma de la unión gastroesofágica, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer endometrial, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, osteosarcoma, neuroblastoma, glioblastoma, tumores neuroendocrinos y cáncer de cabeza y cuello. En ciertas realizaciones, el cáncer se caracteriza por células que expresan HER2 a las que se unen los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) de los conjugados de anticuerpos. En ciertas realizaciones, el cáncer se caracteriza por la expresión concurrente de múltiples receptores del factor de crecimiento epidérmico humano además de la expresión de HER2. En algunas realizaciones, el cáncer HER2-positivo puede tener una alta expresión de HER2, p. ej., puede tener una puntuación de inmunohistoquímica (IHC) de 3+, que se define como una tinción de membrana intensa uniforme de > 30% de células tumorales invasivas según se determina por la puntuación IHC de la American Society of Clinical Oncology y el College of American Pathologists (ASCO/CAP) (véase English et al., Mol Diagn Ther. abril 2013; 17 (2): 85-99). En algunas realizaciones, el cáncer HER2-positivo puede tener una expresión de HER2 relativamente baja, p. ej., puede tener una puntuación IHC de 2+, que se define como una tinción de membrana completa que no es uniforme o débil en intensidad, pero con una distribución circunferencial obvia en al menos 10% de las células o muy raramente tumores que muestran tinción de membranas completas de 30% o menos de células tumorales según la puntuación ASCO/CAP IHC (véase English et al., Mol Diagn Ther. abril 2013; 17 (2): 85-99).

45

En algunas realizaciones, se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los conjugados de anticuerpos descritos en la presente para tratar un cáncer HER2-positivo en un sujeto que lo necesite. El cáncer HER2-positivo puede ser cualquier cáncer que comprenda células que tengan proteína HER2 presente en su superficie celular. En algunas realizaciones, el conjugado de anticuerpo utilizado es capaz de suprimir el cáncer HER2-positivo durante un período sostenido y/o reducir la recurrencia del cáncer HER2-positivo, en comparación con un anticuerpo anti-HER2 solo.

También se contempla que los conjugados de anticuerpos descritos en la presente se puedan utilizar para tratar diversas enfermedades o trastornos no malignos, tales como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), úlceras gastrointestinales, enfermedad de Menetrier, hepatitis B, hepatitis C, adenomas secretores o síndrome de pérdida de proteínas, trastornos renales, trastornos angiogénicos, enfermedades oculares, tales como degeneración macular relacionada con la edad, presunto síndrome de histoplasmosis ocular o degeneración macular relacionada con la edad, patologías asociadas con los huesos, tales como osteoartritis, raquitismo y osteoporosis, síndrome de hiperviscosidad sistémico, enfermedad de Osler Weber-Rendu, enfermedad pulmonar oclusiva crónica o edema después de quemaduras, trauma, radiación, apoplejía, hipoxia o isquemia, nefropatía diabética, enfermedad de Paget, fotoenvejecimiento (p. ej., provocado por la radiación UV de la piel humana), hipertrofia prostática benigna, ciertas infecciones microbianas, incluidos los patógenos microbianos seleccionados de adenovirus, hantavirus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. y *Bordetella pertussis*, trombo provocado por agregación plaquetaria, afecciones reproductivas, tales como endometriosis, síndrome de hiperestimulación ovárica, preeclampsia, hemorragia uterina disfuncional o menometrorragia, nefropatías agudas y crónicas (incluida la glomerulonefritis proliferativa), formación de cicatriz hipertrófica, choque endotóxico e infección fúngica, poliposis adenomatosa familiar, síndromes mielodisplásicos, anemia aplásica, lesión isquémica, fibrosis pulmonar, renal o hepática, estenosis pilórica hipertrófica infantil, síndrome obstructivo urinario, artritis psoriásica.

El método de administración de conjugados de anticuerpos de este tipo incluye la administración parenteral (p. ej., intravenosa), p. ej., inyección como un bolo o infusión continua a lo largo de un período de tiempo, administración oral, administración intramuscular, administración intratumoral, administración intramuscular, administración intraperitoneal, administración intracerebroespinal, administración subcutánea, administración intra-articular, administración intrasinoval, inyección a los ganglios linfáticos o administración intratecal.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de conjugados de anticuerpos de la presente invención depende de diversos factores, tales como el tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y el curso de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, la terapia previa, el historial clínico del paciente, etcétera. Conjugados de anticuerpos se pueden administrar una vez o a lo largo de una serie de tratamientos que duran desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad (p. ej., reducción en el tamaño del tumor). Los programas de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente y variarán dependiendo de la potencia relativa de un conjugado de anticuerpos particular. En algunas realizaciones, la dosificación es de 0,01 mg a 20 mg (p. Ej., 0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,04 mg, 0,05 mg, 0,06 mg, 0,07 mg, 0,08 mg, 0,09 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, o 20 mg) por kg de peso corporal, y se pueden administrar una o más veces al día, semanal, mensual o anualmente. En ciertas realizaciones, el conjugado de anticuerpos de la presente invención se administra una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. En ciertas realizaciones, el conjugado de anticuerpo de la presente invención se administra solo una vez. El médico tratante puede estimar las tasas de repetición para la dosificación en función de los tiempos de permanencia medidos y las concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales.

Terapia Combinada

En ciertos casos, un conjugado de anticuerpos de la presente invención se puede combinar con otros agentes terapéuticos, tales como otros agentes anticancerígenos, agentes antialérgicos, agentes contra las náuseas (o anti-eméticos), analgésicos, agentes citoprotectores y combinaciones de los mismos.

Agentes quimioterapéuticos generales considerados para su uso en terapias combinadas incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfano (Myleran®), inyección de busulfano (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4- pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucilo (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytosan® o Neosar®), arabinósido de citosina (Cytosar-U®), inyección de liposoma de citarabina (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (Actinomicina D, Cosmegan), hidrocloreuro de daunorrubicina (Cerubidine®), inyección de liposoma de citrato de daunorrubicina (DaunoXome®) dexametasona, docetaxel (Taxotere®), hidrocloreuro de doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Acrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacicitabina, Gemcitabina (difluorodeoxicitidina), hidroxiaurea (Hydrea®), Idarubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecán (Campptosar®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina cálcica, melfalan (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®),

mitoxantrona (Novantrone®), mylotarg, paclitaxel (Taxol®), fenix (Yttrium90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosan 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), hidroclicloruro de topotecan para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), vinorelbina (Navelbine®), epirubicina (Ellence®), oxaliplatino (Eloxatin®), exemestano (Aromasin®), letrozol (Femara®) y fulvestrant (Faslodex®).

La expresión "combinación farmacéutica", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una combinación fija en una forma de dosificación unitaria, o una combinación no fija o un kit de partes para la administración combinada en la que dos o más agentes terapéuticos pueden administrarse independientemente al mismo tiempo o por separado dentro de los intervalos de tiempo, especialmente en los casos en los que estos intervalos de tiempo permiten que los participantes combinados muestren un efecto cooperativo, p. ej., sinérgico.

La expresión «terapia combinada» se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico que se describe en la presente divulgación. Dicha administración engloba la coadministración de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una única cápsula que tiene una proporción fija de los principios activos. Alternativamente, dicha administración abarca la coadministración en recipientes múltiples o separados (p. ej., cápsulas, polvos y líquidos) para cada uno de los ingredientes activos. Los polvos y/o líquidos se pueden reconstituir o diluir hasta una dosis deseada antes de la administración. Además, tal administración también engloba el uso de cada tipo del agente terapéutico de una manera secuencial, ya sea aproximadamente a la vez o en momentos diferentes. En cualquier caso, la pauta de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación farmacológica para tratar las afecciones o trastornos descritos en la presente.

La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar "sinergia", es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos utilizados juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos son: (1) co-formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosis unitaria combinada; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se administra en terapia de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o administran secuencialmente, p. ej., mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, una dosis efectiva de cada uno de los ingredientes activos se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, las dosis efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

En una realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más de otros anticuerpos anti-HER2, p. ej., trastuzumab, pertuzumab, margetuximab o HT-19 arriba descritos, o con otros conjugados anti-HER2, p. ej., ado-trastuzumab emtansine (también conocido como Kadcyła® o T-DM1) para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita.

En una realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más inhibidores de tirosina quinasa, incluyendo inhibidores de EGFR, inhibidores de Her3, inhibidores de IGFR e inhibidores de Met para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

Por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasa incluyen hidroclicloruro de erlotinib (Tarceva®); Linifanib (N-[4-(3-amino-1H-indazol-4-il)fenil]-N'-(2-fluoro-5-metilfenil)urea, también conocida como ABT 869, disponible de Genentech); malato de sunitinib (Sutent®); Bosutinib (4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propoxi]quinolin-3-carbonitrilo, también conocido como SKI-606, y descrito en la Patente de EE.UU. N° 6.780.996); Dasatinib (Sprycel®); Pazopanib (Votrient®); Sorafenib (Nexavar®); Zactima (ZD6474); e imatinib o mesilato de imatinib (Gilevec® y Gleevec®).

Inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) incluyen hidroclicloruro de erlotinib (Tarceva®), Gefitinib (Iressa®); N-[4-[(3-cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[[3(S)-tetrahydro-3-furanil]oxi]-6-quinazolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida, Tovok®; Vandetanib (Caprelsa®); Lapatinib (Tykerb®); (3R,4R)-4-amino-1-((4-(3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); dihidroclicloruro de Canertinib (CI-1033); 6-[4-[(4-etil-1-piperazinil)metil]fenil]-N-[(1R)-1-feniletil]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (AEE788, CAS 497839-62-0); Mubritinib (TAK165); Pelitinib (EKB569); Afatinib (Gilotrif®); Neratinib (HKI-272); ácido N-[4-[[1-[(3-fluorofenil)metil]-1H-indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]-carbámico, éster (3S)-3-morfolinilmetílico (BMS599626); N-(3,4-dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[3(α,5β,6α)-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8); y 4-[4-[[1(R)-1-feniletil]amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol (PKI166, CAS187724-61-4).

Anticuerpos de EGFR incluyen Cetuximab (Erbix®); Panitumumab (Vectibix®); Matuzumab (EMD-72000); Nimotuzumab (hR3); Zalutumumab; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); y ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1).

Otros inhibidores de HER2 incluyen Neratinib (HKI-272, (2E)-N-[4-[[3-cloro-4-[(piridin-2-il)metoxi]fenil]amino]-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida, y descrita en la Publicación PCT N° WO 05/028443); Lapatinib o Lapatinib ditosilato (Tykerb®); (3R,4R)-4-amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); (2E)-N-[4-[[3-cloro-4-fluorofenil]amino]-7-[[3S]-tetrahidro-3-furanil]oxi]-6-quinazolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida (BIBW-2992, CAS 850140-72-6); éster (3S)-3-morfolinilmetílico del ácido N-[4-[[1-[(3-fluorofenil)metil]-1H-indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]-carbámico (BMS 599626, CAS 714971-09-2); Canertinib dihidrocloruro (PD183805 o CI-1033); y N-(3,4-dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[3 α ,5 β ,6 α]-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8).

10 Inhibidores de HER3 incluyen LJM716, MM-121, AMG-888, RG7116, REGN-1400, AV-203, MP-RM-1, MM-111 y MEHD-7945A.

Inhibidores de MET incluyen Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1); Foretinib (GSK1363089, anteriormente XL880, CAS 849217-64-7); Tivantinib (ARQ197, CAS 1000873-98-2); 1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-N-(5-(7-metoxiquinolin-4-il)piridin-2-il)-5-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazolo-4-carboxamida (AMG 458); Cryzotinib (Xalkorí®, PF-02341066); (3Z)-5-(2,3-dihidro-1H-indol-1-ilsulfonil)-3-((3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il)metileno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (SU11271); (3Z)-N-(3-clorofenil)-3-((3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il)metileno)-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida (SU11274); (3Z)-N-(3-clorofenil)-3-[[3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-ilpropil)-1H-pirrol-2-il]metileno]-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida (SU11606); 6-[[difluoro[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolo[4,3-b]piridazin-3-il]metil]-quinolina (JNJ38877605, CAS 943540-75-8); 2-[4-[1-(quinolin-6-ilmetil)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pirazin-6-il]-1H-pirazol-1-il]etanol (PF04217903, CAS 956905-27-4); N-((2R)-1,4-dioxan-2-ilmetil)-N-metil-N'-[3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-5-oxo-5H-benzo[4,5]ciclohepta[1,2-b]piridin-7-il]sulfamida (MK2461, CAS 917879-39-1); 6-[[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolo[4,3-b]piridazin-3-il]tio]-quinolina (SGX523, CAS 1022150-57-7); y (3Z)-5-[[[(2,6-diclorofenil)metil]sulfonil]-3-[[3,5-dimetil-4-[[2R]-2-(1-pirrolidinilmetil)-1-pirrolidinil]carbonil]-1H-pirrol-2-il]metileno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (PHA665752, CAS 477575-56-7).

Inhibidores de IGFR incluyen BMS-754807, XL-228, OSI-906, GSK0904529A, A-928605, AXL1717, KW-2450, MK0646, AMG479, IMCA12, MEDI-573 y BI836845. Véase, p. ej., Yee, JNCI, 104; 975 (2012) para una revisión.

30 En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más inhibidores de la vía de señalización de la proliferación, incluyendo inhibidores de MEK, inhibidores de BRAF, inhibidores de PI3K/Akt, inhibidores de SHP2 y también inhibidores de mTOR e inhibidores de CDK para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

35 Por ejemplo, inhibidores de la proteína quinasa activada por mitógenos (MEK) incluyen XL-518 (también conocido como GDC-0973, Cas N° 1029872-29-4, disponible de ACC Corp.); 2-[(2-cloro-4-yodofenil)amino]-N-(ciclopropilmetoxi)-3,4-difluoro-benzamida (también conocida como CI-1040 o PD184352 y descrita en la Publicación PCT N° WO2000035436); N-[(2R)-2,3-dihidroxiopropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-benzamida (también conocida como PD0325901 y descrita en la Publicación PCT N° WO2002006213); 2,3-bis[amino[(2-aminofenil)tio]metileno]-butanodinitrilo (también conocido como U0126 y descrito en la Patente de EE.UU. N° 2.779.780); N-[3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-6-metoxifenil]-1-[(2R)-2,3-dihidroxiopropil]-ciclopropanosulfonamida (también conocida como RDEA119 o BAY869766 y descrita en la Publicación PCT N° WO2007014011); (3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(etilamina)-8,9,16-trihidroxi-3,4-dimetil-3,4,9, 19-tetrahidro-1H-2-benzoxaciclotetradecina-1,7(8H)-diona] (también conocida como E6201 y descrita en la Publicación PCT N° WO2003076424); 2'-amino-3'-metoxiflavona (también conocida como PD98059 disponible de Biaffin GmbH & Co., KG, Alemania); Vemurafenib (PLX-4032, CAS 918504-65-1); (R)-3-(2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-5-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-8-metilpirido[2,3-d]pirimidina-4,7(3H,8H)-diona (TAK-733, CAS 1035555-63-5); Pimasertib (AS-703026, CAS 1204531-26-9); y Trametinib dimetilsulfóxido (GSK-1120212, CAS 1204531-25-80).

50 Inhibidores de BRAF incluyen Vemurafenib (o Zelboraf®), GDC-0879, PLX-4720 (disponible de Symansis), Dabrafenib (o GSK2118436), LGX 818, CEP-32496, UI-152, RAF 265, Regorafenib (BAY 73-4506), CCT239065 o Sorafenib (o Sorafenib tosilato, o Nexavar®), o Ipilimumab (o MDX-010, MDX-101 o Yervoy).

Inhibidores de fosfoinositida 3-quinasa (PI3K) incluyen 4-[2-(1H-indazol-4-il)-6-[[4-(metilsulfonil)piperazin-1-il]metil]tieno[3,2-d]pirimidin-4-il]morfolina (también conocida como GDC0941, RG7321, GNE0941, Pictrelisib, o Pictlisib; y descrita en las Publicaciones PCT N° WO 09/036082 y WO 09/055730); 2-metil-2-[4-[3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-1-il]fenil]propionitrilo (también conocido como BEZ 235 o NVP-BEZ 235, y descrito en la Publicación PCT N° WO 06/122806); 4-(trifluorometil)-5-(2,6-dimorfolinopirimidin-4-il)piridin-2-amina (también conocida como BKM120 o NVP-BKM120, y descrita en la Publicación PCT N° WO2007/084786); Tozasertib (VX680 o MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-piridinil)-6-quinolinil]metileno]-2,4-tiazolidinadiona (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(acetiloxi)-1-[[di-2-propenilamino]metileno]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-octahidro-11-hidroxi-4-(metoximetil)-4a,6a-dimetilciclopenta[5,6]nafto[1,2-c]piran-2,7,10(1H)-triona (PX866, CAS 502632-66-8); 8-fenil-2-(morfolin-4-il)-cromen-4-ona (LY294002, CAS 154447-36-6); (S)-N1-(4-metil-5-(2-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)piridin-4-il)tiazol-2-il)pirrolidina-1,2-dicarboxamida (también conocida como BYL719 o

Alpelisib); 2-(4-(2-(1-isopropil-3-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)-1H-pirazol-1-il)-2-metilpropanamida (también conocida como GDC0032, RG7604 o Taselisib).

Inhibidores de mTOR incluyen Temsirolimus (Torisel®); Ridaforolimus (anteriormente conocido como deferolimus, dimetilfosfinato de (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2 [(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23, 29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.04,9]hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, también conocido como AP23573 y MK8669, y descrito en la Publicación PCT N° WO 03/064383); Everolimus (Afinitor® o RAD001); Rapamicina (AY22989, Sirolimus®); Simapimod (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il)-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[trans-4-(2-hidroxietoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y N²-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L- α -aspartil-L-serina, sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1).

Inhibidores de CDK incluyen Palbociclib (también conocido como PD-0332991, Ibrance®, 6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-[[5-(1-piperazinil)-2-piridinil]amino]pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona).

En aún otra realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más pro-apoptóticos, que incluyen inhibidores de IAP, inhibidores de BCL2, inhibidores de MCI1, agentes TRAIL, inhibidores de CHK para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

Por ejemplo, inhibidores de IAP incluyen LCL161, GDC-0917, AEG-35156, AT406 y TL32711. Otros ejemplos de inhibidores de IAP incluyen los descritos en los documentos WO04/005284, WO 04/007529, WO05/097791, WO 05/069894, WO 05/069888, WO 05/094818, US2006/0014700, US2006/0025347, WO 06/069063, WO 06/010118, WO 06/017295 y WO08/134679.

Inhibidores de BCL-2 incluyen 4-[4-[[2-(4-clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohexen-1-il]metil]-1-piperazinil]-N-[[4-[[[(1R)-3-(4-morfolinil)-1-[(feniltio)metil]propil]amino]-3-[[trifluorometil]sulfonil]fenil]sulfonil]benzamida (también conocida como ABT-263 y descrita en la Publicación PCT N° WO 09/155386); Tetrocarcin A; Antimicina; Gossypol ((-)BL-193); Obatoclax; 2-amino-6-ciclopentil-4-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetil)-4H-cromona-3-carboxilato de etilo (HA14 -1); Oblimersen (G3139, Genasense®); Bak BH3 péptido; ácido acético (-)-gospol (AT-101); 4-[4-[[4'-cloro[1,1'-bifenil]-2-il]metil]-1-piperazinil]-N-[[4-[[[(1R)-3-(dimetilamino)-1-[(feniltio)metil]propil]amino]-3-nitrofenil]sulfonil]-benzamida (ABT-737, CAS 852808-04-9); y Navitoclax (ABT-263, CAS 923564-51-6).

Agonistas del receptor proapoptótico (PARA) incluyen DR4 (TRAILR1) y DR5 (TRAILR2), incluyendo Dulanermin (AMG-951, RhApo2L/TRAIL); Mapatumumab (HRS-ETR1, CAS 658052-09-6); Lexatumumab (HGS-ETR2, CAS 845816-02-6); Apomab (Apomab®); Conatumumab (AMG655, CAS 896731-82-1); y Tigatuzumab (CS1008, CAS 946415-34-5, disponible de Daiichi Sankyo).

Inhibidores de la quinasa de punto de control (CHK) incluyen 7-hidroxiestaurosporina (UCN-01); 6-bromo-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-5-(3R)-3-piperidinilpirazolo[1,5-a]pirimidin-7-amina (SCH900776, CAS 891494-63-6); N-[(S)-piperidin-3-il]amida del ácido 5-(3-fluorofenil)-3-ureidotiofeno-2-carboxílico (AZD7762, CAS 860352-01-8); 4-[[[(3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]amino]-3-(1H-bencimidazol-2-il)-6-cloroquinolin-2(1H)-ona (CHIR 124, CAS 405168-58-3); 7-aminodactinomicina (7-AAD), Isogranulatimida, debromohimendaldisina; N-[5-bromo-4-metil-2-[(2S)-2-morfolinilmetoxi]-fenil]-N'-(5-metil-2-pirazinil)urea (LY2603618, CAS 911222-45-2); Sulforafano (CAS 4478-93-7, isotiocianato de 4-metilsulfonilbutilo); 9,10,11,12-tetrahidro-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]pirrolo[3,4- λ][1,6]benzodiazocina-1,3(2H)-diona (SB-218078, CAS 135897-06-2); y TAT-S216A (YGRKKRRQRRRLYRSPAMPENL (SEQ ID NO: 33)) y CBP501 ((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrr).

En una realización adicional, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más inmunomoduladores (*p. ej.*, uno o más de un activador de una molécula coestimuladora o un inhibidor de una molécula de punto de control inmune) para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En ciertas realizaciones, el inmunomodulador es un activador de una molécula coestimuladora. En una realización, el agonista de la molécula coestimuladora se elige de un agonista (*p. ej.*, un anticuerpo agonista o fragmento de unión a antígeno del mismo, o una fusión soluble) de ligando OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 o CD83.

En ciertas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de una molécula de punto de control inmunitario. En una realización, el inmunomodulador es un inhibidor de PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFRbeta. En una realización, el inhibidor de una molécula de punto de control inmunitario inhibe PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 o CTLA4, o cualquier combinación de los mismos. El término "inhibición" o "inhibidor" incluye una reducción en un cierto parámetro, *p. ej.*, una actividad, de una molécula dada, *p. ej.*, un inhibidor del punto de control inmunitario. Por ejemplo, inhibición de una actividad, *p. ej.*, por este término se incluye una

actividad de PD-1 o PD-L1 de al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más. Por lo tanto, la inhibición no necesita ser del 100%.

La inhibición de una molécula inhibidora se puede realizar a nivel de ADN, ARN o proteína. En algunas realizaciones, se puede utilizar un ácido nucleico inhibidor (*p. ej.*, un ARNdc, ARNip o ARNhp), para inhibir la expresión de una molécula inhibidora. En otras realizaciones, el inhibidor de una señal inhibidora es un polipéptido, *p. ej.*, un ligando soluble (*p. ej.*, PD-1-Ig o CTLA-4 Ig), o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la molécula inhibidora; *p. ej.*, un anticuerpo o fragmento del mismo (al que también se alude en la presente como "una molécula de anticuerpo") que se une a PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFR beta, o una combinación de los mismos.

En una realización, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo completo o fragmento del mismo (*p. ej.*, un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv)). En aún otra realización, la molécula de anticuerpo tiene una región constante de cadena pesada (Fc) elegida, *p. ej.*, de las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; en particular, elegido de, *p. ej.*, las regiones constantes de la cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, más particularmente, la región constante de la cadena pesada de IgG1 o IgG4 (*p. Ej.*, IgG1 o IgG4 humana). En una realización, la región constante de la cadena pesada es IgG1 humana o IgG4 humana. En una realización, la región constante se altera, *p. ej.*, muta, para modificar las propiedades de la molécula de anticuerpo (*p. ej.*, para aumentar o disminuir uno o más de la unión al receptor Fc, la glicosilación del anticuerpo, el número de residuos cisteína, la función de la célula efectora o la función del complemento).

En ciertas realizaciones, la molécula de anticuerpo está en forma de una molécula de anticuerpo biespecífica o multiespecífica. En una realización, la molécula de anticuerpo biespecífica tiene una primera especificidad de unión a PD-1 o PD-L1 y una segunda especificidad de unión, *p. ej.*, una segunda especificidad de unión a TIM-3, LAG-3 o PD-L2. En una realización, la molécula de anticuerpo biespecífica se une a PD-1 o PD-L1 y TIM-3. En otra realización, la molécula de anticuerpo biespecífica se une a PD-1 o PD-L1 y LAG-3. En otra realización, la molécula de anticuerpo biespecífica se une a PD-1 y PD-L1. En aún otra realización, la molécula de anticuerpo biespecífica se une a PD-1 y PD-L2. En otra realización, la molécula de anticuerpo biespecífica se une a TIM-3 y LAG-3. Cualquier combinación de las moléculas mencionadas anteriormente puede hacerse en una molécula de anticuerpo multiespecífico, *p. ej.*, un anticuerpo trispecífico que incluye una primera especificidad de unión a PD-1 o PD-L1, y una segunda y tercera especificidades de unión a dos o más de: TIM-3, LAG-3, o PD-L2.

En ciertas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de PD-1, *p. ej.*, PD-1 humano. En otra realización, el inmunomodulador es un inhibidor de PD-L1, *p. ej.*, PD-L1 humano. En una realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1 es una molécula de anticuerpo para PD-1 o PD-L1. El inhibidor de PD-1 o PD-L1 puede administrarse solo o en combinación con otros inmunomoduladores, *p. ej.*, en combinación con un inhibidor de LAG-3, TIM-3 o CTLA4. En una realización ilustrativa, el inhibidor de PD-1 o PD-L1, *p. ej.*, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1, se administra en combinación con un inhibidor de LAG-3, *p. ej.*, una molécula de anticuerpo anti-LAG-3. En otra realización ilustrativa, el inhibidor de PD-1 o PD-L1, *p. ej.*, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 o PD-L1, se administra en combinación con un inhibidor de TIM-3, *p. ej.*, una molécula de anticuerpo anti-TIM-3. En aún otra realización, el inhibidor de PD-1 o PD-L1, *p. ej.*, la molécula de anticuerpo anti-PD-1 se administra en combinación con un inhibidor de LAG-3, *p. ej.*, una molécula de anticuerpo anti-LAG-3, y un inhibidor de TIM-3, *p. ej.*, una molécula de anticuerpo anti-TIM-3.

Otras combinaciones de inmunomoduladores con un inhibidor de PD-1 (*p. ej.*, uno o más de PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFR) también están dentro de la presente invención. Cualquiera de las moléculas de anticuerpo conocidas en la técnica o descritas en la presente puede utilizarse en las combinaciones de inhibidores de molécula de punto de control mencionadas anteriormente.

En una realización, el inhibidor de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 elegido entre Nivolumab, Pembrolizumab o Pidilizumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es Nivolumab. Nombres alternativos para Nivolumab incluyen MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 o BMS-936558. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es Nivolumab (Número de registro CAS: 946414-94-4). Nivolumab es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG4 totalmente humano que bloquea de manera específica PD1. nivolumab (clon 5C4) y otros anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD1 se describen en la Patente de EE.UU. N° 8.008.449 y la Publicación PCT N° WO2006/121168.

En otras realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es Pembrolizumab. Pembrolizumab (nombre comercial KEYTRUDA anteriormente Lambrolizumab, también conocido como Merck 3745, MK-3475 o SCH-900475) es un anticuerpo monoclonal IgG4 humanizado que se une a PD1. Pembrolizumab se describe, *p. ej.*, en Hamid, O. et al. (2013) New England Journal of Medicine 369 (2): 134-44, Publicación PCT N° WO2009/114335 y Patente de EE.UU. N° 8.354.509

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es Pidilizumab. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1k humanizado que se une a PD1. Pidilizumab y otros anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humanizados se describen en la publicación PCT N° WO2009/101611. Otros anticuerpos anti-PD1 se describen en

la Patente de EE.UU. N° 8.609.089, la Publicación de EE.UU. N° 2010028330 y/o la Publicación de EE.UU. N° 20120114649. Otros anticuerpos anti-PD1 incluyen AMP 514 (Amplimmune).

5 En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es una inmunoadhesina (p. ej., una inmunoadhesina que comprende una porción extracelular o de unión a PD-1 de PD-L1 o PD-L2 fusionada a una región constante (p. ej., una región Fc de una secuencia de inmunoglobulina). En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-1 es AMP-224.

10 En algunas realizaciones, el inhibidor de PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas realizaciones, el inhibidor anti-PD-L1 se elige de YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736 o MDX 1105MSB-0010718C (al que también se alude como A09-246-2) descrito en, p. ej., el documento WO 2013/0179174, y que tiene una secuencia descrita en este documento (o una secuencia sustancialmente idéntica o similar a la misma, p. ej., una secuencia al menos 85%, 90%, 95% idéntica o superior a la secuencia especificada).

15 En una realización, el inhibidor de PD-L1 es MDX-1105. MDX-1105, también conocido como BMS 936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 descrito en la Publicación PCT N° WO 2007/005874.

En una realización, el inhibidor de PD-L1 es YW243.55.S70. El anticuerpo YW243.55.S70 es un anti-PD-L1 descrito en la Publicación PCT N° WO 2010/077634.

20 En una realización, el inhibidor de PD-L1 es MDPL3280A (Genentech / Roche). MDPL3280A es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 optimizado para Fc humano que se une a PD-L1. MDPL3280A y otros anticuerpos monoclonales humanos contra PD-L1 se divulgan en la Patente de EE. UU. N.º: 7 943 743 y la Publicación de EE. UU. N.º: 20120039906.

25 En otras realizaciones, el inhibidor de PD-L2 es AMP-224. AMP-224 es un receptor soluble de fusión PD-L2 Fc que bloquea la interacción entre PD1 y B7-H1 (B7-DCI; Amplimmune; p. ej., descrito en las Publicaciones PCT N° WO2010/027827 y WO2011/066342).

30 En una realización, el inhibidor LAG-3 es una molécula de anticuerpo anti-LAG-3. En una realización, el inhibidor de LAG-3 es BMS-986016.

35 En aún otra realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con una o más citoquinas, que incluyen interferón IL2, IL15, IL7 or IL21 para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

En aún otra realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más agonistas del receptor STING (estimulador de genes de interferón), p. ej., los compuestos descritos en el documento WO 2014/189805 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

40 En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más inhibidores de la angiogénesis, p. ej., Bevacizumab (Avastin®), axitinib (Inlyta®); Brivanib alaninato (BMS-582664, 2-aminopropanoato de (S)-((R)-1-(4-(4-fluoro-2-metil-1H-indol-5-iloxi)-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-iloxi)propan-2-ilo)); Sorafenib (Nexavar®); Pazopanib (Votrient®); Sunitinib malato (Sutent®); Cediranib (AZD2171, CAS 288383-20-1); Vargatef (BIBF1120, CAS 928326-83-4); Foretinib (GSK1363089); Telatinib (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); Apatinib (YN968D1, CAS 811803-05-1); Imatinib (Gleevec®); Ponatinib (AP24534, CAS 943319-70-8); Tivozanib (AV951, CAS 475108-18-0); Regorafenib (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); Vatalanib dihidrocloruro (PTK787, CAS 212141-51-0); Brivanib (BMS-540215, CAS 649735-46-6); Vandetanib (Caprelsa® o AZD6474); Motesanib difosfato (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-dihidro-3,3-dimetil-1H-indol-6-il)-2-[(4-piridinilmetil)amino]-3-piridinacarboxamida, descrita en la Publicación PCT N° WO 02/066470); Dovitinib ácido diláctico (TKI258, CAS 852433-84-2); Linfanib (ABT869, CAS 796967-16-3); Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1); Lestaurtinib (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-dimetiletil)-2-oxazolil]metil]tio]-2-tiazolil]-4-piperidinacarboxamida (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); N-(3,4-dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[3α,5β,6α]-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8); 4-metil-3-[[1-metil-6-(3-piridinil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il]amino]-N-[3-(trifluorometil)fenil]-benzamida (BHG712, CAS 940310-85-0); o Aflibercept (Eylea®) para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

60 En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más inhibidores de la proteína de choque térmico, p. ej., Tanespimicina (17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina, también conocida como KOS-953 y 17-AAG, disponible from SIGMA, y descrita en la Patente de EE.UU. N° 4.261.989); Retaspimicina (IPI504), Ganetespib (STA-9090); [6-cloro-9-(4-metoxi-3,5-dimetilpiridin-2-ilmetil)-9H-purin-2-il]amina (BIIB021 o CNF2024, CAS 848695-25-0); éster glicina *trans*-4-[[2-(aminocarbonil)-5-[4,5,6,7-tetrahidro-6,6-dimetil-4-oxo-3-(trifluorometil)-1H-indazol-1-il]fenil]amino]ciclohexílico (SNX5422 o PF04929113, CAS 908115-27-5); 5-[2,4-dihidroxi-5-(1-metiletil)fenil]-N-etil-4-[4-(4-morfolinilmetil)fenil]-3-

Isoxazolocarboxamida (AUY922, CAS 747412-49-3); o 17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-DMAG) para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

5 En otra realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más inhibidores de HDAC u otros modificadores epigenéticos. Inhibidores de HDAC ilustrativos incluyen Voninostat (Zolinza®); Romidepsin (Istodax®); Treicostatina A (TSA); Oxamflatin; Vorinostat (Zolinza®, ácido Suberoilanolida hidroxámico; Piroxamida (ácido siberoil-3-aminopiridinamida hidroxámico); Trapoxin A (RF-1023A); Trapoxin B (RF-10238); ciclo[(α S,2S)- α -amino- η -oxo-2-oxiranotanoil-O-metil-D-tirosil-L-isoleucil-L-prolil] (Cyl-1); ciclo[(α S,2S)- α -amino- η -oxo-2-oxiranotanoil-O-metil-D-tirosil-L-isoleucil-(2S)-2-piperidinacarbonilo] (Cyl-2); ciclic[L-alanil-D-alanil-(2S)- η -oxo-L- α -aminooxiranotanoil-D-prolil] (HC-toxina); ciclo[(α S,2S)- α -amino- η -oxo-2-oxiranotanoil-D-fenilalanil-L-leucil-(2S)-2-piperidinacarbonilo] (WF-3161); Clamidocina ((S)-(2-metilalanil-L-fenilalanil-D-prolil- η -oxo-L- α -aminooxiranotanoil) cíclico); Apicidina (ciclo(8-oxo-L-2-aminodecanoil-1-metoxi-L-triptofil-L-isoleucil-D-2-piperidinacarbonil); Romidepsina (Istodax®, FR-901228); 4-fenilbutirato; Espirucostatina A; Milproina (ácido valproico); Entinostat (MS-275, N-(2-aminofenil)-4-[N-(piridina-3-il-metoxicarbonil)-amino-metil]-benzamida); Depudecina (4,5:8,9-dianhidro-1,2,6,7,11-pentadeoxi- D-*treo*-D-*ido*-undeca-1,6-dienitol); 4-(acetilamino)-N-(2-aminofenil)-benzamida (también conocida como CI-994); N1-(2-aminofenil)-N8-fenil-octanodiamida (también conocida como BML-210); 4-(dimetilamino)-N-(7-(hidroximino)-7-oxoheptil)benzamida (también conocida como M344); (E)-3-(4-(((2-(1H-indol-3-il)etil)(2-hidroxietil)amino)-metil)fenil)-N-hidroxiacrilamida; Panobinostat (Farydak®); Mocetinostat y Belinostat (también conocido como PXD101, Beleodaq® o (2E)-N-hidroxi-3-[3-(fenilsulfamoil)fenil]prop-2-enamida), o quidamida (también conocida como CS055 o HBI-8000, (E)-N-(2-amino-5-fluorofenil)-4-((3-(piridin-3-il)acrilamido)metil)benzamida). Otros modificadores epigenéticos incluyen inhibidores de EZH2 (potenciador del homólogo zeste 2), EED (desarrollo de ectodermo embrionario) o LSD1 (histona desmetilasa 1A o KDM1A específica para lisina) para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

25 En aún otra realización, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con uno o más inhibidores de indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa (IDO), por ejemplo, Indoximod (también conocido como NLG-8189), α -ciclohexil-5H-imidazo[5,1-a]isoindol-5-etanol (también conocido como NLG919), o (4E)-4-[(3-cloro-4-fluoroanilino)-nitrosometilideno]-1,2,5-oxadiazol-3-amina (también conocida como INCB024360) para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite.

30 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un conjugado de anticuerpos de la presente invención en combinación con dos o más de cualquiera de los inhibidores, activadores, inmunomoduladores, agonistas o modificadores descritos anteriormente para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, el conjugado de anticuerpos de la presente invención puede utilizarse en combinación con uno o más inhibidores de punto de control y/ o uno o más activadores inmunitarios.

35 Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede ser sometido a extracción quirúrgica de células cancerosas y/o radioterapia.

40 **Composiciones Farmacéuticas**

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen uno o más conjugados de anticuerpos descritos en la presente, siempre que el conjugado de anticuerpos se pueda mezclar con un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 Formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico se pueden preparar mezclando con soportes, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, p. ej., polvos liofilizados, suspensiones espesas, soluciones acuosas, lociones o suspensiones (véase, p. ej., The Pharmacological Basis of Therapeutics, de Hardman et al., Goodman y Gilman, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, y Wilkins, Nueva York, N.Y., 2000; Avis, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, et al. (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner y Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 2000).

55 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpos de la presente invención es una preparación de liofilizado. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpos es un liofilizado en un vial que contiene un conjugado de anticuerpos, histidina, sacarosa y polisorbato 20. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpos es un liofilizado en un vial que contiene un conjugado de anticuerpos, succinato de sodio y polisorbato 20. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpos es un liofilizado en un vial que contiene un conjugado de anticuerpos, trehalosa, citrato y polisorbato 8. El liofilizado puede reconstituirse, p. ej., con agua, solución salina, para inyección. En una realización específica, la solución comprende el conjugado de anticuerpos, histidina, sacarosa y polisorbato 20 a un pH de aproximadamente 5,0. En otra realización específica, la solución comprende el conjugado de anticuerpos, succinato de sodio y polisorbato 20. En otra realización específica, la solución comprende el conjugado de anticuerpos, deshidrato de trehalosa, deshidrato de citrato, ácido cítrico y

polisorbato 8 a un pH de aproximadamente 6,6. Para la administración intravenosa, la solución obtenida generalmente se diluirá adicionalmente en una solución de soporte.

La elección de un régimen de administración con fines terapéuticos depende de varios factores, que incluyen la velocidad de renovación sérica o tisular de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En ciertas realizaciones, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente compatible con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de agente biológico administrado depende en parte de la entidad particular y de la gravedad de la afección que se esté tratando. Se encuentra disponible una guía para seleccionar dosis apropiadas de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas (véase, *p. ej.*, Wawrzynczak, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido, 1996; Kresina (ed.), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y., 1991; Bach (ed.), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y., 1993; Baert et al., *New Engl. J. Med.* 348:601-608, 2003; Milgrom et al., *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973, 1999; Slamon et al., *New Engl. J. Med.* 344:783-792, 2001; Beniaminovitz et al., *New Engl. J. Med.* 342:613-619, 2000; Ghosh et al., *New Engl. J. Med.* 348:24-32, 2003; Lipsky et al., *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602, 2000).

El médico realiza la determinación de la dosis apropiada, *p. ej.*, utilizando parámetros o factores conocidos o sospechosos en la técnica que afectan el tratamiento o que se predice que afectarán el tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y luego se aumenta en pequeños incrementos hasta que se logra el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Medidas de diagnóstico importantes incluyen las de los síntomas, por ejemplo, de la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse con el fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, la sal o la amida de los mismos, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros medicamentos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado de salud general y el historial médico previo del paciente tratado, y como factores conocidos en las artes médicas.

Composiciones que comprenden el conjugado de anticuerpos de la invención pueden proporcionarse por infusión continua, o por dosis a intervalos de, *p. ej.*, un día, una semana o 1-7 veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas o una vez cada ocho semanas. Las dosis se pueden administrar por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosificación específico es uno que involucra la dosis o frecuencia de dosis máximas que evita efectos secundarios no deseables significativos.

Para los conjugados de anticuerpos de la invención, la dosis administrada a un paciente puede ser de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis puede estar entre 0,001 mg/kg y 50 mg/kg, 0,005 mg/kg y 20 mg/kg, 0,01 mg/kg y 20 mg/kg, 0,02 mg/kg y 10 mg/kg, 0,05 y 5 mg/kg, 0,1 mg/kg y 10 mg/kg, 0,1 mg/kg y 8 mg/kg, 0,1 mg/kg y 5 mg/kg, 0,1 mg/kg y 2 mg/kg, 0,1 mg/kg y 1 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis del conjugado de anticuerpos puede calcularse utilizando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis a administrar en mg/kg.

Las dosis de los conjugados de anticuerpos de la invención pueden repetirse y las administraciones pueden estar separadas por menos de 1 día, al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, 4 meses, 5 meses o al menos 6 meses. En algunas realizaciones, un conjugado de anticuerpos de la invención se administra dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, o con menos frecuencia. En una realización específica, las dosis de los conjugados de anticuerpos de la invención se repiten cada 2 semanas.

Una cantidad efectiva para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la condición a tratar, la salud general del paciente, el método, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, *p. ej.*, Maynard et al., *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido, 2001).

La vía de administración puede ser, *p. ej.*, aplicación tópica o cutánea, inyección o infusión por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional o mediante sistemas de liberación sostenida o un implante (véase, *p. ej.*, Sidman et al., *Biopolymers* 22: 547-556, 1983; Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277, 1981; Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105, 1982; Epstein et al., *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030-4034, 1980; Pat. De EE.UU. N° 6.350.466 y 6.316.024). Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante o un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección, o ambos. Además, también se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente aerosolizante. Véase, *p. ej.*, las Pat. de EE.UU. N° 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las Publicaciones PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903.

Ejemplos de ingredientes adicionales de este tipo son bien conocidos en la técnica.

Métodos para la administración conjunta o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, *p. ej.*, una citoquina, un esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación, son conocidos en la técnica (véase, *p. ej.*, Hardman et al., (Eds.) (2001) The Pharmacological Basis of Therapeutics of Goodman y Gilman, 10.^a edición, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Poole y Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila., Pa.; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila., Pa.). Una cantidad eficaz de un agente terapéutico puede disminuir los síntomas en al menos 10%; en al menos 20%; al menos 30%; al menos 40% o al menos 50%.

Terapias adicionales (*p. ej.*, agentes profilácticos o terapéuticos), que pueden administrarse en combinación con los conjugados de anticuerpos de la invención pueden administrarse con menos de 5 minutos de diferencia, menos de 30 minutos de diferencia, 1 hora de diferencia, a aproximadamente 1 hora de diferencia, a aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas de diferencia, a aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, a aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, a aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, a aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, a aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, a aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, a aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, a aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, a aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, a aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, a aproximadamente 12 horas a 18 horas de diferencia, a 18 horas a 24 horas de diferencia, a 24 horas a 36 horas de diferencia, a 36 horas a 48 horas de diferencia, a 48 horas a 52 horas de diferencia, a 52 horas a 60 horas de diferencia, a 60 horas a 72 horas de diferencia, a 72 horas a 84 horas de diferencia, a 84 horas a 96 horas de diferencia o a 96 horas a 120 horas de diferencia de los conjugados de anticuerpos de la invención. Las dos o más terapias se pueden administrar dentro de una misma visita del paciente.

En ciertas realizaciones, los conjugados de anticuerpos de la invención pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Restos de fijación de objetivo ilustrativos incluyen folato o biotina (véase, *p. ej.*, la Patente de EE.UU. N° 5.416.016 expedida a Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); receptor de Proteína A tensorioactivo (Briscoe et al., (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p 120 (Schreier et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

La invención proporciona protocolos para la administración de composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de anticuerpos de la invención, solos o en combinación con otras terapias a un sujeto que lo necesite. Las terapias (*p. ej.*, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias combinadas de la presente invención pueden administrarse de forma concomitante o secuencial a un sujeto. La terapia (*p. ej.*, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias combinadas de la presente invención pueden administrarse también de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (*p. ej.*, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo, seguida de la administración de una segunda terapia (*p. ej.*, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un período de tiempo y repetir esta administración secuencial, *es decir*, el ciclo, con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias (*p. ej.*, agentes) para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (*p. ej.*, agentes), y/o mejorar la eficacia de las terapias.

Las terapias (*p. ej.*, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias combinadas de la invención pueden administrarse de forma simultánea a un sujeto.

El término "simultánea" no se limita a la administración de terapias (*p. ej.*, agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente al mismo tiempo, sino que significa que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos se administra a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tal que los anticuerpos o conjugados de anticuerpos de la invención pueden actuar junto con la o las otras terapias para proporcionar un beneficio incrementado que si se administraran de otra manera. Por ejemplo, cada terapia se puede administrar a un sujeto al mismo tiempo o de forma secuencial en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente próximas en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia se puede administrar a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En diversas realizaciones, las terapias (*p. ej.*, agentes

profilácticos o terapéuticos), se administran a un sujeto con menos de 5 minutos de diferencia, menos de 15 minutos de diferencia, menos de 30 minutos de diferencia, menos de 1 hora de diferencia, a aproximadamente 1 hora de diferencia, a aproximadamente 2 horas de diferencia, a aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, a aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, a aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, a aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, a aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, a aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, a aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, a aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, a aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, a aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, a aproximadamente 24 horas de diferencia, a aproximadamente 48 horas de diferencia, a aproximadamente 72 horas de diferencia o a 1 semana de diferencia. En otras realizaciones, se administran dos o más terapias (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos) dentro de la misma visita del paciente.

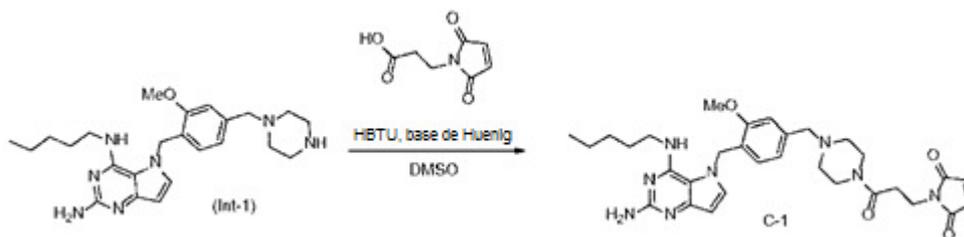
Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias combinadas se pueden administrar a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias combinadas se pueden administrar simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas diferentes. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto por las mismas vías de administración o diferentes.

EJEMPLOS

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

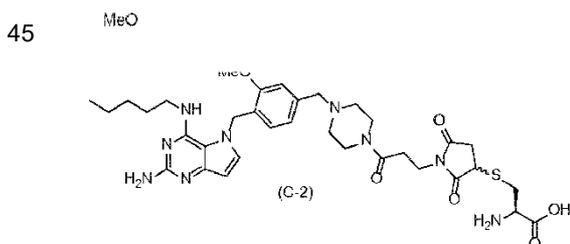
Síntesis de 1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-1)



Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), HBTU (1,2 equiv.), base de Huenig' (3,0 equiv.), ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico (1,2 equiv.) y DMSO (0,1 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y después la mezcla de reacción bruta se purificó por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar 1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-1) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,35 (d, 1H), 7,12 (d, 1H), 6,86 (d, 1H), 6,72 (s, 2H), 6,69 (d, 1H), 6,40 (s, 1H), 5,46 (t, 1H), 5,33 (s, 2H), 4,16 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,82 (m, 6H), 3,40 (m, 4H), 3,21 (m, 2H), 2,67 (m, 4H), 1,39 (m, 2H), 1,26 (m, 2H), 1,14 (m, 2H), 0,86 (t, 3H). LRMS [M+H] = 589,3.

Ejemplo 2

Síntesis de ácido (2R)-2-amino-3-((1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-2,5-dioxopirrolidin-3-il)tio)propanoico (C-2)

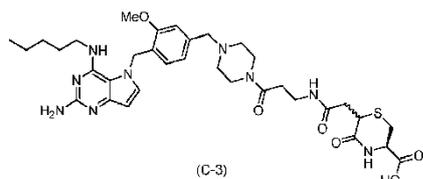


Un matraz de fondo redondo se cargó con 1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-1, 1,0 equiv.) y se disolvió en tampón ACN-PBS (1:2, 0,02 M). A esta mezcla se añadió L-cisteína (2,0 equiv.) disuelta en tampón DPBS (0,07 M). La mezcla de reacción

se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar ácido (2R)-2-amino-3-((1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-2,5-dioxopirrolidin-3-il)tio)propanoico (C-2) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA de una mezcla de diastereoisómeros: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,36 (d, 1H), 7,28 (d, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,81 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,26 (m, 2H), 4,02 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,78 (m, 6H), 3,55 (m, 2H), 3,44 (m, 1H), 3,23 (m, 3H), 3,12 (m, 2H), 2,76 (m, 2H), 2,53 (m, 1H), 1,53 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 710,3.

Ejemplo 3

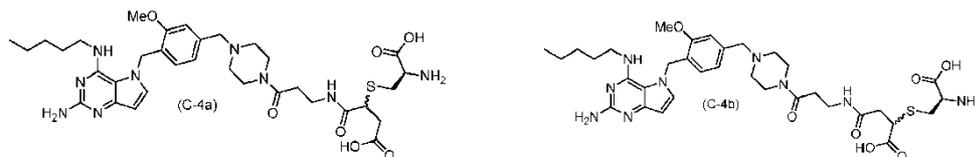
Síntesis de ácido (6R)-6-(2-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-2-oxoetil)-5-oxotiomorfolina-3-carboxílico (C-3)



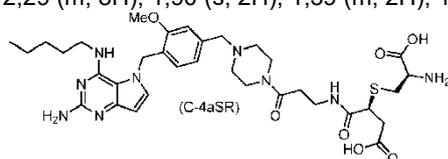
Un matraz de fondo redondo se cargó con ácido (2R)-2-amino-3-((1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-2,5-dioxopirrolidin-3-il)tio)propanoico (C-1) y se disolvió en tampón PBS (pH 7,5, fosfato 100 mM con EDTA 5 nM) y acetonitrilo (1:1, 0,012 M). La mezcla de reacción se agitó luego a 40 °C durante 6 horas. En este punto se dejó que la mezcla de reacción bruta enfriara a temperatura ambiente y se purificó por RP-HPLC (NH₄OAc 0,5 M en ACN:NH₄OAc 10 mM en H₂O, columna C18 para proporcionar ácido (6R)-6-(2-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-2-oxoetil)-5-oxotiomorfolina-3-carboxílico (C-3) en forma de un sólido en forma de una mezcla de regioisómeros y diastereoisómeros. ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,38 (d, 1H), 7,13 (s, 1H), 6,94 (d, 1H), 6,74 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,52 (s, 2H), 4,24 (m, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,82 (m, 1H), 3,67 (s, 2H), 3,60 (m, 4H), 3,54 (t, 2H), 3,43 (m, 2H), 3,18 (m, 1H), 3,01 (m, 1H), 2,87 (m, 1H), 2,58 (m, 7H), 1,50 (m, 2H), 1,29 (m, 2H), 1,17 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 710,4.

Ejemplo 4

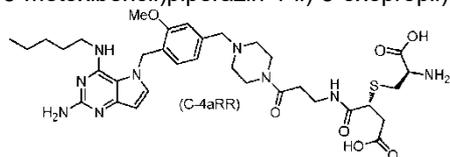
Síntesis de ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-4a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-4b)



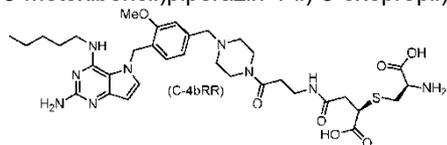
Un matraz de fondo redondo se cargó con 1-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-1, 1,0 equiv.), L-cisteína (1,0 equiv.) y PBS:MeCN (2:1, 0,008 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se añadió NaOH 1 M (20,0 equiv.) a la mezcla de reacción. Después, la reacción se agitó durante 3 horas adicionales, luego la mezcla de reacción bruta se purificó por RP-HPLC (NH₄OAc 0,5 mM en MeCN:NH₄OAc 10 mM en H₂O, columna C18) para proporcionar una mezcla de ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-4a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-4b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-4aSR), C-4aRR), (C-4bRR) y (C-4bRR) que figuran a continuación) en forma de un sólido: ¹H RMN (DMSO): δ 7,88 (s, 1), 7,26 (s, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,77 (d, 1H), 6,64 (s, 1H), 6,46 (s, 1H), 6,01 (s, 1H), 5,40 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,36 (m, 17H), 2,29 (m, 8H), 1,90 (s, 2H), 1,39 (m, 2H), 1,21 (m, 2H), 1,09 (m, 2H), 0,81 (t, 3H). LRMS [M+H] = 728,4.



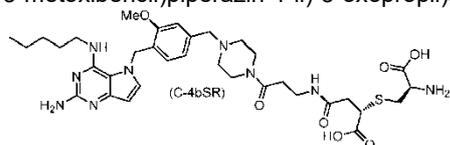
Ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;(C-4aSR);



5 ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-4aRR);



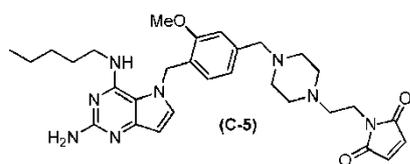
ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-4bRR);



10 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico;(C-4bSR).

Ejemplo 5

15 **Síntesis de 1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-5)**

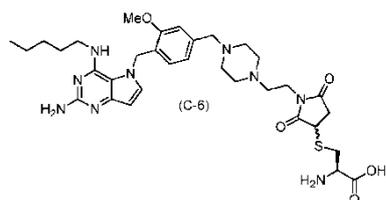


20 Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetaldehído (4,0 equiv.), cianoborohidruro de sodio (13,0 equiv.) y MeOH (0,04 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y la mezcla de reacción bruta se purificó después por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar 1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-5) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,32 (d, 1H), 7,12 (d, 1H), 6,87 (d, 1H), 6,72 (s, 2H), 6,70 (d, 1H), 6,41 (d, 1H), 5,45 (t, 1H), 5,31 (s, 2H), 4,07 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,73 (t, 2H), 3,40 (m, 4H), 3,17 (m, 6H), 2,89 (m, 4H), 1,39 (m, 2H), 1,26 (m, 2H), 1,14 (m, 2H), 0,86 (t, 3H). LRMS [M+H] = 561,3.

30 Nota: 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetaldehído se preparó añadiendo 1-(2-hidroxietil)-1H-pirrol-2,5-diona (1,0 equiv.), peryodinato de Dess-Martin (1,5 equiv.) y DCM (0,1 M) a un matraz de fondo redondo y agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró, los componentes volátiles se separaron en vacío y el producto se utilizó sin purificación adicional.

35 Ejemplo 6

Síntesis de ácido (2S)-2-amino-3-((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-2,5-dioxopirrolidin-3-il)tio)propanoico (C-6)



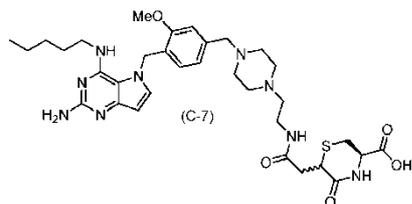
40

Ácido (2S)-2-amino-3-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-2,5-dioxopirrolidin-3-il)tio)propanoico (C-6) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 2, excepto porque se utilizó el Compuesto (C-5) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar ácido

(2S)-2-amino-3-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-2,5-dioxopirrolidin-3-il)tio)propanoico (C-6) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA de una mezcla de diastereoisómeros: $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 7,36 (d, 1H), 7,21 (m, 1H), 7,02 (m, 1H), 6,78 (m, 1H), 6,23 (d, 1H), 5,56 (m, 2H), 4,21 (m, 1H), 4,09 (s, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,95 (m, 3H), 3,75 (m, 2H), 3,54 (t, 2H), 3,43 (m, 1H), 3,34 (m, 1H), 3,22 (m, 2H), 3,03 (m, 6H), 2,84 (m, 2H), 2,63 (m, 1H), 1,52 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,18 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS $[\text{M}+\text{H}] = 682,4$.

Ejemplo 7

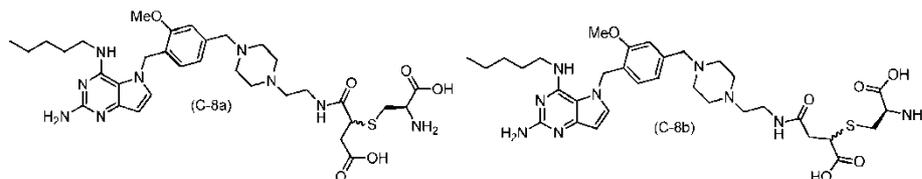
Síntesis de ácido (6R)-6-(2-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-2-oxoetil)-5-oxotiomorfolina-3-carboxílico (C-7)



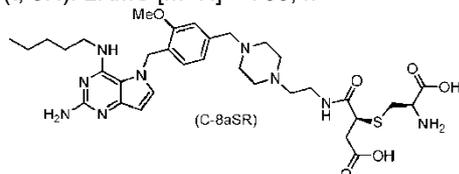
Ácido (6R)-6-(2-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-2-oxoetil)-5-oxotiomorfolina-3-carboxílico (C-7) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 3, excepto porque se utilizó el Compuesto (C-5) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar ácido (6R)-6-(2-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-2-oxoetil)-5-oxotiomorfolina-3-carboxílico (C-7) en forma de un sólido en forma de una mezcla de regioisómeros y diastereoisómeros: $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 7,37 (d, 1H), 7,10 (s, 1H), 6,91 (d, 1H), 6,72 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,51 (s, 2H), 4,13 (m, 1H), 3,92 (s, 3H), 3,88 (m, 1H), 3,58 (s, 2H), 3,52 (t, 2H), 3,40 (m, 2H), 3,16 (m, 1H), 2,99 (m, 1H), 2,86 (m, 1H), 2,67 (m, 10H), 1,49 (m, 2H), 1,29 (m, 2H), 1,17 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS $[\text{M}+\text{H}] = 682,3$.

Ejemplo 8

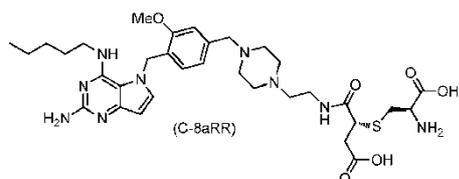
Síntesis de ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-8a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-8b)



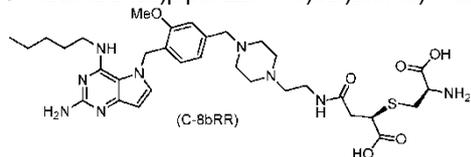
Ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-8a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-8b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-5) en lugar del Compuesto (C-1), para dar una mezcla de Compuestos (C-8a) y (C-8b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-8aSR), C-8aRR), (C-8bRR) y (C-8bRR) que figuran a continuación), en forma de un sólido: $^1\text{H RMN}$ (DMSO): δ 7,81 (s, 1), 7,33 (s, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,76 (d, 1H), 6,69 (s, 1H), 6,48 (s, 1H), 6,10 (s, 1H), 5,45 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 3,37 (m, 17H), 2,35 (m, 8H), 1,90 (s, 2H), 1,41 (m, 2H), 1,20 (m, 2H), 1,08 (m, 2H), 0,80 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 700,4$.



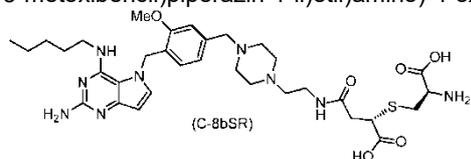
Ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico; (C-8aSR);



ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-8aRR);



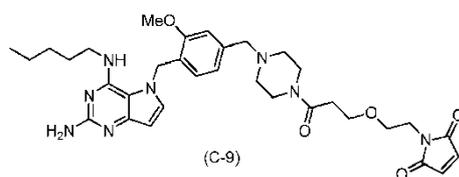
5 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-8bRR);



10 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico;(C-8bSR).

Ejemplo 9

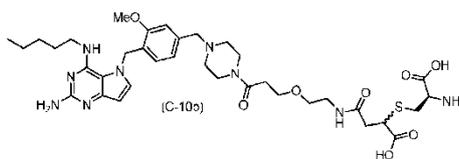
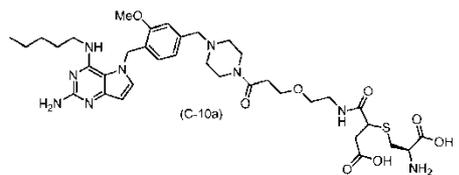
15 **Síntesis de 1-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-9)**



20 1-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-9) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoico en lugar de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico, para proporcionar 1-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-9) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,37 (d, 1H), 7,27 (d, 1H), 7,06 (d, 1H), 6,82 (s, 2H), 6,81 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,58 (s, 2H), 4,38 (s, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,86 (m, 4H), 3,67 (m, 4H), 3,56 (m, 4H), 3,24 (m, 4H), 2,61 (t, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 1,20 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 633,3.

Ejemplo 10

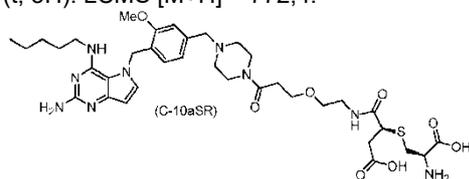
30 **Síntesis de ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-10a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-10b)**



35 Ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-10a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-10b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-9) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de

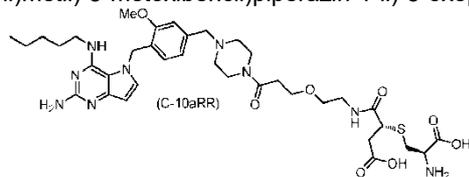
Compuestos (C-10a) y (C-10b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-10aSR), C-10aRR), (C-10bRR) y (C-10bRR) que figuran a continuación), en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. La mezcla de reacción bruta se purificó mediante RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18): ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,35 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,77 (m, 1H), 6,23 (s, 1H), 5,56 (s, 2H), 4,32 (m, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,86 (m, 3H), 3,72 (m, 3H), 3,54 (m, 10H), 3,21 (m, 4H), 2,67 (m, 4H), 1,52 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 772,4.

5



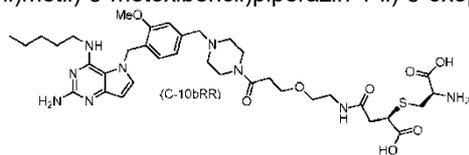
Ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-10aSR);

10

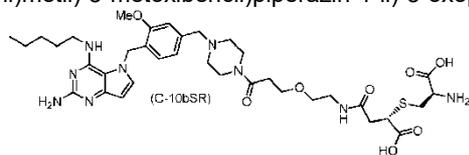


ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-10aRR);

15



ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-10bRR);

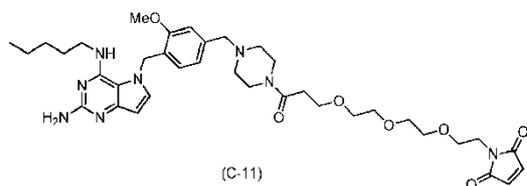


ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-10bSR).

20 Ejemplo 11

Síntesis de 1-(2-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-11)

25



30

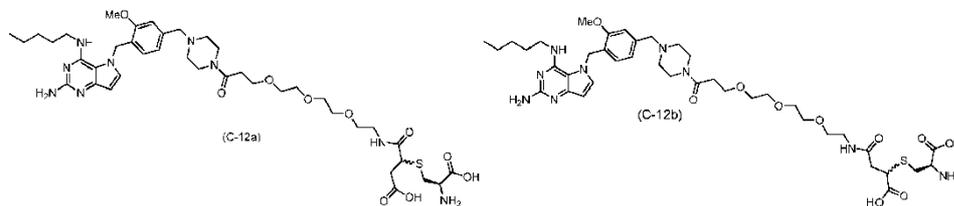
1-(2-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-11) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)propanoico en lugar de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico para proporcionar 1-(2-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-11) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,37 (d, 1H), 7,26 (d, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,82 (d, 1H), 6,80 (s, 2H), 6,24 (d, 1H), 5,58 (s, 2H), 4,32 (s, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,74 (t, 2H), 3,64 (m, 2H), 3,58 (m, 12H), 3,64 (m, 4H), 3,20 (m, 4H), 2,68 (m, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,32 (m, 2H), 1,20 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 721,4.

35

Ejemplo 12

Síntesis de ácido (2R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,19-dioxo-10,13,16-trioxa-4-tia-7-azanonadecan-1-oico (C-12a) y ácido (19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,14-dioxo-4,7,10-trioxa-17-tia-13-azaicosan-20-oico (C-12b)

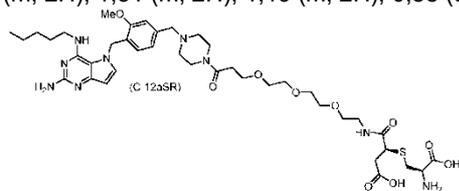
5



Ácido (2R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,19-dioxo-10,13,16-trioxa-4-tia-7-azanonadecan-1-oico (C-12a) y ácido (19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,14-dioxo-4,7,10-trioxa-17-tia-13-azaicosan-20-oico (C-12b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-11) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de Compuestos (C-12a) y (C-12b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-12aSR), C-12aRR), (C-12bRR) y (C-12bSR) que figuran a continuación), en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. La mezcla de reacción bruta se purificó mediante RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18): ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,36 (d, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,06 (d, 1H), 6,79 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,34 (s, 2H), 4,23 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,86 (m, 4H), 3,76 (m, 4H), 3,58 (m, 14H), 3,27 (m, 4H), 3,22 (m, 2H), 2,84 (m, 1H), 2,71 (m, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 860,4.

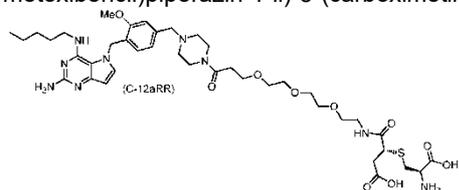
10

15



20

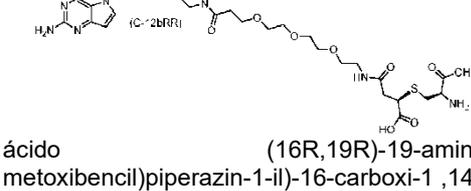
Ácido (2R,5S)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,19-dioxo-10,13,16-trioxa-4-tia-7-azanonadecan-1-oico (C-12aSR);



ácido (2R,5R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,19-dioxo-10,13,16-trioxa-4-tia-7-azanonadecan-1-oico (C-12aRR);

25

ácido (16R,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,14-dioxo-4,7,10-trioxa-17-tia-13-azaicosan-20-oico (C-12bRR);



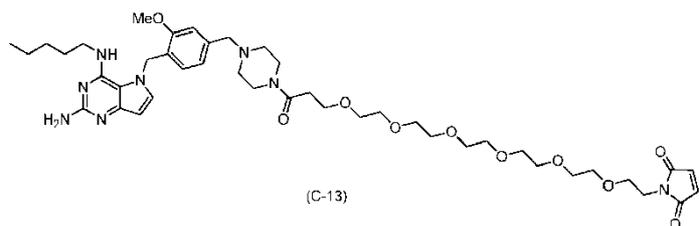
30

ácido (16S,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,14-dioxo-4,7,10-trioxa-17-tia-13-azaicosan-20-oico (C-12bSR).

Ejemplo 13

Síntesis de 1-(21-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-13)

35

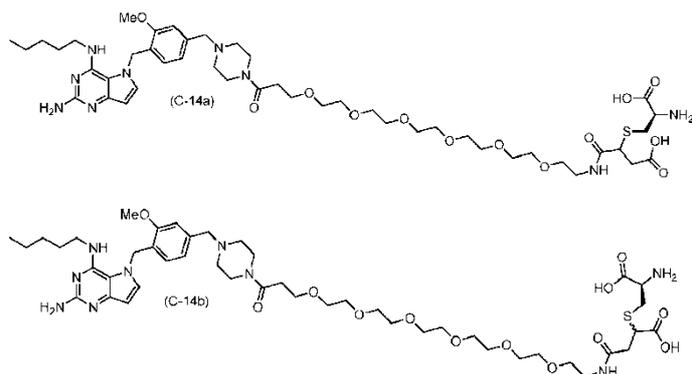


5 1-(21-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-13) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oico en lugar de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico para proporcionar 1-(21-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-13) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ^1H RMN (CD_3OD): δ 7,38 (d, 1H), 7,27 (d, 1H), 7,07 (d, 1H), 6,84 (d, 1H), 6,82 (s, 2H), 6,25 (d, 1H), 5,59 (s, 2H), 4,36 (s, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,65 (m, 32H), 3,20 (m, 4H), 2,71 (m, 2H), 1,55 (m, 2H), 1,32 (m, 2H), 1,21 (m, 2H), 0,89 (t, 3H). LCMS $[\text{M}+\text{H}] = 853,5$.

Ejemplo 14

15 **Síntesis de ácido (2R)-2-amino-28-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,28-dioxo-10,13,16,19,22,25-hexaoxa-4-tia-7-azaoctacosan-1-oico (C-14a) y ácido (28R)-28-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-25-carboxi-1,23-dioxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-26-tia-22-azanonacosan-29-oico (C-14b)**

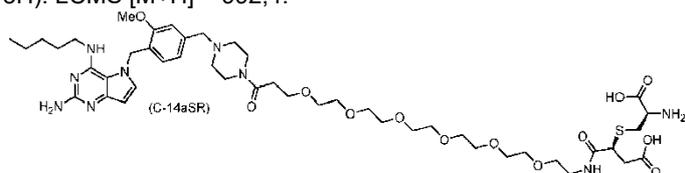
20



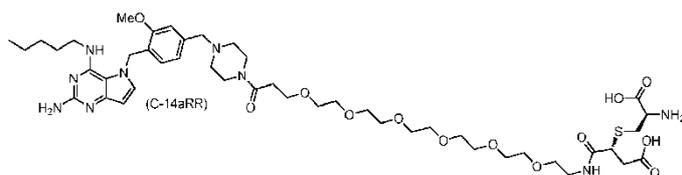
25 Ácido (2R)-2-amino-28-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,28-dioxo-10,13,16,19,22,25-hexaoxa-4-tia-7-azaoctacosan-1-oico (C-14a) y ácido (28R)-28-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-25-carboxi-1,23-dioxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-26-tia-22-azanonacosan-29-oico (C-14b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-13) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de Compuestos (C-14a) y (C-14b), en forma de sus diastereoisómeros respectivos (Compuestos (C-14aSR), (C-14aRR), (C-14bRR) y (C-14bSR) que figuran a continuación), en forma de un sólido en forma de la sal HCl (después de la purificación por RP-HPLC, el producto se disolvió en acetonitrilo, se trató con exceso de HCl 2 N, y luego se liofilizó): ^1H RMN (CD_3OD): δ 7,47 (s, 1H), 7,39 (d, 1H), 7,13 (d, 1H), 6,82 (d, 1H), 6,25 (d, 1H), 5,58 (s, 2H), 4,38 (s, 2H), 4,32 (m, 1H), 4,00 (s, 3H), 3,77 (m, 4H), 3,76 (m, 4H), 3,64 (m, 28H), 3,55 (m, 5H), 3,31 (m, 4H), 3,12 (m, 1H), 2,86 (m, 1H), 2,72 (s, 2H), 2,62 (m, 1H), 1,54 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 1,20 (m, 2H), 0,89 (t, 3H). LCMS $[\text{M}+\text{H}] = 992,4$.

30

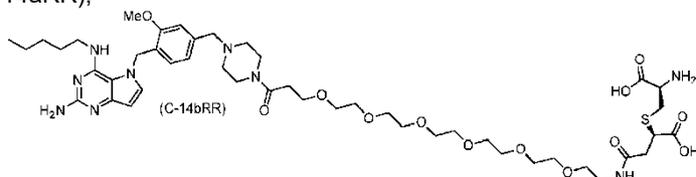
35



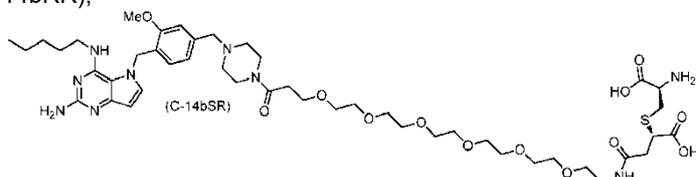
40 **Ácido (2R,5S)-2-amino-28-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,28-dioxo-10,13,16,19,22,25-hexaoxa-4-tia-7-azaoctacosan-1-oico (C-14aSR);**



ácido (2R,5R)-2-amino-28-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,28-dioxo-10,13,16,19,22,25-hexaoxa-4-tia-7-azaoctacosan-1-oico (C-14aRR);



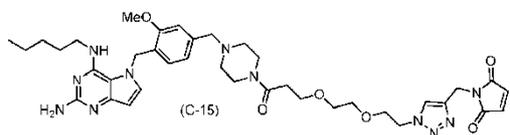
5 ácido (25R,28R)-28-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-25-carboxi-1,23-dioxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-26-tia-22-azanonacosan-29-oico (C-14bRR);



10 ácido (25S,28R)-28-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-25-carboxi-1,23-dioxo-4,7,10,13,16,19-hexaoxa-26-tia-22-azanonacosan-29-oico (C-14bSR).

Ejemplo 15

15 **Síntesis de 1-((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-15)**



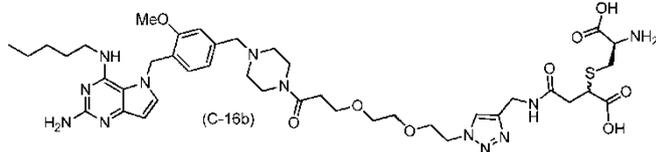
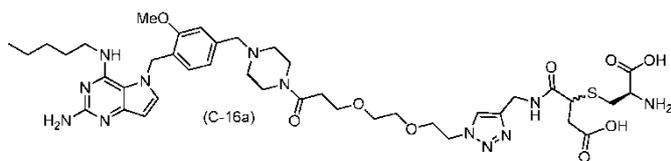
20 Etapa 1: 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)propan-1-ona se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 3-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)propanoico en lugar de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico.

25 Etapa 2: Un matraz de fondo redondo se cargó con 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)propan-1-ona (1,0 equiv.), CuSO₄ (0,25 equiv.), sal de sodio del ácido L-ascórbico (1,1 equiv.), 1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrol-2,5-diona (2,2 equiv.) y una mezcla de t-BuOH/agua (1:1, v/v, 0,012 M). La mezcla de reacción se colocó bajo vacío y posteriormente se lavó abundantemente con N₂ (esto se repitió cuatro veces más). La mezcla de reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 30 2 horas y la mezcla de reacción bruta se purificó por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar 1-((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-15) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,94 (s, 1H), 7,37 (d, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,85 (s, 2H), 6,81 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,73 (s, 2H), 4,52 (t, 2H), 4,36 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,85 (t, 2H), 3,84 (m, 4H), 3,66 (t, 2H), 3,54 (m, 6H), 3,27 (m, 4H), 2,63 (t, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 758,4.

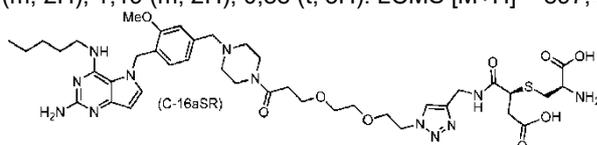
Ejemplo 16

40 **Síntesis de ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-16a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-16b)**

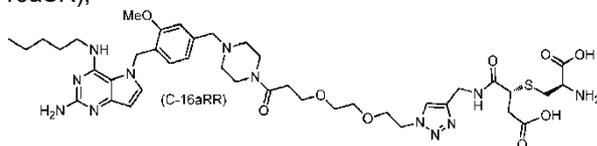
45



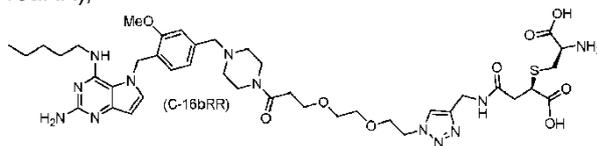
- 5 Ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-16a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-16b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el
- 10 Compuesto (C-15) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de Compuestos (C-16a) y (C-16b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-16aSR), (C-16aRR), (C-16bRR) y (C-16bSR) que figuran más adelante), en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. La mezcla de reacción bruta se purificó mediante RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18): ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,91 (s, 1H), 7,36 (d, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,06 (d, 1H), 6,80 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,54 (s, 2H), 4,44 (m, 2H), 4,34 (s, 2H), 4,25 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 4,83 (m, 6H), 3,68 (t, 2H), 3,55 (m, 6H), 3,25 (m, 2H), 2,86 (m, 1H), 2,64 (m, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 897,4



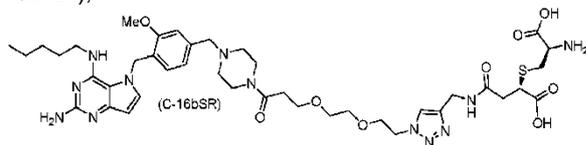
- 20 Ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-16aSR);



- ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-16aRR);



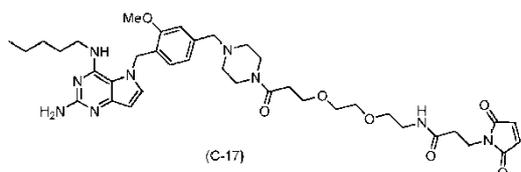
- 25 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-16bRR);



- 30 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-16bSR).

Ejemplo 17

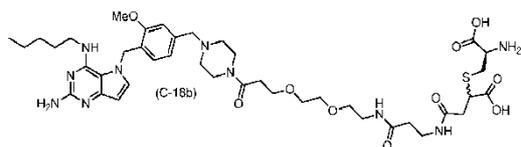
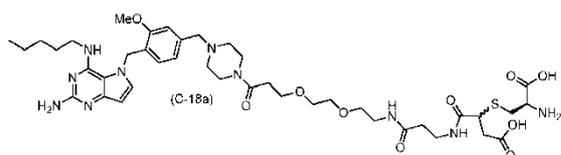
- 35 Síntesis de N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida (C-17)



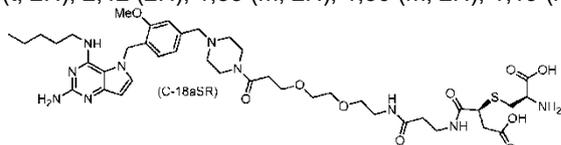
N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida (C-17) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 3-(2-(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)etoxi)etoxi)propanoico en lugar de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico para proporcionar N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida (C-17) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ^1H RMN (CD_3OD): δ 7,37 (d, 1H), 7,28 (d, 1H), 7,06 (d, 1H), 6,82 (d, 1H), 6,80 (s, 2H), 6,24 (d, 1H), 5,58 (s, 2H), 4,37 (s, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,84 (m, 4H), 3,40 (m, 4H), 3,56 (m, 6H), 3,48 (t, 2H), 3,20 (m, 6H), 2,69 (t, 2H), 2,45 (t, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS $[\text{M}+\text{H}] = 748,4$.

Ejemplo 18

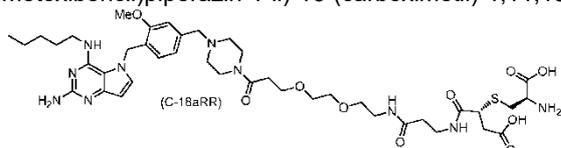
Síntesis de ácido (19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-(carboximetil)-1,11,15-trioxo-4,7-dioxa-17-tia-10,14-diazaicosan-20-oico (C-18a) y ácido (20R)-20-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-17-carboxi-1,11,15-trioxo-4,7-dioxa-18-tia-10,14-diazahenicosan-21-oico (C-18b)



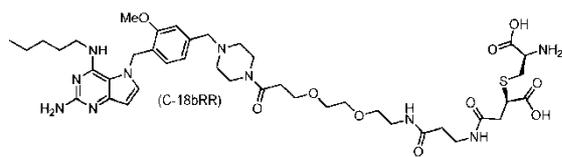
Ácido (19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-(carboximetil)-1,11,15-trioxo-4,7-dioxa-17-tia-10,14-diazaicosan-20-oico (C-18a) y ácido (20R)-20-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-17-carboxi-1,11,15-trioxo-4,7-dioxa-18-tia-10,14-diazahenicosan-21-oico (C-18b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-17) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de Compuestos (C-18a) y (C-18b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-18aSR), (C-18aRR), (C-18bRR) y (C-18bSR) que figuran más adelante), en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. La mezcla de reacción bruta se purificó mediante RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H_2O , columna C18): ^1H RMN (CD_3OD): δ 7,37 (d, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,07 (d, 1H), 6,80 (d, 1H), 6,25 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,35 (s, 2H), 4,19 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,76 (m, 3H), 3,60 (s, 4H), 3,53 (m, 4H), 3,41 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,22 (s, 2H), 2,70 (t, 2H), 2,42 (2H), 1,53 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS $[\text{M}+\text{H}] = 887,4$.



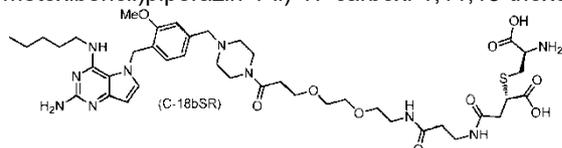
Ácido (16S,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-(carboximetil)-1,11,15-trioxo-4,7-dioxa-17-tia-10,14-diazaicosan-20-oico (C-18aSR);



ácido (16R,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-(carboximetil)-1,11,15-trioxo-4,7-dioxa-17-tia-10,14-diazaicosan-20-oico (C-18aRR);



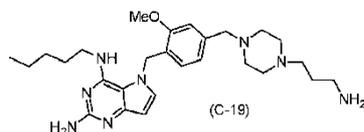
ácido (17R,20R)-20-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-17-carboxi-1,11,15-trioxo-4,7-dioxa-18-tia-10,14-diazahenicosan-21-oico (C-18bRR);



5 ácido (17S,20R)-20-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-17-carboxi-1,11,15-trioxo-4,7-dioxa-18-tia-10,14-diazahenicosan-21-oico (C-18bSR).

Ejemplo 19

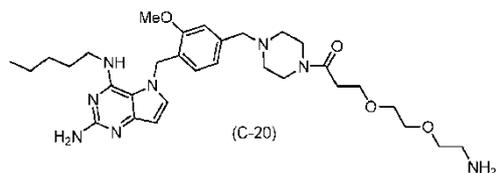
10 **Síntesis de 5-(4-((4-(3-aminopropil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrol[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (C-19)**



15 5-(4-((4-(3-aminopropil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrol[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (C-19) se preparó en una secuencia de dos etapas. En la primera etapa, un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-il)metil)encil)-N4-pentil-5H-pirrol[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), (3-bromopropil)carbamato de terc.-butilo (1,2 equiv.), base de Huenig (2,4 equiv.), y DMF (0,2 M). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C y luego se agitó durante 18 horas. La mezcla de reacción bruta se enfrió luego a temperatura ambiente y se purificó por cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 20%:DCM) para proporcionar (3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)carbamato de terc.-butilo. En la segunda etapa, se utilizó un procedimiento similar a la última etapa en la síntesis de (Int-1) para obtener 5-(4-((4-(3-aminopropil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrol[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (C-19) en forma de un sólido: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,24 (d, 1H), 7,10 (d, 1H), 6,85 (d, 1H), 6,57 (d, 1H), 6,11 (s, 1H), 5,42 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,52 (s, 2H), 3,35 (m, 2H), 2,80 (t, 2H), 2,51 (m, 4H), 2,45 (m, 4H), 1,72 (m, 2H), 1,40 (m, 2H), 1,28 (m, 4H), 1,15 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H] = 495,3.

Ejemplo 20

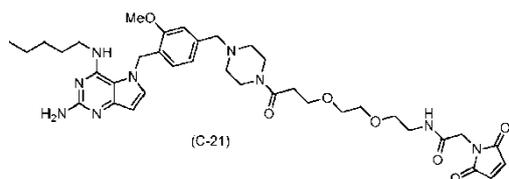
30 **Síntesis de 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-i)-3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona (C-20)**



35 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-i)-3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona (C-20) se preparó siguiendo un procedimiento del Ejemplo 19, excepto que se utilizó ácido 2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatetradecan-14-oico en lugar de (3-bromopropil)carbamato de terc.-butilo para proporcionar 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-i)-3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona (C-20) en forma de un sólido: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,24 (d, 1H), 7,11 (s, 1H), 6,86 (d, 1H), 6,57 (d, 1H), 6,12 (d, 1H), 5,42 (s, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,76 (t, 2H), 3,59 (m, 12H), 3,37 (t, 2H), 2,76 (t, 2H), 2,66 (t, 2H), 2,45 (m, 4H), 1,41 (m, 2H), 1,28 (m, 2H), 1,16 (m, 2H), 0,89 (t, 3H). LRMS [M+H] = 597,4.

Ejemplo 21

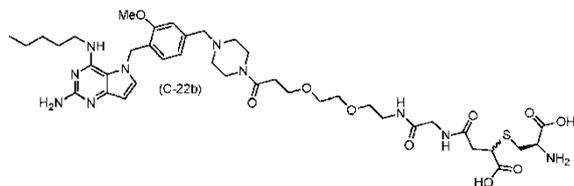
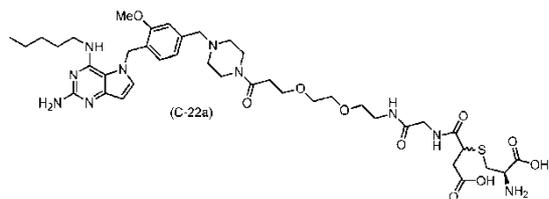
45 **Síntesis de N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida (C-21)**



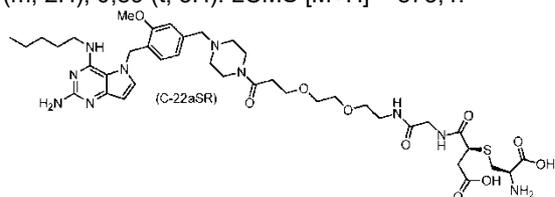
Un matraz de fondo redondo se cargó con 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirroló[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona (C-20) (1,0 equiv.), DIEA (10,0 equiv.) y DMF (0,004 M) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se cargó un matraz separado con 2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetato de 2,5-dioxopiperidin-1-ilo (1,5 equiv.), DIEA (10,0 equiv.) y DMF (0,006 M). Esta mezcla también se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego las dos soluciones se mezclaron y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se purificó por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirroló[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetamida (C-21) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃CN): δ 7,30 (d, 1H), 7,05 (s, 1H), 6,98 (s, 1H), 6,86 (d, 1H), 6,82 (s, 2H), 6,74 (s, 1H), 6,68 (d, 1H), 6,21 (d, 1H), 6,08 (t, 1H), 5,38 (s, 2H), 4,08 (s, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,70 (t, 2H), 3,41 (m, 14H), 3,29 (m, 2H), 2,55 (t, 2H), 2,38 (m, 4H), 1,41 (m, 2H), 1,26 (m, 2H), 1,13 (m, 2H), 0,85 (t, 3H). LCMS [M+H] = 734,4.

Ejemplo 22

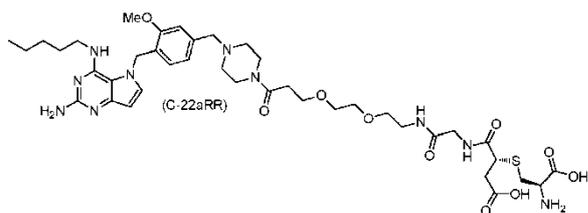
Síntesis de ácido (2R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirroló[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,9,19-trioxo-13,16-dioxa-4-tia-7,10-diazanonadecan-1-oico (C-22a) y ácido (19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirroló[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,11,14-trioxo-4,7-dioxa-17-tia-10,13-diazaicosan-20-oico (C-22b)



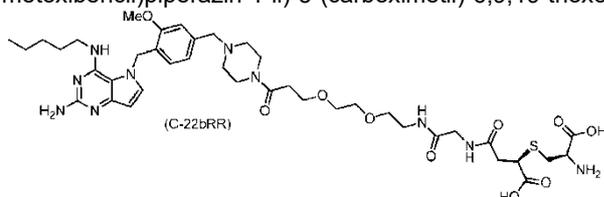
Ácido (2R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirroló[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,9,19-trioxo-13,16-dioxa-4-tia-7,10-diazanonadecan-1-oico (C-22a) y ácido (19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirroló[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,11,14-trioxo-4,7-dioxa-17-tia-10,13-diazaicosan-20-oico (C-22b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-21) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de Compuestos (C-22a) y (C-22b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-22aSR), (C-22aRR), (C-22bRR) y (C-22bSR) que figuran más adelante), en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. La mezcla de reacción bruta se purificó por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18): ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,37 (d, 1H), 7,32 (s, 1H), 7,08 (d, 1H), 6,81 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,34 (s, 2H), 4,20 (m, 1H), 3,96 (s, 3H), 3,82 (m, 9H), 3,56 (m, 9H), 3,38 (m, 3H), 3,21 (m, 2H), 2,70 (t, 2H), 1,54 (m, 2H), 1,32 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,89 (t, 3H). LCMS [M+H] = 873,4.



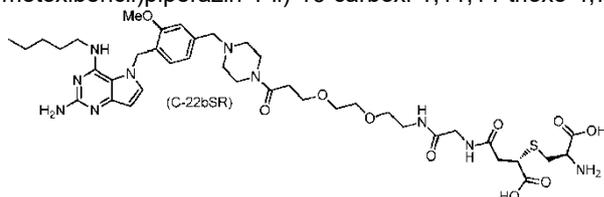
Ácido (2R,5S)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirroló[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,9,19-trioxo-13,16-dioxa-4-tia-7,10-diazanonadecan-1-oico (C-22aSR);



ácido (2R,5R)-2-amino-19-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-(carboximetil)-6,9,19-trioxo-13,16-dioxa-4-tia-7,10-diazanonadecan-1-oico (C-22aRR);



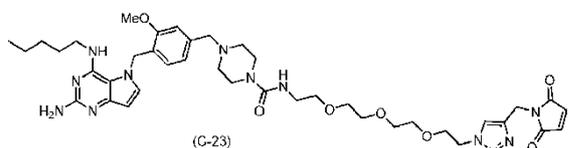
5 ácido (16R,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,11,14-trioxo-4,7-dioxa-17-tia-10,13-diazaicosan-20-oico (C-22bRR);



10 ácido (16R,19R)-19-amino-1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-16-carboxi-1,11,14-trioxo-4,7-dioxa-17-tia-10,13-diazaicosan-20-oico (C-22bSR).

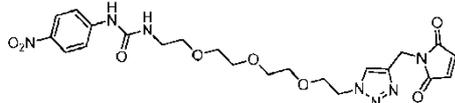
Ejemplo 23

15 **Síntesis de 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)-N-(2-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazina-1-carboxamida (C-23)**



20 Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrol[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1 equiv.), (2-(2-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de 4-nitrofenilo (0,9 equiv.), trietilamina (3,0 equiv.) y DMSO (0,01 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y la mezcla de reacción bruta se purificó por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)-N-(2-(2-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)piperazina-1-carboxamida (C-23) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,96 (s, 1H), 7,36 (d, 1H), 7,26 (d, 1H), 7,05 (d, 1H), 6,85 (s, 2H), 6,79 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,74 (s, 2H), 4,53 (t, 2H), 4,35 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,86 (t, 2H), 3,85 (m, 4H), 3,54 (m, 12H), 3,22 (m, 6H), 1,53 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 817,4.

25 Nota: (2-(2-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de 4-nitrofenilo



30 se preparó utilizando el siguiente procedimiento:

35 Etapa 1: Trietilamina (2,5 equiv.) y dicarbonato de di-terc.-butilo (1,1 equiv.) se añadieron a una solución de 2-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etanamina (1,0 equiv.) en CH₂Cl₂ (0,05 M) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró entonces en vacío y el residuo se purificó utilizando RP-C18 ISCO y luego se liofilizó para dar (2-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de terc.-butilo.

Etapa 2: Una solución de (2-(2-(2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de terc.-butilo (1 equiv.) y 1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrol-2,5-diona (2,0 equiv.) en *t*-BuOH (0,08 M) se lavó abundantemente con gas N₂ cinco veces y luego se

añadieron sal de sodio del ácido L-ascórbico (1,0 equiv. 0,16 M en H₂O) y CuSO₄ (0,2 equiv. 0,03 M en H₂O). La mezcla de reacción se lavó abundantemente de nuevo con gas N₂ cinco veces y después se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se purificó luego por ISCO RP-C18 y se liofilizó para proporcionar (2-(2-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de terc.-butilo.

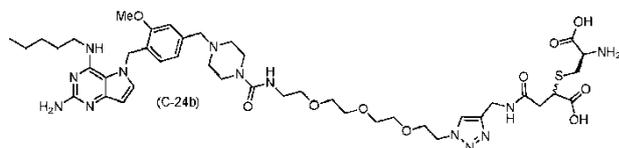
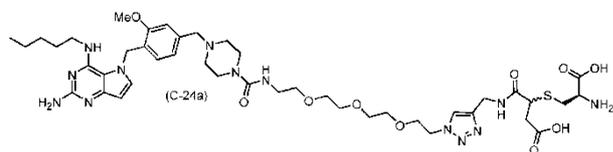
5 Etapa 3: Una solución de (2-(2-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de terc.-butilo en TFA (0,02 M) se concentró en vacío para proporcionar 1-((1-(23-amino-3,6,9,12,15,18,21-heptaóxatricosil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1H-pirrol-2,5-diona. LCMS [M+H] = 354,2.

10 Etapa 4: Carbonoclorhidrato de 4-nitrofenilo (1,10 equiv.) y trietilamina (2,50 equiv.) se añadieron a una solución de 1-((1-(2-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etoxi)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1H-pirrol-2,5-diona (1 equiv.) en CH₂Cl₂ (0,01 M) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla de reacción se concentró después en vacío, se purificó por RP-C18 ISCO y luego se liofilizó para proporcionar (2-(2-(2-(2-(4-((2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)etil)carbamato de 4-nitrofenilo. LCMS [M+H] = 519,2.

Ejemplo 24

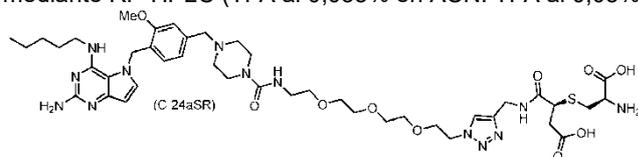
15 **Síntesis de ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-24a) y 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-**

20 **azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-24b)**

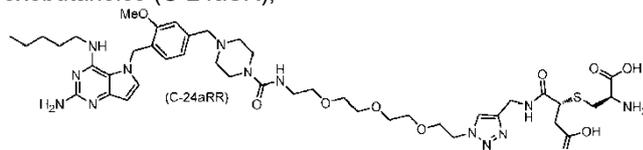


25 **Ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-24a) y 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-**

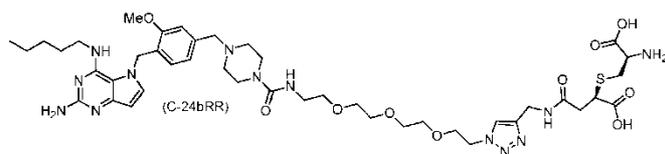
30 **il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-24b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-23) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de Compuestos (C-24a) y (C-24b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-24aSR), (C-24aRR), (C-24bRR) y (C-24bSR) que figuran más adelante), en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. La mezcla de reacción bruta se purificó mediante RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18): LCMS [M+H] = 956,4.**



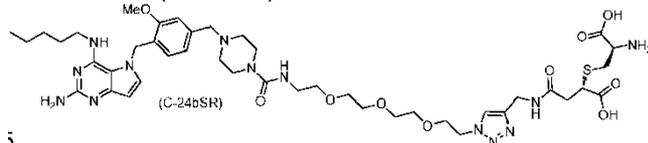
35 **Ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-24aSR);**



40 **ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-24aRR);**



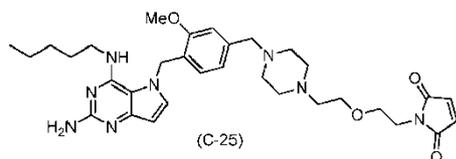
ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-24bRR);



5 5 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-1-oxo-5,8,11-trioxa-2-azatridecan-13-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-24bSR).

10 Ejemplo 25

Síntesis de 1-(2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-25)

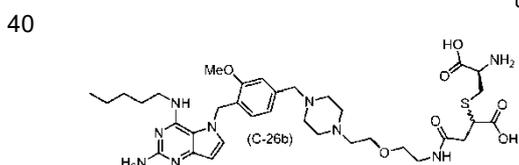
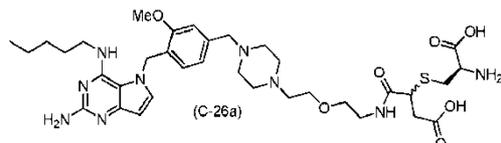


15 Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), 2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)acetaldehído (4,0 equiv.), cianoborohidruro de sodio (13,0 equiv.) y MeOH (0,04 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar 1-(2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-25) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,36 (d, 1H), 7,16 (d, 1H), 6,96 (d, 1H), 6,83 (s, 2H), 6,76 (d, 1H), 6,23 (d, 1H), 5,53 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,84 (s, 2H), 3,78 (m, 2H), 3,71 (m, 2H), 3,64 (m, 2H), 3,54 (m, 2H), 3,35 (m, 4H), 3,27 (t, 2H), 2,95 (m, 4H), 1,52 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS [M+H] = 605,4.

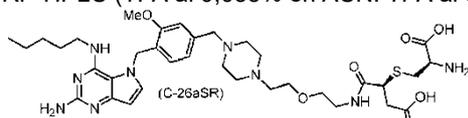
Nota: 2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)acetaldehído se preparó añadiendo 1-(2-(2-hidroxietoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (1,0 equiv.), peryodinato de Dess-Martin (1,5 equiv.) y DCM (0,1 M) a un matraz de fondo redondo y agitando la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró, los componentes volátiles se separaron en vacío y el producto se utilizó sin purificación adicional.

Ejemplo 26

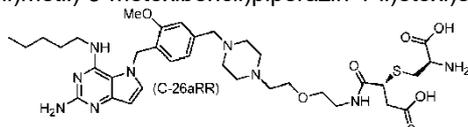
35 **Síntesis de ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-26a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-26b)**



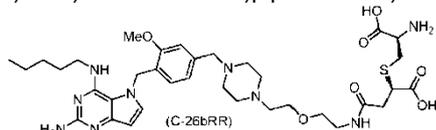
Ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-26a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-26b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-25) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de Compuestos (C-26a) y (C-26b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-26aSR), C-26aRR), (C-26bRR) y (C-26bSR) que figuran más adelante), en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. La mezcla de reacción bruta se purificó mediante RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18): LCMS [M+H] = 744,4



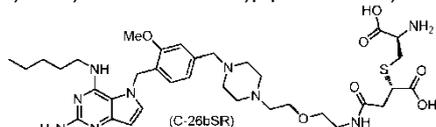
10 Ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-26aSR);



ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-26aRR);



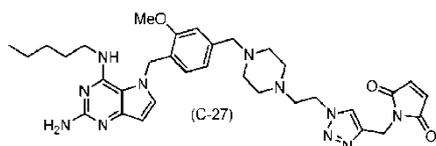
15 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico (C-26bRR);



20 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etil)amino)-4-oxobutanoico;(C-26bSR).

Ejemplo 27

25 **Síntesis de 1-((1-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-27)**



30 Etapa 1: Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), 2-azidoacetaldehído (4,0 equiv.), cianoborohidruro de sodio (32,0 equiv.) y MeOH (0,02 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% TFA en H₂O, columna C18) para proporcionar 5-(4-((4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina en forma de un sólido. LCMS [M+H] = 507,3.

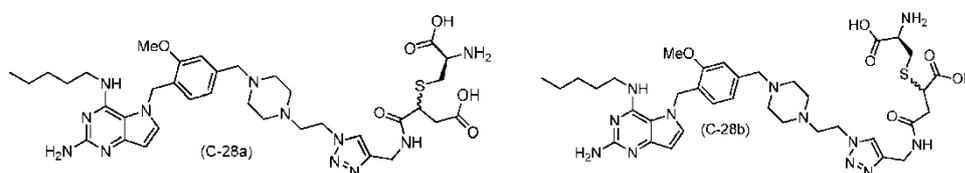
35 Etapa 2: Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(4-((4-(2-azidoetil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (1,0 equiv), 1-(prop-2-in-1-il)-1H-pirrol-2,5-diona (2,3 equiv.) y una mezcla de *t*-BuOH y agua (2:1, v/v, 0,008 M). La mezcla de reacción se desgasificó en vacío y se lavó abundantemente con N₂ cinco veces para separar el O₂. Sal de sodio del ácido L-ascórbico (1,1 equiv en 0,5 ml de H₂O, desgasificada bajo y enjuagada con abundante agua se purgó con N₂ cinco veces para separar el O₂), se añadió utilizando una jeringa a la mezcla de reacción, a continuación, se añadió utilizando una jeringa CuSO₄ (0,2 equiv. en 0,5 ml de agua, desgasificada en vacío y enjuagada con N₂ cinco veces para separar el O₂). La mezcla de reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó después por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar 1-((1-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-27)

en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 7,95 (s, 1H), 7,36 (d, 1H), 7,22 (d, 1H), 7,02 (d, 1H), 6,86 (s, 2H), 6,79 (d, 1H), 6,23 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,76 (s, 2H), 4,52 (t, 2H), 4,26 (s, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,54 (t, 2H), 2,85 (m, 8H), 2,94 (t, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 1,18 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LCMS $[\text{M}+\text{H}] = 642,4$.

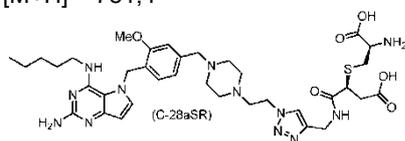
- 5 Nota: 2-azidoacetaldehído se preparó añadiendo 2-azidoetanol (1,0 equiv.), peryodinato de Dess-Martin (1,5 equiv.) y DCM (0,20 M) a un matraz de fondo redondo y agitando la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se filtró, los componentes volátiles se separaron en vacío y el producto se utilizó sin purificación adicional.

10 Ejemplo 28

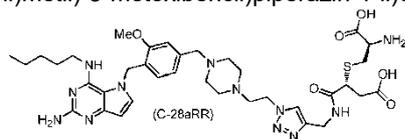
- 15 **Síntesis de ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-28a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-28b)**



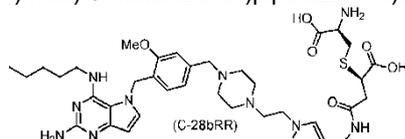
- 20 Ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-28a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-28b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-27) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de Compuestos (C-28a) y (C-28b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-28aSR), C-28aRR), (C-28bRR) y (C-28bSR) que figuran más adelante), en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. La mezcla de reacción bruta se purificó mediante RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H_2O , columna C18): LCMS $[\text{M}+\text{H}] = 781,4$



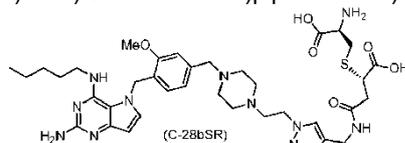
- 30 Ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-28aSR);



ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-28aRR);



- 35 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-28bRR);

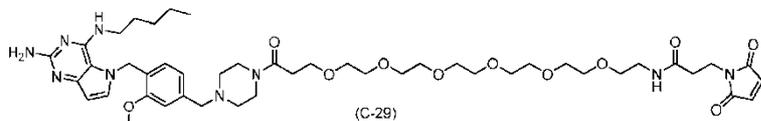


- 40 ácido (S)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-(((1-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amino)-4-oxobutanoico (C-28bSR).

Ejemplo 29

Síntesis de N-(21-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida (C-29)

5



N-(21-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida (C-29) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-3-oxo-7,10,13,16,19,22-hexaoxa-4-azapentacosan-25-oico en lugar de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico para proporcionar N-(21-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-21-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida (C-29) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ^1H RMN (DMSO): δ 8,00 (t, 1H), 7,42 (d, 1H), 7,38 (s, 3H), 7,20 (s, 1H), 7,00 (s, 2H), 6,95 (s, 1H), 6,57 (s, 1H), 6,23 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,30 (s, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,59 (m, 4H), 3,49 (m, 28H), 3,35 (t, 2H), 3,14 (m, 2H), 2,32 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,21 (m, 2H), 1,09 (m, 2H), 0,81 (t, 3H). LRMS [M+H] = 924,4.

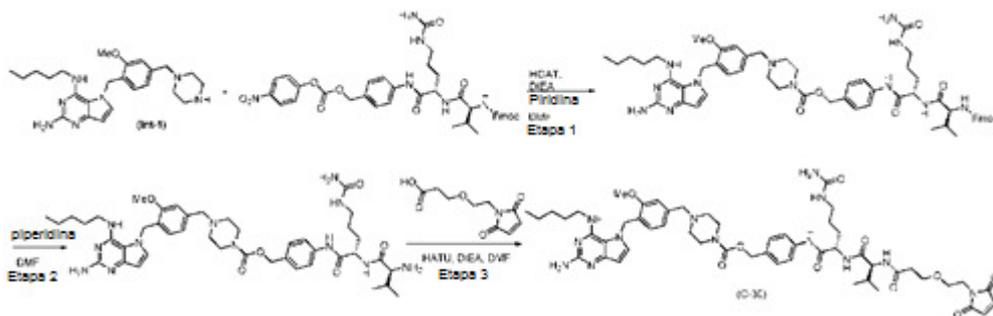
10

15

Ejemplo 30

20

Síntesis de 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (C-30)



25

Etapa 1: Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), HOAT (2,0 equiv.), base de Huenig (14,0 equiv.), ((S)-3-metil-1-(((S)-1-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (1,2 equiv.) y piridina:DMF (1:4, 0,02 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, y la mezcla de reacción bruta se purificó por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo en forma de un sólido: LCMS [M+H] = 1065,5.

35

Etapa 2: 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo se disolvió en DMF (0,007 M) y se añadió piperidina (100,0 equiv.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo en forma de un sólido: LCMS [M+H] = 843,5.

40

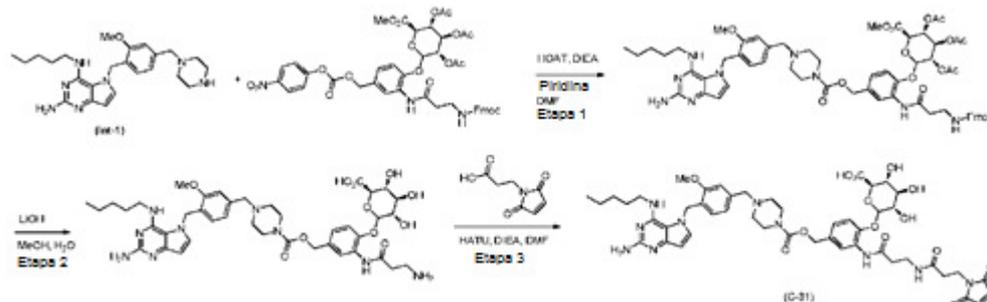
45

Etapa 3: Un matraz de fondo redondo se cargó con 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-amino)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (1,0 equiv.), ácido 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoico (1,1 equiv.), base de Huenig (5,0 equiv.), HATU (1,05 equiv.) y DMF (0,004 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencilo (C-30) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: LCMS [M+H] = 1038,5.

50

Ejemplo 31

Síntesis de ácido (2R,3R,4R,5S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (C-31)



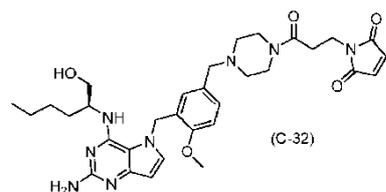
10 Etapa 1: Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-4-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), HOAT (2,0 equiv.), base de Huenig (14,0 equiv.), triacetato de (3S,4R,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triilo (1,2 equiv.) y piridina:DMF (1:4, 0,015 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar triacetato de (3S,4R,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triilo en forma de un sólido: LCMS [M+H] = 1212,4.

15 Etapa 2: Triacetato de (3S,4R,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triilo (1,0 equiv.) se disolvió en MeOH, THF y agua (2:1:0,4) (0,005 M). Luego se añadió LiOH (8,0 equiv.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar ácido (2R,3R,4R,5S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-aminopropanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico en forma de un sólido: LCMS [M+H] = 850,4.

20 Etapa 3: Un matraz de fondo redondo se cargó con ácido (2R,3R,4R,5S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-aminopropanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (1,0 equiv.), ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico (2,0 equiv.), base de Huenig (6,0 equiv.), HBTU (1,8 equiv.) y DMF (0,003 M). La reacción se mantuvo agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar ácido (2R,3R,4R,5S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (C-31) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: LCMS [M+H] = 1001,3.

Ejemplo 32

Síntesis de (S)-1-(3-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-32)

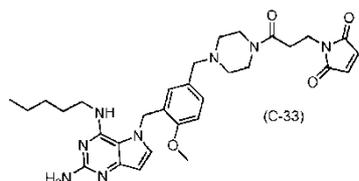


45 (S)-1-(3-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-32) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 1, excepto porque se utilizó el Compuesto (Int-2) en lugar del Compuesto (Int-1), para proporcionar (S)-1-(3-(4-(3-((2-amino-4-

((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-32) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 7,49 (d, 2H), 7,21 (d, 1H), 6,82 (s, 2H), 6,77 (d, 1), 6,28 (d, 1H), 5,67 (d, 1H), 5,51 (d, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,18 (s, 2H), 3,98 (s, 3H), 3,76 (t, 2H), 3,54 (dd, 1H), 3,46 (dd, 1H), 3,16 (m, 4H), 3,05 (m, 4H), 2,71 (t, 2H), 1,48 (m, 1H), 1,26 (m, 3H), 1,05 (m, 1H), 0,84 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 619,4$.

Ejemplo 33

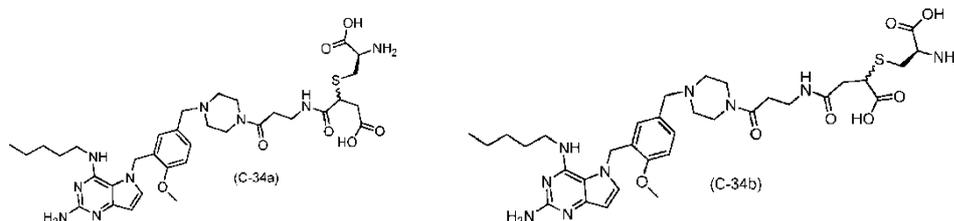
Síntesis de 1-(3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-33)



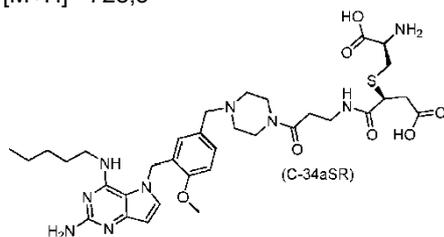
1-(3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-33) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 1, excepto que se utilizó el Compuesto (Int-3) en lugar del Compuesto (Int-1) para proporcionar 1-(3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)-1H-pirrol-2,5-diona (C-33) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 589,3$.

Ejemplo 34

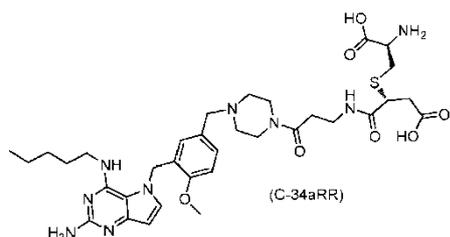
Síntesis de ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-34a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-34b)



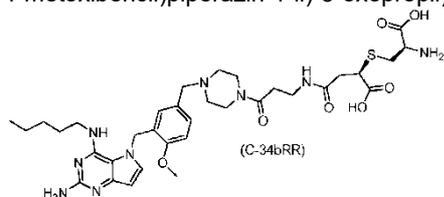
Ácido 3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-34a) y ácido 2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-34b) se prepararon siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 4, excepto que se utilizó el Compuesto (C-33) en lugar del Compuesto (C-1), para proporcionar una mezcla de Compuestos (C-34a) y (C-34b) en forma de sus respectivos diastereoisómeros (Compuestos (C-34aSR), C-34aRR), (C-34bRR) y (C-34bSR) que figuran más adelante), en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. La mezcla de reacción bruta se purificó mediante RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H_2O , columna C18): $^1\text{H RMN}$ (DMSO): δ 7,51 (s, 2H), 7,39 (m, 2H), 7,27 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 6,59 (s, 1H), 6,22 (t, 1H), 5,56 (s, 2H), 3,86 (s, 4H), 3,66 (m, 3H), 3,42 (m, 8H), 3,25 (m, 4H), 3,08 (m, 2H), 2,81 (m, 3H), 2,65 (m, 1H), 1,43 (m, 2H), 1,22 (m, 3H), 1,07 (m, 2H), 0,83 (t, 3H). LCMS $[\text{M}+\text{H}] = 728,3$



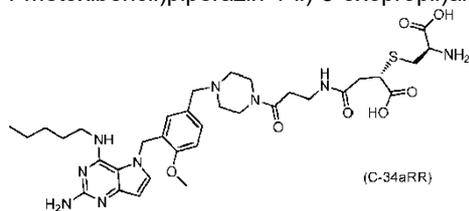
Ácido (S)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-34aSR);



ácido (R)-3-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-34aRR);



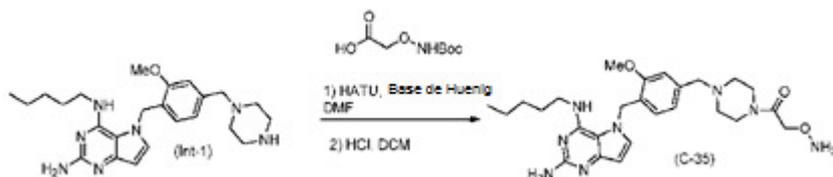
5 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-34bRR);



10 ácido (R)-2-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)-4-((3-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropil)amino)-4-oxobutanoico (C-34bSR).

Ejemplo 35

15 Síntesis de 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-(aminoxio)etanona (C-35)

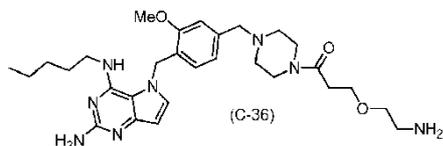


20 Etapa 1: Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), ácido 2-(((terc.-butoxicarbonil)amino)oxi)acético (1,1 equiv.), HATU (1,05 equiv.), base de Huenig (5,0 equiv.) y DMF (0,2 M). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 18 horas y la mezcla de reacción bruta se purificó luego por cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 20%:DCM) para proporcionar 2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-oxoetoxicarbamato de terc.-butilo.

25 Etapa 2: HCl (20,0 equiv., 4 M en dioxano) se añadió un matraz de fondo redondo cargado con 2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-oxoetoxicarbamato de terc.-butilo (1,0 equiv.) y DCM (0,1 M) a 0 °C. Luego se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Los componentes volátiles se separaron en vacío. MeOH (con NH₄OH al 8%) se añadió al residuo resultante y los componentes volátiles se separaron en vacío. Esto se repitió 2 veces más. La mezcla de reacción bruta se purificó entonces mediante cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 10% (NH₄OH al 8%):DCM) para suministrar 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-(aminoxio)etanona (C-35) en forma de un sólido: ¹H RMN (CDCl₃): δ 7,12 (d, 1H), 7,00 (s, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,69 (d, 1H), 6,38 (d, 1H), 5,52 (t, 1H), 5,30 (s, 2H), 4,35 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,64 (s, 2H), 3,52 (m, 2H), 3,38 (m, 4H), 2,44 (m, 4H), 1,62 (s, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,38 (m, 2H), 1,25 (m, 2H), 1,12 (m, 2H), 0,87 (t, 3H). LRMS [M+H] = 511,4.

Ejemplo 36

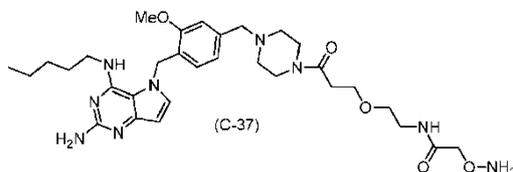
35 Síntesis de 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-aminoetoxi)propan-1-ona (C-36)



5 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-i)-3-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona (C-36) se preparó siguiendo un procedimiento similar al del Ejemplo 35, excepto que se utilizó ácido 3-(2-((terc.-butoxicarbonil)amino)etoxi)propanoico en lugar de ácido 2-(((terc.-butoxicarbonil)amino)oxi)acético para proporcionar 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-aminoetoxi)propan-1-ona (C-36) en forma de un sólido: ^1H RMN (CD_3OD): δ 7,26 (d, 1H), 7,09 (d, 1H), 6,86 (d, 1H), 6,59 (d, 1H), 6,13 (d, 1H), 5,43 (s, 2H), 4,57 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,73 (t, 2H), 3,58 (m, 4H), 3,54 (m, 2H), 3,37 (m, 2H), 2,93 (t, 2H), 2,66 (m, 2H), 2,44 (m, 4H), 1,41 (m, 2H), 1,27 (m, 2H), 1,15 (m, 2H), 0,87 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 553,4$.

Ejemplo 37

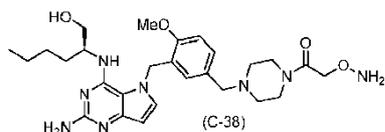
15 **Síntesis de N-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-37)**



20 N-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-37) se preparó siguiendo un procedimiento similar al del Ejemplo 35, excepto que se utilizó 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-aminoetoxi)propan-1-ona (C-36) en lugar de Int-1 para proporcionar N-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-37) en forma de un sólido: ^1H RMN (CD_3OD): δ 7,27 (d, 1H), 7,09 (d, 1H), 6,86 (d, 1H), 6,59 (d, 1H), 6,13 (d, 1H), 5,44 (s, 2H), 4,08 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,72 (t, 2H), 3,56 (m, 8H), 3,40 (m, 4H), 2,64 (t, 2H), 2,44 (m, 4H), 1,43 (m, 2H), 1,27 (m, 2H), 1,14 (m, 2H), 0,87 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 626,4$.

Ejemplo 38

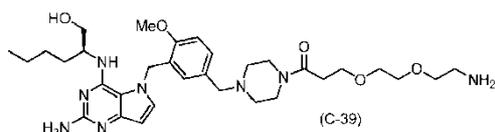
30 **Síntesis de (S)-1-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-(aminooxi)etanona (C-38)**



35 (S)-1-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-(aminooxi)etanona (C-38) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 35, excepto porque se utilizó el Compuesto (Int-2) en lugar del Compuesto (Int-1), para proporcionar (S)-1-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-(aminooxi)etanona (C-38) en forma de un sólido: ^1H RMN (CD_3OD): δ 7,54 (d, 1), 7,40 (d, 1H), 7,13 (d, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,29 (d, 1H), 5,69 (d, 1H), 5,48 (d, 1H), 4,36 (m, 3H), 3,96 (s, 3H), 3,74 (m, 2H), 3,51 (m, 4H), 2,66 (m, 4H), 1,49 (m, 1H), 1,38 (m, 3H), 1,24 (m, 2H), 0,96 (m, 2H), 0,84 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 541,3$.

Ejemplo 39

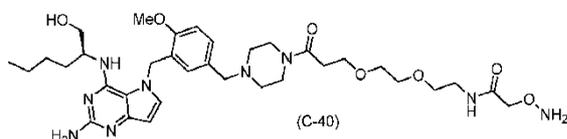
45 **(S)-1-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona (C-39)**



(S)-1-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona (C-39) se preparó siguiendo un procedimiento similar del Ejemplo 35, excepto que se utilizó Compuesto (Int-2) en lugar de Compuesto (Int-1) y ácido 2,2-dimetil-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatetradecan-14-oico en lugar de ácido 2-(((terc.-butoxicarbonil)amino)oxi)acético para proporcionar (S)-1-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propan-1-ona (C-39) en forma de un sólido: $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 7,56 (d, 1H), 7,44 (d, 1H), 7,16 (d, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,31 (d, 1H), 5,71 (d, 1H), 5,50 (d, 1H), 4,38 (m, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,78 (m, 4H), 3,72 (m, 2H), 3,67 (m, 6H), 3,53 (m, 4H), 3,14 (m, 2H), 2,77 (m, 2H), 2,69 (m, 4H), 1,51 (m, 1H), 1,26 (m, 3H), 1,02 (m, 2H), 0,86 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 627,5$.

Ejemplo 40

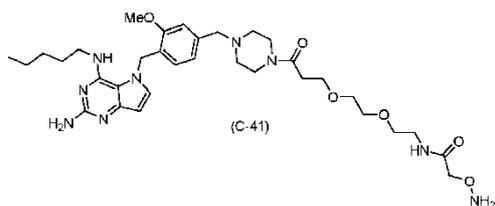
Síntesis de (S)-N-(2-(2-(3-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-40)



(S)-N-(2-(2-(3-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-40) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 35, excepto porque se utilizó el Compuesto (C-39) en lugar del Compuesto (Int-1), para proporcionar (S)-N-(2-(2-(3-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-40) en forma de un sólido: $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 7,54 (d, 1H), 7,47 (d, 1H), 7,17 (d, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,30 (d, 1H), 5,68 (d, 1H), 5,50 (d, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,09 (s, 2H), 3,97 (s, 3H), 3,73 (m, 8H), 3,56 (m, 4H), 3,43 (t, 2H), 3,23 (m, 2H), 2,88 (m, 4H), 2,66 (t, 2H), 1,49 (m, 1H), 1,26 (m, 3H), 1,04 (m, 2H), 0,84 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 700,4$.

Ejemplo 41

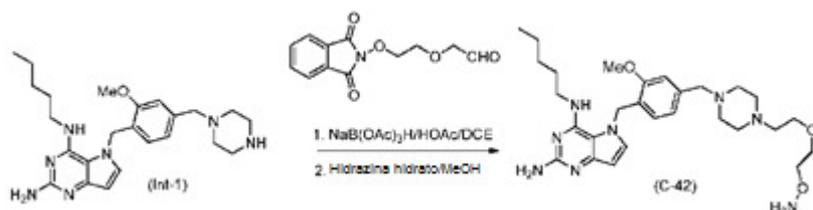
Síntesis de N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-41)



N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-41) se preparó siguiendo un procedimiento similar al del Ejemplo 35, excepto que se utilizó Compuesto (C-20) en lugar de Compuesto (Int-1) para proporcionar N-(2-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-41) en forma de un sólido: $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 7,25 (d, 1H), 7,11 (s, 1H), 6,86 (d, 1H), 6,58 (d, 1H), 6,12 (d, 1H), 5,43 (s, 2H), 4,10 (s, 2H), 3,96 (s, 3H), 3,76 (t, 2H), 3,60 (m, 12H), 3,44 (t, 2H), 3,36 (t, 2H), 2,66 (t, 2H), 2,46 (m, 4H), 1,40 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,15 (m, 2H), 0,89 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 670,4$.

Ejemplo 42

Síntesis de 5-(4-((4-(2-(2-(aminooxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (C-42)



Etapa 1. En la primera etapa se cargó un matraz de fondo redondo con 5-(2-metoxi-4-(piperazin-1-ilmetil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.) y 2-(2-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)etoxi)acetaldehído (1,2 equiv.) en DCE (0,02 M) y a esta mezcla se añadió ácido acético (6,0 equiv.), la mezcla se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (3,0 equiv.). La agitación continuó durante otras 3 horas a temperatura ambiente. Los componentes volátiles se separaron luego en vacío. El residuo se disolvió en MeOH y se purificó por HPLC de fase inversa, utilizando una columna C18 (eluyendo con acetonitrilo al 10-50%-H₂O que contenía TFA al 0,05%) para suministrar 2-(2-(2-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)isindolina-1,3-diona. LCMS [M+H] = 671,40.

Etapa 2. Un matraz de fondo redondo se cargó con 2-(2-(2-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)isindolina-1,3-diona (1,0 equiv.), hidrato de hidrazina (10,0 equiv.), MeOH (0,02 M) y agua (0,2 M). La mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó por HPLC de fase inversa, utilizando una columna C18 (eluyendo con acetonitrilo al 10-50%-H₂O que contenía TFA al 0,05%). Las fracciones que contenían el producto deseado se agruparon y se concentraron a presión reducida, el residuo se disolvió luego en MeOH y se cargó en una columna de resina MP Sphere PL-HCO₃ pre-acondicionada y se eluyó con MeOH y el eluyente se concentró para proporcionar 5-(4-((4-(2-(2-(aminooxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (C-42) en forma de un sólido: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,22 (d, 1H), 7,08 (d, 1H), 6,83 (d, 1H), 6,56 (d, 1H), 6,10 (d, 1H), 5,40 (s, 2H), 3,94 (s, 3H), 3,76 (m, 2H), 3,60 (m, 4H), 3,50 (s, 2H), 3,34 (d, 3H), 2,59 (m, 4H), 2,49 (s, 4H), 1,38 (m, 2H), 1,26 (m, 2H), 1,12 (m, 2H), 0,87 (t, 3H). LCMS [M+H] = 541,40.

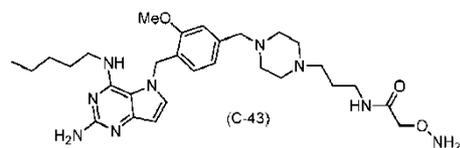
Nota: 2-(2-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)etoxi)acetaldehído se preparó en un procedimiento de dos etapas:

Etapa 1: A una solución de N-hidroxifitalimida (1,0 equiv.), dietilenglicol (1,0 equiv.) y trifetilfosfina (1,3 equiv.) en THF (0,2 M) se añadió DEAD (solución 2,2 M en tolueno, 1,3 equiv.) a 0°C. La solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró en vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluido con EtOA al 20-70%/ hexanos). El producto todavía contenía algo de Ph₃PO después de esta cromatografía, luego se re-purificó por cromatografía de fase inversa (columna C18, se eluyó con CH₃CN al 20-40-100%/agua) para proporcionar 2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)isindolina-1,3-diona LCMS [M+H] = 252,10.

Etapa 2: A una mezcla agitada de 2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)isindolina-1,3-diona (1,0 equiv.) y bicarbonato de sodio (2,0 equiv.) en DCM seco (0,08 M) se añadió peryodinano de Dess -Martin (2,0 equiv.) y la mezcla resultante se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con DCM, luego se lavó con solución de NaOH 1 N y salmuera, la capa orgánica se separó y se secó sobre MgSO₄ y se evaporó en vacío. La mezcla bruta se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluida con EtAOc al 30-70%/Hexanos) para suministrar 2-(2-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)etoxi)acetaldehído. LCMS [M+H] = 250,10.

Ejemplo 43

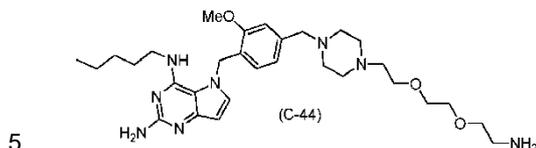
Síntesis de N-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)-2-(aminooxi)acetamida (C-43)



N-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)-2-(aminooxi)acetamida (C-43) se preparó siguiendo un procedimiento similar al del Ejemplo 35, excepto que se utilizó Compuesto (C-19) en lugar de Compuesto (Int-1) para proporcionar N-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)-2-(aminooxi)acetamida (C-43) en forma de un sólido: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,12 (d, 1H), 6,98 (d, 1H), 6,73 (d, 1H), 6,45 (d, 1H), 6,00 (d, 1H), 5,30 (s, 2H), 3,97 (s, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,41 (s, 2H), 3,25 (s, 2H), 2,40 (s, 6H), 2,27 (m, 3H), 1,63 (m, 2H), 1,28 (m, 2H), 1,17 (m, 3H), 1,02 (m, 2H), 0,77 (t, 3H). LCMS [M+H] = 568,40.

Ejemplo 44

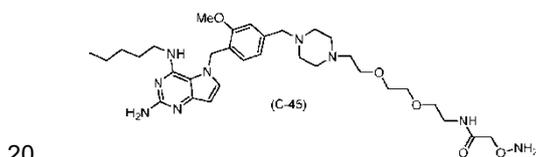
Síntesis de 5-(4-((4-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (C-44)



5-(4-((4-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (C-44) se preparó siguiendo un procedimiento similar al del Ejemplo 19, excepto que se utilizó (2-(2-(2-bromoetoxi)etoxi)etil)carbamato de terc.-butilo en lugar de (3-bromopropil)carbamato de terc.-butilo para proporcionar 5-(4-((4-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)piperazin-1-il)metil)-2-metoxibencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (C-44) en forma de un sólido: $^1\text{H RMN}$ (CD_3OD): δ 7,36 (d, 1H), 7,13 (d, 1H), 6,92 (d, 1H), 6,73 (d, 1H), 6,21 (s, 1H), 5,51 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,69 (m, 12H), 3,53 (t, 2H), 3,12 (m, 2H), 2,84 (m, 8H), 1,50 (m, 2H), 1,28 (m, 2H), 1,17 (m, 2H), 0,87 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 569,3$.

15 **Ejemplo 45**

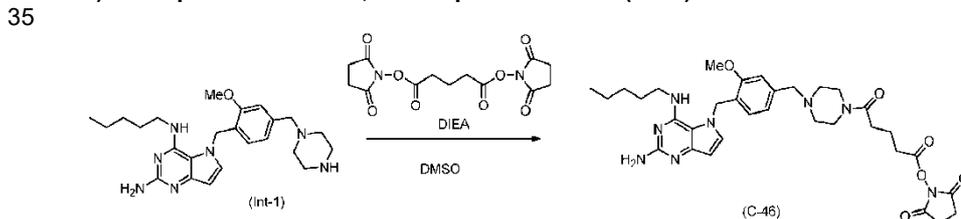
Síntesis de N-(2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-45)



N-(2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-43) se preparó siguiendo un procedimiento similar al del Ejemplo 35, excepto que se utilizó Compuesto (C-44) en lugar de Compuesto (Int-1) para proporcionar N-(2-(2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)etoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-45) en forma de un sólido: $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3): δ 7,20 (s, 1H), 6,97 (d, 1H), 6,90 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,76 (d, 1H), 6,56 (d, 1H), 6,17 (d, 1H), 5,84 (s, 2H), 5,21 (s, 2H), 4,69 (m, 2H), 4,07 (s, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,53 (m, 8H), 3,45 (m, 2H), 3,39 (s, 2H), 3,24 (m, 2H), 2,52 (t, 2H), 2,40 (m, 8H), 1,22 (m, 2H), 1,16 (m, 2H), 1,02 (m, 2H), 0,78 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 642,4$.

30 **Ejemplo 46**

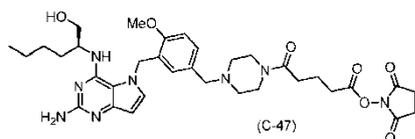
Síntesis de 5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-46)



Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)benzil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), diisopropilamina (1,3 equiv.), disuccinimidil glutarato (1,3 equiv.) y DMSO (0,1 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN; TFA al 0,05% en H_2O , columna C18) para proporcionar 5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-46) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: $^1\text{H RMN}$ (DMSO): δ 7,41 (s, 1H), 7,37 (s, 3H), 7,19 (s, 1H), 6,94 (s, 1H), 6,57 (s, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,56 (s, 2H), 4,30 (s, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,44 (m, 4H), 3,35 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 2,80 (m, 8H), 2,71 (m, 2H), 1,83 (m, 2H), 1,44 (m, 2H), 1,20 (m, 2H), 1,09 (m, 2H), 0,80 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 649,3$.

45 **Ejemplo 47**

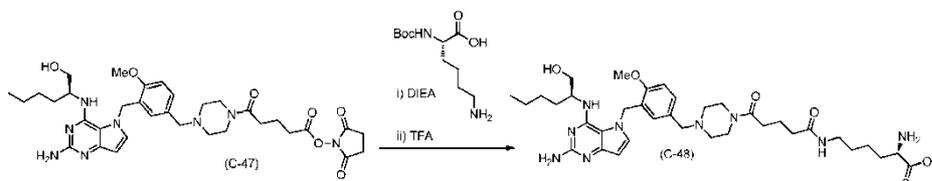
Síntesis de 5-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de (S)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-47)



5
 5-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de (S)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-47) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 46, excepto porque se utilizó el Compuesto (Int-2) en lugar del Compuesto (Int-1), para proporcionar 5-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de (S)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-47) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (DMSO): δ 7,54 (s, 1H), 7,43 (s, 3H), 7,22 (s, 1H), 6,61 (s, 1H), 6,28 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,67 (d, 1H), 5,50 (d, 1H), 4,82 (s, 1H), 4,39 (s, 1H), 4,22 (m, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,36 (m, 4H), 3,28 (m, 2H), 2,92 (m, 2H), 2,82 (m, 8H), 2,72 (m, 2H), 1,84 (m, 2H), 1,34 (m, 2H), 1,15 (m, 2H), 0,86 (m, 2H), 0,77 (t, 3H). LRMS [M+H] = 679,3.

15 **Ejemplo 48**

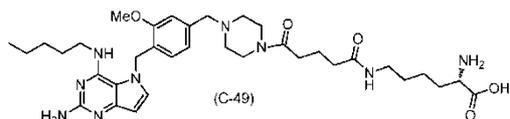
Síntesis de ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(3-((2-amino-4-((S)-1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-48)



20
 Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(4-(3-((2-amino-4-((1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de (S)-2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-47) (1,0 eq), Boc-Lys-OH (2,0 eq), DIEA (5,0 eq) y DMF (30 mM). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y los componentes volátiles se separaron en vacío. La mezcla de reacción bruta se purificó utilizando RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para obtener ácido (S)-6-(5-(4-(3-((2-amino-4-((S)-1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)-2-((terc.-butoxicarbonil)amino)hexanoico LCMS [M+1] = 810,5. Ácido (S)-6-(5-(4-(3-((2-amino-4-((S)-1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)-2-((terc.-butoxicarbonil)amino)hexanoico se trató con TFA al 30% en volumen en DCM 0,1 M y los componentes volátiles se separaron en vacío para obtener ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(3-((2-amino-4-((S)-1-hidroxihexan-2-il)amino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-48) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,49 (m, 2H), 7,21 (d, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,29 (d, 1H), 5,68 (d, 1H), 5,50 (d, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,20 (m, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,93 (m, 1H), 3,76 (m, 2H), 3,50 (m, 2H), 3,19 (m, 4H), 2,44 (t, 2H), 2,24 (t, 2H), 2,16 (m, 4H), 1,88 (m, 4H), 1,51 (m, 2H), 1,25 (m, 6H), 1,03 (m, 2H), 0,84 (t, 3H). LRMS [M+H] = 710,3.

Ejemplo 49

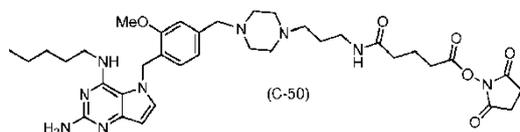
40 **Síntesis de ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-49)**



45 Ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-49) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 48, excepto porque se utilizó el Compuesto (C-46) en lugar del Compuesto (C-47), para proporcionar ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-49) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,37 (d, 1H), 7,22 (d, 1H), 7,01 (d, 1H), 6,78 (d, 1H), 6,23 (s, 1H), 5,56 (s, 2H), 4,07 (m, 2H), 3,95 (s, 3H), 3,79 (m, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,55 (m, 2H), 2,98 (m, 4H), 2,43 (t, 2H), 2,23 (t, 2H), 2,04 (m, 4H), 1,89 (m, 4H), 1,54 (m, 6H), 1,30 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H] = 680,4.

Ejemplo 50

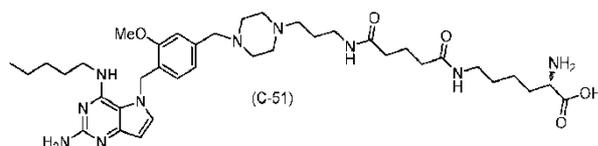
Síntesis de 5-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)amino)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-50)



5-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)amino)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-50) se preparó siguiendo un procedimiento similar al del Ejemplo 46, excepto que se utilizó Compuesto (C-19) en lugar de Compuesto (Int-1) para proporcionar 5-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)amino)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-50) en forma de un sólido de la sal de TFA: ^1H RMN (DMSO): δ 8,00 (s, 1H), 7,40 (m, 4H), 7,02 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,55 (d, 1H), 6,21 (d, 1H), 5,53 (s, 2H), 3,83 (, m, 5H), 3,00 (m, 8H), 2,81 (m, 4H), 2,69 (m, 2H), 2,19 (m, 2H), 1,84 (m, 2H), 1,75 (m, 4H), 1,45 (m, 2H), 1,22 (m, 4H), 1,09 (m, 4H), 0,80 (t, 3H). LRMS [M+H] = 706,4.

Ejemplo 51

Síntesis de ácido (S)-2-amino-6-(5-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)amino)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-51)

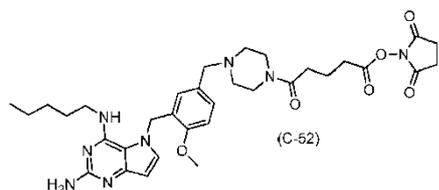


Ácido (S)-2-amino-6-(5-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)amino)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-51) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 48, excepto porque se utilizó el Compuesto (C-50) en lugar del Compuesto (C-47), para proporcionar ácido

(S)-2-amino-6-(5-((3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)propil)amino)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-51) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ^1H RMN (CD_3OD): δ 7,35 (d, 1H), 7,12 (s, 1H), 6,94 (d, 1H), 6,75 (d, 1H), 6,22 (s, 1H), 5,52 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,86 (t, 1H), 3,71 (s, 2H), 3,54 (, m, 2H), 3,22 (m, 8H), 3,05 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 2,21 (m, 4H), 1,89 (m, 4H), 1,53 (m, 6H), 1,30 (m, 4H), 1,18 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H] = 737,4.

Ejemplo 52

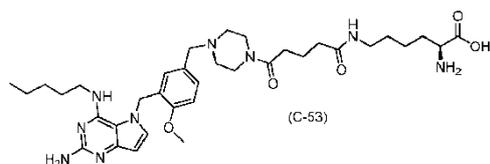
Síntesis de 5-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-52)



5-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-52) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 46, excepto que se utilizó el Compuesto (Int-3) en lugar del Compuesto (Int-1) para proporcionar 5-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (C-52) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: LRMS [M+H] = 649,4.

Ejemplo 53

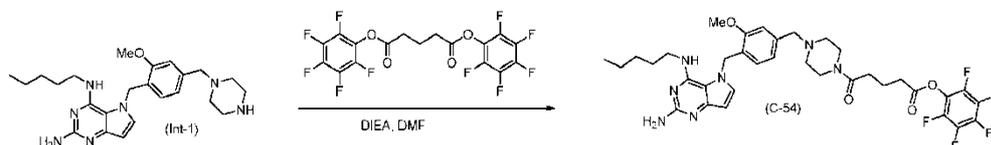
Síntesis de ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-53)



Ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-53) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 48, excepto que se utilizó el Compuesto (C-52) en lugar del Compuesto (C-47) para proporcionar ácido (S)-2-amino-6-(5-(4-(3-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-4-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanamido)hexanoico (C-53) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ^1H RMN (DMSO): δ 8,22 (s, 3H), 7,79 (t, 1H), 7,51 (s, 2H), 7,42 (m, 2H), 7,27 (t, 1H), 7,17 (d, 1H), 6,61 (s, 1H), 6,23 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,05 (m, 2H), 3,87 (s, 5H), 3,42 (m, 3H), 3,02 (m, 3H), 2,89 (m, 2H), 2,31 (t, 2H), 2,09 (t, 2H), 1,72 (m, 4H), 1,41 (m, 5H), 1,22 (m, 2H), 1,07 (m, 2H), 0,83 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 680,4$.

Ejemplo 54

Síntesis de 5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de perfluorofenilo (C-54)

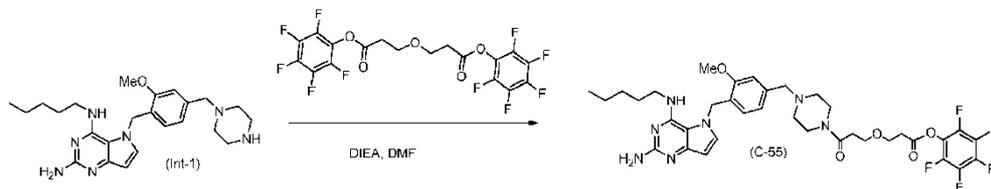


Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-4-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), DIEA (3,0 equiv.), glutarato de bis(perfluorofenilo) (2,0 equiv.) y DMF (0,01 M). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después la mezcla de reacción bruta se purificó por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H_2O , columna C18) proporcionando 5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-5-oxopentanoato de perfluorofenilo (C-54) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA. LCMS $[\text{M}+1] = 718,4$.

Nota: Glutarato de bis(perfluorofenilo) se preparó mediante adición de dicloruro de glutamilo (1,0 equiv.), THF (0,15 M) y trietilamina (2,2 equiv.) a un matraz de fondo redondo y enfriando la mezcla de reacción a 0°C . Luego se añadió lentamente una solución de 2,3,4,5,6-pentafluorofenol (2,1 equiv.) en THF (1,2 M). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de gel de sílice y luego se concentró en vacío. El residuo se purificó mediante columna de gel de sílice eluida con hexano-acetato de etilo (9:1) y se concentró para dar glutarato de bis(perfluorofenilo) en forma de un sólido. LCMS $[\text{M}+23] = 487,2$.

Ejemplo 55

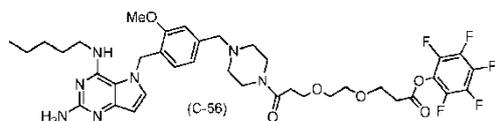
Síntesis de 3-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)propanoato de perfluorofenilo (C-55)



3-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)propanoato de perfluorofenilo (C-55) se preparó en forma de un sólido en forma de la sal de TFA siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 54, excepto que se utilizó 3,3'-oxidipropoato de bis(perfluorofenilo) en lugar de glutarato de bis(perfluorofenilo). ^1H RMN (Acetonitrilo- d_3) δ 7,33 (d, 1H), 7,30 (d, 1H), 6,95 (d, 1H), 6,73 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 6,06 (m, 1H), 5,43 (s, 2H), 4,18 (s, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,81 (t, 2H), 3,74 (t, 2H), 3,47 (m, 2H), 2,95 (t, 2H), 2,60 (t, 2H), 2,14 (d, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,28 (m, 2H), 1,15 (m, 2H), 0,87 (t, 3H). LRMS $[\text{M}+\text{H}] = 748,4$. ^{19}F RMN (471 MHz, Acetonitrilo- d_3) δ -154,71 (d, 2F), -160,40 (d, 1F), -164,57 (dd, 2F).

Ejemplo 56

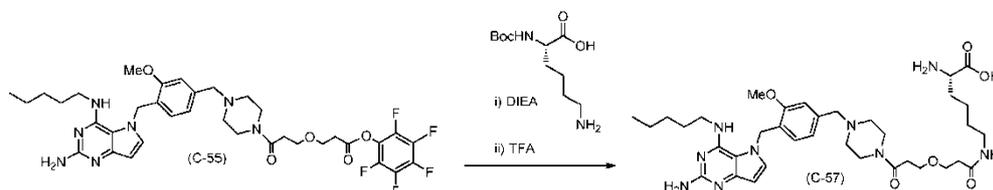
Síntesis de 3-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)propanoato de perfluorofenilo (C-56)



5 3-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)propanoato de perfluorofenilo (C-56) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 54, excepto que se utilizó 3,3'-(etano-1,2-diilbis(oxi))dipropanoato de bis(perfluorofenilo) en lugar de glutarato de bis(perfluorofenilo) para obtener 3-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etoxi)propanoato de perfluorofenilo (C-54). LRMS [M+H] = 792,4.

Ejemplo 57

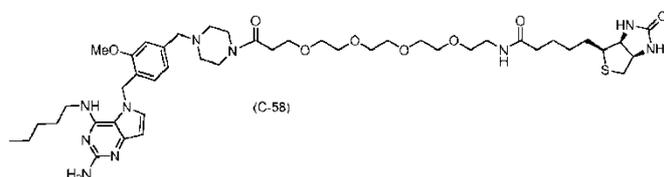
Síntesis de ácido (S)-2-amino-6-(3-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)propanamido)hexanoico (C-57)



20 Un matraz de fondo redondo se cargó con 3-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)propanoato de perfluorofenilo (C-55) (1,0 equiv), Boc-Lys-OH (2,0 equiv), DIEA (5,0 equiv.) y DMF (30 mM). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y los componentes volátiles se separaron en vacío. La mezcla de reacción bruta se purificó utilizando RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para obtener ácido (S)-6-(3-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)propanamido)-2-((terc.-butoxicarbonil)amino)hexanoico. LCMS [M+1] = 810,5. El compuesto protegido con boc se trató con TFA al 30% en volumen en DCM 0,1 M y luego los componentes volátiles se separaron en vacío para obtener ácido (S)-2-amino-6-(3-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)propanamido)hexanoico (C-57) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (DMSO): δ 8,18 (m, 3H), 7,80 (s, 1H), 7,41 (m, 4H), 7,18 (s, 1H), 6,94 (d, 1H), 6,59 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,56 (s, 2H), 4,24 (m, 1H), 3,86 (m, 7H), 3,56 (m, 4H), 3,44 (m, 4H), 3,01 (m, 4H), 2,60 (m, 2H), 2,28 (m, 2H), 1,74 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,38 (m, 3H), 1,21 (m, 3H), 1,09 (m, 2H), 0,80 (t, 3H). LCMS [M+1] = 710,5.

Ejemplo 58

Síntesis de N-(15-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecil)-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida (C-58)

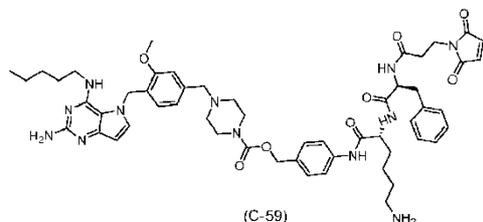


40 N-(15-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecil)-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida (C-58) se preparó siguiendo un procedimiento similar al Ejemplo 46, excepto que se utilizó 17-oxo-21-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)-4,7,10,13-tetraoxa-16-azahenicosan-1-olato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo en lugar de glutarato de disuccinimida para proporcionar N-(15-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxapentadecil)-5-((3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida (C-58) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (DMSO): δ 7,84 (m, 2H), 7,42 (m, 4H), 7,22 (m, 1H), 6,94 (d, 1H), 6,56 (d, 1H), 6,42 (s, 1H), 6,37 (s, 1H), 6,22 (s, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,29 (m, 2H), 4,11 (m, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,60 (m, 4H), 3,48 (m, 16H), 3,37 (m, 4H), 3,16 (m, 4H),

3,08 (m, 2H), 2,80 (m, 1H), 2,56 (m, 2H), 2,05 (m, 2H), 1,58 (m, 1H), 1,45 (m, 5H), 1,23 (m, 4H), 1,07 (m, 2H), 0,80 (t, 3H). LRMS [M+H] = 911,6.

Ejemplo 59

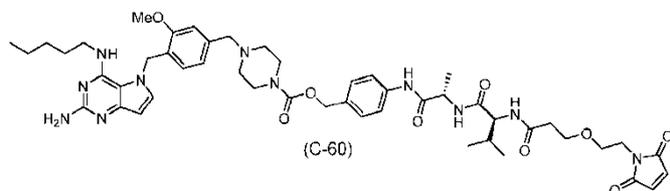
5 **Síntesis de 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((R)-6-amino-2-((S)-2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3-fenilpropanamido)hexanamido)bencilo (C-59)**



4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((R)-6-amino-2-((S)-2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)-3-fenilpropanamido)hexanamido)bencilo (C-59) se preparó en forma de un sólido en forma de la sal de TFA de acuerdo con el esquema mostrado para el Ejemplo (C-30), excepto que se utilizó ((S)-1-(((S)-6-amino-1-((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxohexan-2-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo en lugar de ((S)-3-metil-1-(((S)-1-((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo en la primera etapa: ¹H RMN (CD₃OD): δ 8,26 (d, 1H), 7,91 (t, 1H), 7,61 (d, 2H), 7,35 (m, 3H), 7,25 (m, 3H), 7,19 (m, 3H), 7,03 (d, 1H), 6,79 (d, 1H), 6,76 (s, 2H), 6,24 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 5,11 (s, 2H), 4,41 (m, 1H), 4,33 (s, 2H), 3,98 (t, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,70 (m, 3H), 3,54 (t, 2H), 3,24 (m, 4H), 3,10 (m, 1H), 3,02 (m, 1H), 2,83 (m, 1H), 2,47 (t, 2H), 1,92 (m, 2H), 1,52 (m, 4H), 1,42 (m, 2H), 1,30 (m, 3H), 1,18 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H] = 1013,5.

Ejemplo 60

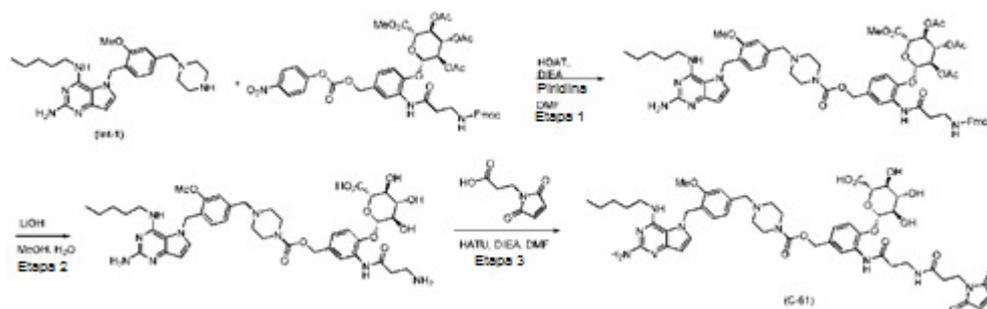
25 **Síntesis de 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (C-60)**



35 4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carboxilato de 4-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)-3-metilbutanamido)propanamido)bencilo (C-60) se preparó en forma de un sólido en forma de la sal de TFA de acuerdo con el esquema mostrado para el Ejemplo (C-30), excepto que se utilizó ((S)-3-metil-1-(((S)-1-((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo en lugar de ((S)-3-metil-1-(((S)-1-((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-1-oxobutan-2-il)carbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo en la primera etapa: ¹H RMN (CD₃OD): δ 9,65 (s, 1H), 8,20 (d, 1H), 7,97 (d, 1H), 7,60 (m, 2H), 7,34 (m, 2H), 7,31 (s, 1H), 7,22 (d, 1H), 7,03 (d, 1H), 6,80 (m, 2H), 6,77 (s, 2H), 6,23 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 5,11 (s, 2H), 4,48 (t, 1H), 4,31 (s, 3H), 4,15 (t, 1H), 3,95 (m, 4H), 3,68 (m, 4H), 3,62 (m, 2H), 3,53 (m, 8H), 2,49 (t, 2H), 2,11 (m, 1H), 1,52 (m, 2H), 1,44 (d, 3H), 1,28 (m, 2H), 1,18 (m, 2H), 0,98 (m, 6H), 0,87 (t, 3H). LRMS [M+H] = 952,6.

Ejemplo 61

45 **Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (C-61)**



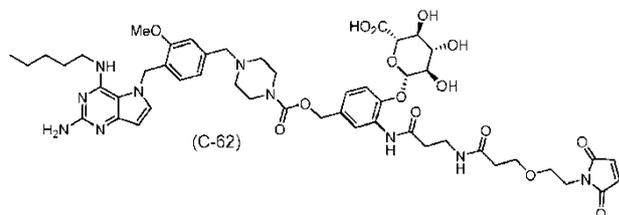
Etapa 1: Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), HOAT (2,0 equiv.), base de Huenig (14,0 equiv.), triacetato de (3S,4R,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (1,2 equiv.) y piridina:DMF (1:4, 0,015 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar triacetato de (3S,4R,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo en forma de un sólido: LCMS [M+H] = 1212,4.

Etapa 2: Triacetato de (3S,4R,5R,6R)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (1,0 equiv.) se disolvió en MeOH, THF y agua (2:1:0,4) (0,005 M). Luego se añadió LiOH (8,0 equiv.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar ácido (2R,3R,4R,5S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-aminopropanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico en forma de un sólido: LCMS [M+H] = 850,4.

Etapa 3: Un matraz de fondo redondo se cargó con ácido (2R,3R,4R,5S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-aminopropanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (1,0 equiv.), ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico (2,0 equiv.), base de Huenig (6,0 equiv.), HBTU (1,8 equiv.) y DMF (0,003 M). La reacción se mantuvo agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (C-61) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: LCMS [M+H] = 1001,3.

Ejemplo 62

Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (C-62)

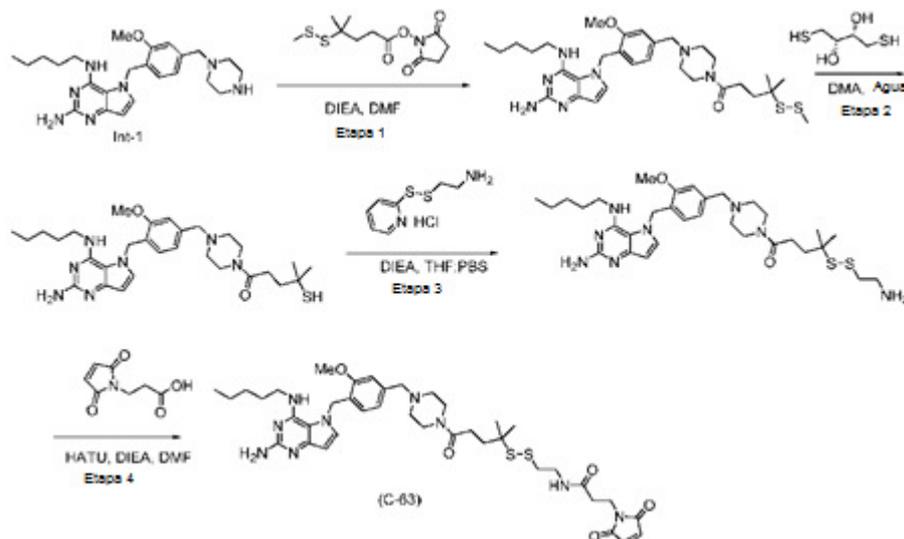


Ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-carbonil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (C-62) se preparó en forma de un sólido en forma de la sal de TFA de acuerdo con el esquema mostrado para el Ejemplo (C-61), excepto que se utilizó ácido 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoico en lugar de ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico en la última etapa: ¹H RMN (CD₃OD): δ 8,20 (d, 1H), 7,37 (d, 1H), 7,21 (m, 2H), 7,05 (m, 1H), 6,99 (d, 1H), 6,78 (m, 3H), 6,23 (d, 1H), 5,55 (s, 2H), 5,09 (s, 2H), 3,92 (m, 4H), 4,81 (d, 1H), 4,00 (s, 2H), 3,94 (s, 3H).

3,89 (d, 1H), 3,62 (m, 9H), 3,53 (m, 8H), 2,90 (m, 3H), 2,66 (t, 2H), 2,37 (t, 2H), 1,51 (m, 2H), 1,29 (m, 2H), 1,17 (m, 2H), 0,87 (t, 3H). LRMS [M+H] = 1045,4.

Ejemplo 63

Síntesis de N-(2-((5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-metil-5-oxopentan-2-il)disulfanil)etil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida (C-63)



Etapa 1: Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-5-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), 4-metil-4-(metildisulfanil)pentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (1,3 equiv.), base de Huenig (20,0 equiv.) y DMF (0,03 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-C18 ISCO (ACN:H₂O, con TFA como modificador) y luego se liofilizó para dar 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-metil-4-(metildisulfanil)pentan-1-ona en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: LCMS [M+H] = 614,3.

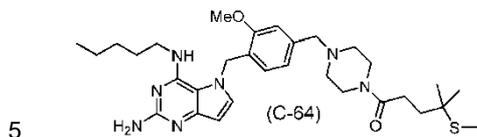
Etapa 2: Un matraz de fondo redondo se cargó con 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-metil-4-(metildisulfanil)pentan-1-ona (1,0 equiv.), (2S,3S)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol (1,0 equiv.) y dimetilacetamida:H₂O (1:1, 0,03 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego por RP-C18 ISCO (ACN:H₂O, con TFA como modificador) y luego se liofilizó para dar 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-mercapto-4-metilpentan-1-ona en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: LCMS [M+H] = 568,3.

Etapa 3: Un matraz de fondo redondo se cargó con 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-mercapto-4-metilpentan-1-ona (1,0 equiv.), 2-piridin-2-il)disulfanil)etan-1-amina sal HCl (2,0 equiv.), base de Huenig (10,0 equiv.) y THF:PBS (1:1, 0,03 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción bruta se purificó luego utilizando RP-C18 ISCO (ACN:H₂O, con TFA como modificador) y luego se liofilizó para dar 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-mercapto-4-((2-aminoetil)disulfanil)-4-metilpentan-1-ona en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: LCMS [M+H] = 643,4.

Etapa 4: Un matraz de fondo redondo se cargó con 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-((2-aminoetil)disulfanil)-4-metilpentan-1-ona (1,0 equiv.), ácido 3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoico (1,0 equiv.), base de Huenig (5,0 equiv.), HATU (1,0 equiv.) y DMF (0,02 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego utilizando RP-C18 ISCO (ACN:H₂O, con TFA como modificador) y luego se liofilizó para dar N-(2-((5-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-metil-5-oxopentan-2-il)disulfanil)etil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanamida (C-63) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,37 (d, 1H), 7,26 (d, 1H), 7,08 (m, 1H), 6,83 (d, 1H), 6,81 (s, 2H), 6,24 (d, 1H), 5,58 (s, 2H), 4,37 (s, 2H), 4,20 (a, 4H), 3,97 (s, 3H), 3,75 (t, 2H), 3,55 (t, 2H), 3,38 (m, 2H), 3,38 (a, 4H), 2,72 (t, 2H), 2,55 (m, 2H), 2,45 (t, 2H), 1,89 (m, 2H), 1,54 (m, 2H), 1,31 (m, 8H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H] = 794,4.

Ejemplo 64

Síntesis de 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-metil-4-(metiltio)pentan-1-ona (C-64)



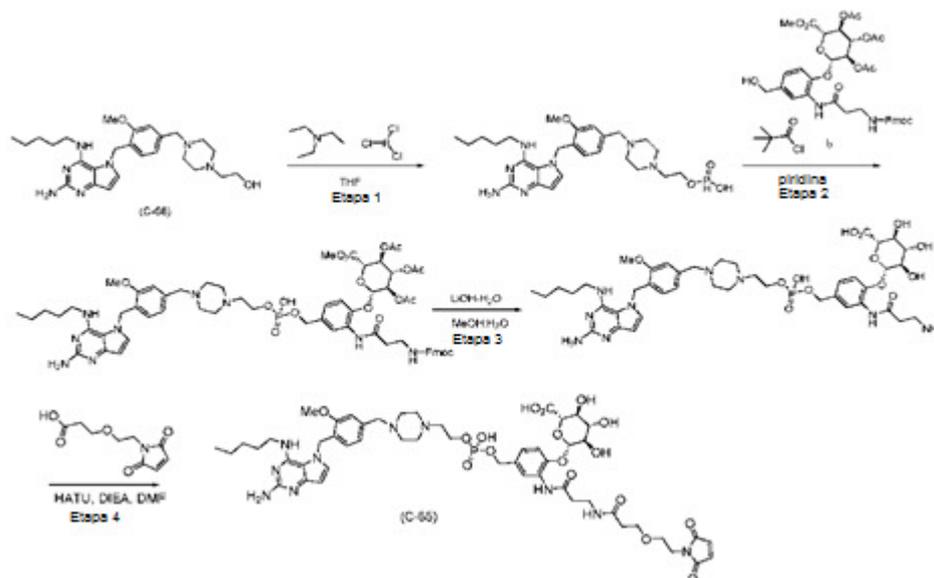
1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-metil-4-(metiltio)pentan-1-ona (C-63) se preparó siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto intermedio Int-1, excepto utilizando 4-metil-4-(metiltio)-1-(piperazin-1-il)pentan-1-ona en lugar de piperazina-1-carboxilato de terc.-butilo en la etapa 3. La mezcla de reacción bruta se purificó luego utilizando RP-C18 ISCO (ACN:H₂O, con TFA como modificador) y luego se liofilizó para dar 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-4-metil-4-(metiltio)pentan-1-ona (C-64) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,36 (d, 1H), 7,25 (d, 1H), 7,05 (m, 1H), 6,81 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,58 (s, 2H), 4,34 (s, 2H), 3,90 (a, 4H), 3,96 (s, 3H), 3,55 (t, 2H), 3,28 (a, 4H), 2,55 (m, 2H), 1,95 (s, 3H), 1,80 (m, 2H), 1,54 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 1,27 (s, 6H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H] = 582,4.

10

15

Ejemplo 65

20 **Síntesis de ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-il)etoxi)(hidroxil)fosforil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxílico (C-65)**



25 Etapa 1: Un matraz de fondo redondo se cargó con 2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etan-1-ol (C-68) (1,0 equiv.), triclorofosfano (3,0 equiv.), trietilamina (9,0 equiv.) y THF (0,2 M) a 0°C y se deja agitar durante 1 h. La reacción se enfrió luego bruscamente mediante la adición lenta de agua helada y se lavó con EtOAc 3 veces. La capa acuosa que contenía el producto deseado se liofilizó a continuación. Hidrógeno-fosfato de 2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etilo se aisló y se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional: LCMS [M+H] = 546,3.

30

Etapa 2: Un matraz de fondo redondo se cargó con triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonyl)amino)propanamido)-4-(hidroximetil)fenoxi)-6-(metoxycarbonyl)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triilo (1,0 equiv.), hidrógeno-fosfato de 2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etilo (2,0 equiv.), cloruro de pivaloilo (42,0 equiv.) y piridina (0,03 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. En este punto se añadió diioduro (1,06 equiv.) en piridina:H₂O (1:0,1, 0,14 M) y la mezcla se agitó durante 10 min. La mezcla de reacción bruta se purificó luego utilizando RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para obtener triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonyl)amino)propanamido)-4-(((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-

35

40

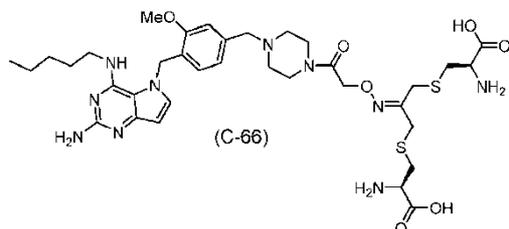
il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: LCMS [M+H] = 1292,5.

5 Etapa 3: Un matraz de fondo redondo se cargó con triacetato de (2S,3R,4S,5S,6S)-2-(2-(3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)propanamido)-4-(((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)metil)fenoxi)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triilo (1,0 equiv.), hidróxido de litio-H₂O (10,0 equiv.) y MeOH:H₂O (3:1,5, 0,007 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó luego utilizando RP-C18 ISCO (ACN:H₂O, con TFA como modificador) y luego se liofilizó para dar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)metil)-2-(3-aminopropanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: LCMS [M+H] = 930,4.

15 Etapa 4: Un matraz de fondo redondo se cargó con ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)metil)-2-(3-aminopropanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (1,0 equiv.), ácido 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanoico (1,0 equiv.), base de Huenig (6,0 equiv.), HATU (1,0 equiv.) y DMF (0,005 M). La reacción se mantuvo agitando a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla de reacción se purificó luego por RP-HPLC (TFA al 0,035% en ACN: TFA al 0,05% en H₂O, columna C18) para proporcionar ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(4-(((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazina-1-il)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)metil)-2-(3-(3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)propanamido)propanamido)fenoxi)-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (C-65) en forma de un sólido en forma de la sal de TFA: ¹H RMN (CD₃OD): δ 8,19 (s, 1H), 7,37 (d, 1H), 7,14 (m, 3H), 6,79 (s, 2H), 6,77 (d, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,53 (s, 2H), 4,86 (s, 2H), 4,84 (d, 1H), 4,08 (s, 2H), 3,95 (d, 1H), 3,92 (s, 3H), 4,00 (a, 4H), 3,76 (s, 2H), 3,62 (m, 5H), 3,53 (m, 10H), 3,27 (m, 2H), 2,85 (m, 4H), 2,63 (m, 2H), 2,37 (t, 2H), 1,52 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 1,17 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H/2Z] = 563,4.

Ejemplo 66

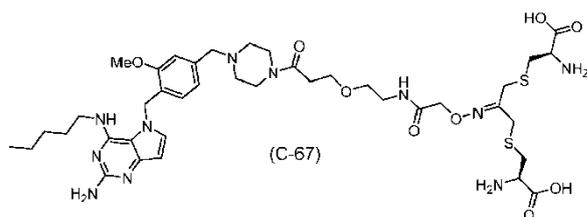
30 **Síntesis de ácido (2R,2'R)-3,3'-((2-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-oxoetoxi)imino)propano-1,3-diil)bis(sulfanodiil))bis(2-aminopropanoico (C-66)**



35 Un matraz de fondo redondo se cargó con 1-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-aminooxi)etan-1-ona (C-35) (2,4 equiv), ácido (2R,2'R)-3,3'-((2-oxopropano-1,3-diil)bis(sulfanodiil))bis(2-aminopropanoico (1,0 equiv.) y etanol (0,02 M). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción bruta se purificó utilizando RP-C18 ISCO (ACN:H₂O, con TFA como modificador) y luego se liofilizó para dar ácido (2R,2'R)-3,3'-((2-((2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-2-oxoetoxi)imino)propano-1,3-diil)bis(sulfanodiil))bis(2-aminopropanoico (C-66) en forma de un sólido: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,35 (d, 1H), 7,28 (d, 1H), 7,05 (m, 1H), 6,80 (d, 1H), 6,23 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,32 (s, 2H), 4,20 (m, 1H), 4,05 (m, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,81 (m, 4H), 3,55 (m, 2H), 3,44 (m, 2H), 3,20 (m, 4H), 2,96 (m, 1H), 2,88 (m, 1H), 1,53 (m, 2H), 1,31 (m, 2H), 1,18 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H] = 789,3.

45 **Ejemplo 67**

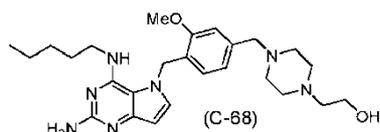
50 **Síntesis de ácido (R)-2-amino-6-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)metil)-17-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrol[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-10,17-dioxo-8,14-dioxa-4-tia-7,11-diazaheptadec-6-enoico (C-67)**



Un matraz de fondo redondo se cargó con N-(2-(3-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-3-oxopropoxi)etil)-2-(aminooxi)acetamida (C-37) (2,4 equiv), ácido (2R,2'R)-3,3'-((2-oxopropano-1,3-diil)bis(sulfanodil))bis(2-aminopropanoico) (1,0 equiv) y etanol (0,02 M). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción bruta se purificó utilizando RP-C18 ISCO (ACN:H₂O, con TFA como modificador) y luego se liofilizó para dar ácido (R)-2-amino-6-(((R)-2-amino-2-carboxietil)tio)metil)-17-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)-10,17-dioxo-8,14-dioxo-4-tia-7,11-diazaheptadec-6-enoico (C-67) en forma de un sólido: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,36 (d, 1H), 7,29 (d, 1H), 7,07 (m, 1H), 6,80 (d, 1H), 6,24 (d, 1H), 5,57 (s, 2H), 4,57 (s, 2H), 4,31 (m, 2H), 4,11 (m, 1H), 4,03 (m, 1H), 3,95 (s, 3H), 3,86 (a, 4H), 3,73 (t, 2H), 3,54 (m, 6H), 3,40 (m, 2H), 3,20 (m, 8H), 2,96 (m, 2H), 2,67 (t, 2H), 1,52 (m, 2H), 1,30 (m, 2H), 1,19 (m, 2H), 0,88 (t, 3H). LRMS [M+H] = 904,4.

Ejemplo 68

Síntesis de 2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etan-1-ol (C-68)



Un matraz de fondo redondo se cargó con 5-(2-metoxi-4-(piperazin-1-ilmetil)bencil)-N4-pentil-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidina-2,4-diamina (Int-1, 1,0 equiv.), 2-bromoetan-1-ol (1,3 equiv.), trietilamina (20,0 equiv.) y acetonitrilo (0,03 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción bruta se purificó entonces mediante cromatografía ISCO (MeOH al 0 - 10%:DCM) para proporcionar 2-(4-(4-((2-amino-4-(pentilamino)-5H-pirrolo[3,2-d]pirimidin-5-il)metil)-3-metoxibencil)piperazin-1-il)etan-1-ol (C-68) en forma de un sólido: ¹H RMN (CD₃OD): δ 7,22 (d, 1H), 7,08 (d, 1H), 6,83 (d, 1H), 6,55 (d, 1H), 6,10 (d, 1H), 5,39 (s, 2H), 3,93 (s, 3H), 3,66 (t, 2H), 3,50 (s, 2H), 3,32 (m, 2H), 3,20 (s, 1H), 2,51 (m, 10H), 1,37 (m, 2H), 1,27 (m, 2H), 1,25 (s, 1H), 1,12 (m, 2H), 0,86 (t, 3H). LRMS [M+H] = 482,4.

Ejemplo 69

Compuestos de Fórmula (I) se ensayaron para medir su actividad como agonistas del receptor 7 tipo toll.

Ensayo del gen informador

Células del riñón embrionario humano 293 (HEK293) se transfectaron de manera estable con TLR7 humano y un vector informador de luciferasa dirigido por NF-κB (pNifty-Luciferase). Como ensayo de control, se utilizaron HEK293 normales transfectadas con pNifty-Luc. Las células se cultivaron en DMEM complementado con L-glutamina 2 mM, FBS inactivado por calor al 10%, penicilina y estreptomina al 1%, puromicina 2 µg/ml (InvivoGen n° ant-pr-5) y 5 µg/ml de blasticidina (Invitrogen n° 46-1120). El tampón de ensayo Bright-Glo™ Luciferase y sustrato y fueron suministrados por Promega n° E263B y n° E264B (sustrato de ensayo y tampón, respectivamente). Greiner bio-one (n° 789163-G) suministró placas de fondo transparente de 384 pocillos y fueron placas personalizadas con código de barras.

Las células se colocaron en placas a razón de 25.000 células/pocillo en placas de 384 pocillos en un volumen final de 50 µl de medio. Se permitió que las células se adhirieran a las placas después de un cultivo durante la noche (18 horas) a 37°C y 5% de CO₂. Los compuestos de control positivo y experimental diluidos en serie se dispensaron luego a cada uno de los pocillos y se incubaron durante 7 horas a 37°C y 5% de CO₂. Las células estimuladas con DMSO solo también sirven como controles negativos. Después de la incubación, se añadieron 30 µl del tampón de ensayo de premezcla y tampón de sustrato a cada uno de los pocillos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La señal de luminiscencia se leyó en una máquina CLIPR con un tiempo de integración de 20 segundos por placa.

Se generan curvas de dosis-respuesta para cada uno de los compuestos y se determinaron los valores de CE₅₀ como la concentración que da el 50% de la señal máxima.

Resultados de Ensayo Seleccionado

Diversos compuestos de Fórmula (I), en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, exhiben propiedades farmacológicas, por ejemplo, según se indicado por los tests *in vitro* descritos en esta solicitud. El valor de CE₅₀ en esos experimentos se da como la concentración del compuesto de ensayo en cuestión que provoca una respuesta a medio camino entre la respuesta inicial y la máxima. En otros ejemplos, compuestos de Fórmula (I) tienen valores de CE₅₀ en el intervalo de 1 nM a 2 µM. En otros ejemplos, compuestos de Fórmula (I) tienen valores de CE₅₀ en el intervalo de 1 nM a 1 µM. En otros ejemplos, compuestos de Fórmula (I) tienen valores de CE₅₀ en el intervalo de 1 nM a 500 nM. En otros ejemplos, compuestos de Fórmula (I) tienen valores de CE₅₀ en el intervalo de 1 nM a 250 nM. En otros ejemplos, compuestos de Fórmula (I) tienen valores de CE₅₀ en el intervalo de 1 nM a 100 nM. En otros ejemplos, compuestos de Fórmula (I) tienen valores de CE₅₀ en el intervalo de 1 nM a 50 nM. En otros ejemplos, compuestos de Fórmula (I) tienen valores de CE₅₀ en el intervalo de 1 nM a 25 nM. En otros ejemplos, compuestos de Fórmula (I) tienen valores de CE₅₀ en el intervalo de 1 nM a 10 nM.

Para ilustrar la actividad *in vitro* de los compuestos de la invención, los valores de CE₅₀ para la estimulación de TLR7 por ciertos compuestos de Fórmula (I) se enumeran en la Tabla 2. Se cree que el aducto de cisteína son supuestos catabolitos que surgen de la degradación dentro del lisosoma. (Bioconjugate Chem. 2006, 17, 114-124). Ciertos compuestos de la Tabla 2 son el resultado de la derivatización del compuesto original correspondiente con cisteína.

Tabla 2

Número compuesto	del	HEK293 TLR7 Humano CE ₅₀ (nM)	Número compuesto	del	HEK293 TLR7 Humano CE ₅₀ (nM)
C-2		10	C-36		4
C-3		96	C-37		57
C-4		35	C-38		278
C-6		16	C-39		192
C-7		77	C-40		2101
C-8		32	C-41		52
C-10		157	C-42		1
C-12		144	C-43		6
C-14		8	C-44		2
C-16		289	C-45		11
C-18		518	C-48		1900
C-19		2	C-49		264
C-20		11	C-51		80
C-22		598	C-53		753
C-24		277	C-57		16
C-26		134	C-64		3
C-28		230	C-66		2
C-34		585	C-67		30
C-35		5	C-68		<1

Ejemplo 70

Generación de conjugados de agonistas de TLR7 anti-HER2 por conjugación de agonistas de TLR7 a residuos cisteína específicos de mutantes de anticuerpos anti-HER2

Preparación de anticuerpo anti-HER2 con mutaciones específicas para Cisteína (Cvs)

La preparación de anticuerpos anti-HER2, p. ej., trastuzumab, con mutaciones de cisteína específicas del sitio se ha descrito previamente en los documentos WO 2014/124316 y WO 2015/138615. Brevemente, el ADN que codifica regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo anti-HER2, p. ej., trastuzumab, se sintetizó

químicamente y se clonó en dos vectores de expresión de mamíferos, pOG-HC y pOG-LC, que contienen regiones constantes de IgG1 humana y cadena ligera kappa humana. Los vectores contienen un promotor de CMV y una secuencia señal: MKTFILLLWVLLLWVIFLLPGATA (SEQ ID NO: 27). Se empleó mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para preparar construcciones mutantes Cys del anticuerpo anti-HER2, y las secuencias de construcciones mutantes Cys se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

Por ejemplo, la cisteína se puede introducir en una o más de las siguientes posiciones (todas las posiciones por numeración de la UE) en un anticuerpo anti-HER2: (a) posiciones 152, 360 y/o 375 de la cadena pesada del anticuerpo, y (b) posiciones 107, 159 y/o 165 de la cadena ligera de anticuerpos. Por ejemplo, la cisteína se puede introducir en la posición 152 de la cadena pesada, dando como resultado un mAb4 anti-HER2, que tiene una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 30.

Mutantes Cys del anticuerpo anti-HER2 se expresaron en células 293 Freestyle™ co-transfectando plásmidos de cadena pesada y cadena ligera utilizando métodos de transfección transitoria tal como se describió previamente (Meissner, et al., *Biotechnol Bioeng.* 75:197-203 (2001)). Los anticuerpos expresados se purificaron de los sobrenadantes celulares mediante cromatografía de afinidad de proteína A estándar.

Se utilizaron métodos similares para clonar regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de trastuzumab en dos vectores para la expresión en células CHO. El vector de la cadena pesada codifica la región constante del anticuerpo IgG1 humano, incluye un péptido señal (MPLLLLPLWAGALA) (SEQ ID NO: 28), un promotor CMV para impulsar la expresión de la cadena pesada y secuencias señal y de selección apropiadas para la transfección estable en Células CHO. El vector de la cadena ligera codifica la región constante de la cadena ligera kappa humana, incluye un péptido señal (MSVLTQVLALLLWLTGTRC) (SEQ ID NO: 29), un promotor CMV para impulsar la expresión de la cadena ligera y secuencias señal y de selección apropiadas para una transfección estable en células CHO. Para producir anticuerpos, un vector de cadena pesada y un vector de cadena ligera se co-transfectaron en una línea celular CHO. Las células se sometieron a selección, y las células transfectadas de forma estable se cultivaron en condiciones optimizadas para la producción de anticuerpos. Los anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes celulares mediante cromatografía de afinidad de proteína A estándar.

Se realizaron mutaciones adicionales en la región constante de los vectores de anticuerpos utilizando métodos de mutagénesis estándares.

Reducción, re-oxidación y conjugación de anticuerpos anti-HER2 mutantes Cys contra agonistas de TLR7

Compuestos de Fórmula (I) de la invención que comprenden un enlazador se conjugaron con residuos Cys modificados genéticamente en un anticuerpo utilizando métodos descritos en Junutula JR, y col., *Nature Biotechnology* 26:925-932 (2008).

Debido a que los residuos Cys modificados genéticamente en anticuerpos expresados en células de mamíferos son modificados por aductos (disulfuros) tales como el glutatión (GSH) y/o la cisteína durante la biosíntesis (Chen *et al.* 2009), la Cys modificada tal como se expresó inicialmente no reacciona a los reaccionantes reactivos de tiol tales como grupos maleimido o bromo-acetamida o yodo-acetamida. Para conjugar los residuos Cys modificados genéticamente, aductos de glutatión o cisteína deben separarse mediante la reducción de disulfuros, lo que generalmente implica la reducción de todos los disulfuros en el anticuerpo expresado. Esto puede lograrse exponiendo primero el anticuerpo a un agente reductor tal como ditioneitol (DTT), seguido de una re-oxidación de todos los enlaces disulfuro nativos del anticuerpo para restaurar y/o estabilizar la estructura funcional del anticuerpo. Por consiguiente, para reducir los enlaces disulfuro nativos y el enlace disulfuro entre los aductos de cisteína o GSH de los residuos Cys modificados genéticamente, se añadió DTT recién preparado a mutantes Cys previamente purificados de trastuzumab, a una concentración final de 10 mM o 20 mM. Después de la incubación de anticuerpos con DTT a 37°C durante 1 hora, se dializaron mezclas contra PBS durante tres días con intercambio de tampón diario para separar el DTT y re-oxidar los enlaces disulfuro nativos. El proceso de re-oxidación se controló mediante HPLC de fase inversa, que es capaz de separar el tetrámero de anticuerpos de las moléculas individuales de cadena pesada y ligera. Las reacciones se analizaron en una columna PRLP-S 4000A (50 mm x 2,1 mm, Agilent) calentada a 80°C y la elución de la columna se realizó mediante un gradiente lineal de acetonitrilo al 30-60% en agua que contenía TFA al 0,1% a un caudal de 1,5 ml / min. La elución de las proteínas de la columna se controló a 280 nm. Se permitió que continuara la diálisis hasta que se completara la re-oxidación. La re-oxidación restaura los disulfuros intra-cadena e inter-cadena, mientras que la diálisis permite que las cisteínas y los glutationes conectados a los residuos Cys recientemente introducidos se separen por diálisis.

Después de la re-oxidación, se añadieron compuestos que contienen maleimida a anticuerpos re-oxidados en tampón PBS (pH 7,2) en relaciones típicamente de 1,5:1, 2:1 o 5:1 a Cys modificadas genéticamente, y se realizaron incubaciones durante 1 hora. Típicamente, el exceso de compuesto libre se separó mediante purificación sobre resina de Proteína A mediante métodos estándares, seguido de intercambio de tampón en PBS.

Mutantes Cys del anticuerpo anti-HER2, p. ej., trastuzumab, se redujeron alternativamente y se re-oxidaron utilizando un método sobre resina. Perlas de Proteína A Sepharose (1 ml por cada 10 mg de anticuerpo) se equilibraron en PBS (sin sales de calcio o magnesio) y luego se añadieron a una muestra de anticuerpo en modo discontinuo. Se preparó un material de cisteína 0,5 M disolviendo 850 mg de cisteína HCl en 10 ml de una solución preparada añadiendo 3,4 g de NaOH a 250 ml de fosfato de sodio 0,5 M pH 8,0 y luego se añadió cisteína 20 mM a la suspensión de anticuerpo/perla y se mezcló suavemente a temperatura ambiente durante 30-60 minutos. Las perlas se cargaron en una columna de gravedad y se lavaron con 50 volúmenes de lecho de PBS en menos de 30 minutos, luego la columna se tapó con perlas resuspendidas en un volumen de lecho de PBS. Para modular la velocidad de re-oxidación, se añadió opcionalmente cloruro de cobre 50 nM a 1 µM. El progreso de la re-oxidación se controló separando una pequeña muestra de ensayo de la resina, eluyendo en tampón de elución de IgG (Thermo) y analizando por RP-HPLC tal como se describió arriba. Una vez que la re-oxidación progresó hasta la compleción deseada, la conjugación podría iniciarse inmediatamente mediante la adición de un exceso 2-3 molar de compuesto sobre cisteínas modificadas genéticamente, y permitiendo que la mezcla reaccionara durante 5-10 minutos a temperatura ambiente antes de lavar la columna con al menos 20 volúmenes de columna de PBS. Los conjugados de anticuerpos se eluyeron con tampón de elución de IgG y se neutralizaron con 0,1 volúmenes de fosfato de sodio 0,5 M pH 8,0 y el tampón se cambió a PBS. Alternativamente, en lugar de iniciar la conjugación con el anticuerpo en la resina, la columna se lavó con al menos 20 volúmenes de columna de PBS, y el anticuerpo se eluyó con tampón de elución de IgG y se neutralizó con tampón pH 8,0. Luego, los anticuerpos se utilizaron para reacciones de conjugación o se congelaron instantáneamente para uso futuro.

Propiedades de los conjugados agonistas anti-HER2-TLR7

Conjugados de anticuerpo-agonista de TLR7 se analizaron para determinar el grado de conjugación. Se extrapola una relación de compuesto a anticuerpo a partir de datos de LC-MS para muestras reducidas y desglucosiladas. La LC/MS permite la cuantificación del número medio de moléculas de enlazador-carga útil (compuesto) unidas a un anticuerpo en una muestra conjugada. La HPLC separa el anticuerpo en cadenas ligera y pesada, y separa la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC) de acuerdo con el número de grupos de carga útil de enlazador por cadena. Los datos espectrales de masas permiten la identificación de las especies componentes en la mezcla, p. ej., LC, LC + 1, LC + 2, HC, HC + 1, HC + 2, etc. A partir de la carga media en las cadenas LC y HC, se puede calcular la media de la relación compuesto a anticuerpo para un conjugado de anticuerpo. Una relación de compuesto a anticuerpo para una muestra de conjugado dada representa el número medio de moléculas de compuesto (enlazador-carga útil) unidas a un anticuerpo tetramérico que contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas.

Los conjugados se perfilaron utilizando cromatografía analítica de exclusión por tamaño (AnSEC) en columnas Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) y/o Proteína KW-803 5 µm 300 x 8 mm (Shodex); la agregación se analizó en base a la cromatografía analítica de exclusión por tamaño. Los conjugados también se perfilaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica analítica (AnHIC) en una columna TSKgel Butyl-NPR Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA, EE.UU.) (100 mm x 4,6 mm, 2,5 µm) instalada en un sistema Agilent 1260 LC (Santa Clara, CA, EE.UU.) utilizando un gradiente binario de tampón A (His-HCl 20 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 6,0) y tampón B (His-HCl 20 mM, isopropanol al 15%, pH 6,0) con muestras preparadas diluyendo aproximadamente 20 µg de anticuerpo (inicialmente en PBS) con 0,5 volúmenes de sulfato de amonio 3 M. El índice de hidrofobicidad se calcula contra una regresión lineal de cuatro muestras estándar de hidrofobicidad conocida. Se reseña la hidrofobicidad del pico más grande por área.

La mayoría de los conjugados alcanzaron una alta relación de compuesto a anticuerpo, fueron principalmente monoméricos y mostraron baja hidrofobicidad (alto índice de hidrofobicidad correspondiente a la elución temprana de la columna HIC). La conjugación a través de este método da como resultado eficiencias de conjugación superiores al 95% para la mayoría de los compuestos (Tabla 3). La mayoría de los conjugados contienen menos del 4% de material dimérico y oligomérico (Tabla 3). Un índice de hidrofobicidad (HI) de 0,80 o superior se considera una característica favorable. La mayoría de los conjugados mostraron valores de HI superiores a 0,8 (Tabla 3). Esto sugiere que los conjugados se pueden hacer de manera eficiente y tienen características favorables.

Tabla 3. Propiedades de conjugados de agonistas anti-HER2-TLR7

Conjugado ^a	Eficiencia de conjugación LCMS)	de (por	Relación compuesto a anticuerpo ^b	Agregación (%) ^c	Índice de Hidrofobicidad (HI) ^d
mAb2 anti-HER2 -(C-9)	98		3,9	3,2	0,90
mAb2 anti-HER2 -(C-11)	98		3,9	3,4	0,88
mAb2 anti-HER2 -(C-13)	98		3,9	3,1	0,84

ES 2 798 649 T3

Conjugado ^a	Eficiencia de conjugación LCMS)	de (por	Relación compuesto a anticuerpo ^b	Agregación (%) ^c	Índice de Hidrofobicidad (HI) ^d
mAb2 anti-HER2 -(C-23)	98		3,9	2,9	0,87
mAb2 anti-HER2 -(C-15)	98		3,9	3,2	0,89
mAb2 anti-HER2 -(C-17)	98		3,9	3,6	0,87
mAb2 anti-HER2 -(C-5)	95		3,8	3,8	0,91
mAb2 anti-HER2 -(C-25)	98		3,9	3,0	0,90
mAb2 anti-HER2 -(C-21)	95		3,8	3,1	0,87
mAb2 anti-HER2 -(C-1)	98		3,9	3,2	0,88
mAb2 anti-HER2 -(C-27)	95		3,8	0,5	0,89
mAb2 anti-HER2 -(C-31)	88		3,5	1,1	0,87
mAb2 anti-HER2 -(C-30)	88		3,5	0,6	0,75
mAb3 anti-HER2 -(C-46)	n/a		1,9	0,7 ^e	0,81
mAb1 anti-HER2 -(C-5)	95		3,8	3,1	0,90
mAb1 anti-HER2 -(C-1)	95		3,8	2,3	0,87
mAb4 anti-HER2 -(C-29)	>95		2,0	0,6	No determinado
mAb3 anti-HER2 -(C-35)	90		3,6	1,1	0,90
mAb3 anti-HER2 -(C-37)	88		3,5	1,9	0,87
mAb3 anti-HER2 -(C-1)	n/a		7,0	0,3	0,65
mAb5 anti-HER2 -(C-69)-(C-35)	>95		2,0	0,7	0,70
mAb5 anti-HER2 -(C-69)-(C-37)	>95		2,0	1	0,70
anti-ratHER2-(C-47)	n/d		2,6	BLQ ^e	No determinado
HER2 anti-rata (C-50)	n/d		1,3	BLQ ^e	No determinado
HER2 anti-rata (C-46)	n/d		2,8	BLQ ^e	No determinado
anti-Her2-HC-E152C-S375C-(C-61)	>95		4	4	No determinado
anti-Her2-HC-E152C-S375C-(C-59)	95		3,8	0	No determinado
anti-Her2-HC-E152C-S375C-(C-60)	>95		4	4	No determinado

Conjugado ^a	Eficiencia de conjugación LCMS)	de (por	Relación compuesto a anticuerpo ^b	Agregación (%) ^c	Índice de Hidrofobicidad (HI) ^d
anti-Her2-HC-E152C-S375C-(C-64)	90		3,6	3	No determinado
anti-Her2-HC-E152C-S375C-(C-62)	>95		4	0	No determinado

^a Los anticuerpos anti-HER2 en los conjugados son el mAb1 anti-HER2 que tiene una LC de SEQ ID NO: 19; una HC de SEQ ID NO: 9. El mAb2 anti-HER2 tiene una LC de SEQ ID NO: 19; una HC de SEQ ID NO: 21. El mAb3 anti-hHER2 tiene una LC de SEQ ID NO: 19; una HC de SEQ ID NO: 23. El mAb4 anti-HER2 tiene una LC de SEQ ID NO: 19; una HC de SEQ ID NO: 30. El mAb5 anti-HER2 tiene una LC de SEQ ID NO: 19; una HC de SEQ ID NO: 32.

^b Relación compuesto a anticuerpo de acuerdo con LCMS

^c Agregación medida mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica, incluye especies diméricas y oligoméricas BLQ = por debajo del límite de cuantificación

^d Mediciones de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC) Se utilizó el tiempo de retención del pico máximo para calcular el índice de hidrofobicidad.

^e Aunque no observó la agregación ni se observó a un nivel bajo mediante AnSEC, la elución tardía de la columna sugiere un resultado no válido.

Ejemplo 71

5 Generación de conjugados de agonistas anti-HER2-TLR7 a través de la reducción parcial de enlaces disulfuro nativos de anticuerpos anti-HER2 no modificados genéticamente

Algunos compuestos de la invención también se pueden conjugar con residuos cisteína nativos de anticuerpos no modificados genéticamente mediante un procedimiento que implica la reducción parcial de los anticuerpos (Doronina, S.O. et al., Nat. Biotechnol. 21, 778-784, 2003). Los enlaces disulfuro entre cadenas e intra-cadenas del anticuerpo anti-HER2 (a una concentración de 5 a 10 mg/ml) se redujeron primero parcialmente en PBS que contenía EDTA 2 mM añadiendo TCEP a una concentración final de 10 mM e incubando la mezcla a 37°C durante 1 hora. Después de la desalación y la adición de detergente PS-20 al 1% p/v, los anticuerpos parcialmente reducidos (1-2 mg/ml) se hicieron reaccionar durante la noche a 4°C con 0,5 a 1 mg de compuesto agonista de TLR7 por cada 10 mg de anticuerpo. Los conjugados resultantes se purificaron mediante cromatografía de Proteína A mediante métodos estándares y se intercambiaron tampones a PBS, y se perfilaron mediante MS, AnSEC y AnHIC tal como se describe arriba. La relación medida de compuesto a anticuerpo, el comportamiento de agregación y los datos de hidrofobicidad se resumen en la Tabla 3 para un ejemplo de conjugado realizado por reducción de mAb3 anti-HER2 seguido de conjugación con el Compuesto C-1.

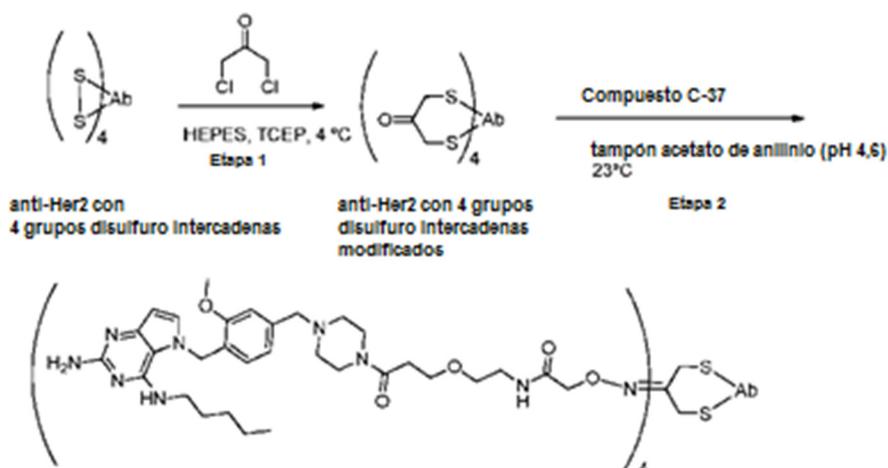
Ejemplo 72

25 Generación de conjugados de agonistas anti-HER2-TLR7 utilizando 1,3-dicloropropan-2-ona para reconectar enlaces disulfuro intercadenas nativos de anticuerpos anti-HER2 no modificados genéticamente

En un método alternativo (Solicitud de Patente de Estados Unidos 20150150998), los enlaces disulfuro intercadenas de un anticuerpo anti-HER2 recombinante no modificado genéticamente pueden modificarse y conjugarse con un compuesto agonista de la invención utilizando las siguientes dos etapas.

30 Esquema 15

Conjugación en dos etapas con residuos cisteína nativos utilizando un puente de 1,3 dicloropropan-2-ona seguido de la adición a las cetonas introducidas.



Etapa 1: Reducción de los puentes disulfuro intercadenas y re-punteo con 1,3-dicloropropan-2-ona: TCEP • HCl (1,63 mM) se añadió a una solución de anticuerpo mAb3 anti-HER2 (136 µM) y 1,3- dicloropropan-2-ona (33 mM) en tampón HEPES 0,1 M (pH 8,0) a 4°C. La mezcla resultante se agitó suavemente a 4°C durante 16 h. La mezcla de reacción se intercambiò entonces con tampón en PBS utilizando una columna de desalación PD-10 (GE Healthcare). La solución resultante se concentró utilizando un filtro Amicon 50K para dar el anticuerpo anti-HER2 modificado. La modificación fue confirmada por ESI-MS (Eluyente A: agua + ácido fórmico al 0,1%; Eluyente B: Acetonitrilo + ácido fórmico al 0,04%; Gradiente: de 3 a 80% de B en 2 minutos - Caudal 1,0 ml/min. Columna: . Proswift Monolith 4,6*50 mm 40°C); 145398 Da (después de deglicosilación mediante PNGase F).

Etapa 2: Conjugación de los agonistas Compuesto (C-37): el anticuerpo anti-HER2 modificado (30 mg/ml) se hizo reaccionar con Compuesto (C-37) 3,0 mM que comprende un resto amino-oxi enlazado en tampón acetato de anilino 0,1 M (pH 4,6) a una concentración final de 15% (v/v) de DMSO. La mezcla de reacción se incubó durante aproximadamente 16 horas a 23°C. La mezcla de reacción se intercambiò entonces con tampón a PBS (pH 7,4) utilizando filtros Amicon 50K, dando lugar al conjugado compuesto-anti-HER2 modificado.

Se obtuvieron conjugados similares utilizando el Compuesto (C-35) para conjugar con el anticuerpo anti-HER2 modificado.

Los conjugados fueron perfilados por MS, AnSEC y AnHIC tal como se describió arriba. La relación medida de compuesto a anticuerpo, el comportamiento de la agregación y los datos de hidrofobicidad se resumen en la Tabla 3. Los dos conjugados de ejemplo lograron una alta relación de compuesto a anticuerpo, fueron principalmente monoméricos y mostraron una baja hidrofobicidad (alto índice de hidrofobicidad correspondiente a la elución temprana de la columna HIC). La conjugación a través de este método da como resultado eficiencias de conjugación superiores al 85% (Tabla 3). Los conjugados contienen menos del 2% de material dimérico y oligomérico (Tabla 3). Los conjugados mostraron valores de HI superiores a 0,85 (Tabla 3). Esto sugiere que los conjugados se pueden hacer de manera eficiente y tienen características favorables.

Ejemplo 73

Generación de conjugados de agonistas de TLR7 anti-HER2 por conjugación a residuos lisina nativos de anticuerpos anti-HER2

Los anticuerpos nativos pueden funcionalizarse con ciertos compuestos de la invención a través de métodos establecidos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-ratHER2 (7.16.4; adquirido de Bio X Cell; West Lebanon, NH) en PBS pH 7,2 a 4 mg/ml se mezcló con 760 µM de Compuesto C-47 con una concentración final de DMSO de 20% (v/v). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante la noche, y luego se enfrió bruscamente con Tris 50 mM pH 8. Se utilizaron métodos similares para preparar conjugados con mAb3 anti-HER2 o con Compuestos agonistas C-46 y C-50. Los conjugados de anticuerpos resultantes se purificaron por cromatografía de Proteína A por métodos estándares y se intercambiò el tampón por PBS.

Los conjugados de anticuerpos fueron perfilados por MS, AnSEC y AnHIC tal como se describió arriba. La relación medida de compuesto a anticuerpo, el comportamiento de la agregación y los datos de hidrofobicidad se resumen en la Tabla 3. Varios conjugados de anticuerpos que habían reaccionado con lisina muestran elución tardía y/o colas de

picos en las columnas AnSEC utilizadas, lo que sugiere la interacción de la columna, lo que hizo difícil la detección de agregado.

Ejemplo 74

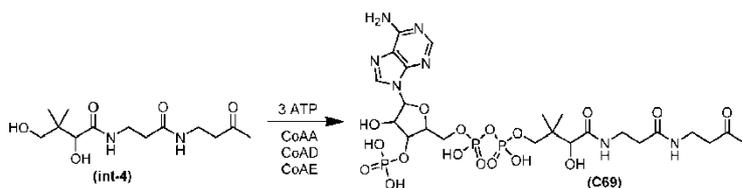
Generación de conjugados agonistas de TLR7 anti-HER2 utilizando conjugación en dos etapas de un anticuerpo mutante anti-HER2 etiquetado con A1 con compuestos agonistas que contienen un grupo reactivo amino-oxi

La 4'-fosfopanteteinilación postraducciona es un método versátil para el marcaje específico para el sitio de proteínas recombinantes con moléculas pequeñas estructuralmente diversas (Yin J, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 15815-15820, 2005; Zhou Z, et al., ACS Chem. Biol. 2: 337-346, 2007). Este enfoque enzimático, que se basa en la acción catalítica de 4'-fosfopanteteinil transferasas (PPTasas) promiscuas, se adoptó para la preparación de conjugados de anticuerpos altamente homogéneos (véase el documento WO2013184514). El marcaje enzimático se logra incorporando secuencias de péptidos S6, ybbR y A1 de 11 o 12 meros en diversos sitios de la región constante de un anticuerpo. Por ejemplo, una etiqueta A1 de secuencia GDSLDMLEWLSM (SEQ ID NO: 31) se puede incorporar detrás del residuo E388 (numeración de la UE) en la cadena pesada del mAb2 anti-HER2 para producir mAb5 anti-HER2, que tiene una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 19 y una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 32. Una estrategia es un método de dos etapas para preparar conjugados de anticuerpo-compuesto específicos para el sitio mediante 4'-fosfopanteteinilación postraducciona (véase el documento WO2013184514). La primera etapa de esta estrategia se basa en el marcaje catalizado por PPTasa de un anticuerpo etiquetado con péptidos con un análogo de CoA que contiene un grupo bioortogonal tal como un resto azido, alqueno, alquino, cetona o aldehído. Después de la purificación por afinidad del anticuerpo marcado bioortogonalmente, la segunda etapa del método de dos etapas implica la conjugación de un compuesto que comprende un resto reactivo con el grupo bioortogonal. A modo de ejemplo, la siguiente sección describe el método de dos etapas para anticuerpos mutantes anti-HER2 que contienen una inserción de etiqueta A1 en un sitio específico dentro de la región constante de la cadena pesada. Además, aunque el método de dos etapas se ejemplifica para la química de ligamiento de oxima, esta estrategia se puede extender a otras químicas bioortogonales, tales como la química clic, incluida la química clic sin cobre, el ligamiento de Staudinger, la química de clic basada en isonitrilo y el ligamiento de tetrazina

La química del ligamiento de oxima ha sido utilizada por varios grupos de investigación como un método bioortogonal eficiente para la preparación de conjugados de proteínas específicos para el sitio (Axup JY, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 109:16101-16106, 2012; Rabuka D, et al., Nat Protoc. 7:1052-1067, 2012). Con el fin de combinar la 4'-fosfopanteteinilación postraducciona con ligamiento de oxima, se preparó un análogo de CoA modificado con cetona a partir de la molécula precursora de pantotenato correspondiente (Compuesto int-4) utilizando las enzimas biosintéticas de CoA CoAA, CoAD y CoAE (Worthington AS, Burkart MD (2006) Org Biomol Chem. 4:44-46) (Kosa NM, Haushalter RW, Smith AR, Burkart MD (2012) Nat Methods 9:981-984). Después, se utilizó la catálisis con PPTasa para conjugar enzimáticamente el grupo cetona bioortogonal con especificidad por un sitio en la etiqueta A1 incorporada de un anticuerpo anti-HER2. Específicamente, 2,5 μM de mAb5 anti-HER2 se conjugaron con 30 μM de análogo de cetona-CoA (Compuesto C-69) (12 equivalentes molares en relación con el anticuerpo) en presencia de aproximadamente 0,5 μM de AcpS PPTasa de *Escherichia coli* durante 2 días a 37°C en tampón Tris-HCl 75 mM (pH 8,0) complementado con MgCl_2 12,5 mM y NaCl 20 mM. Para impulsar la reacción de conjugación a la completación, la mezcla de reacción se complementó con Sfp PPTase de *B. subtilis* aproximadamente 1 μM , mientras que la concentración del Compuesto C-69 se incrementó a aproximadamente 60 μM . La reacción se incubó durante otros 4 días a temperatura ambiente. El marcaje del anticuerpo mAb5 anti-HER2 con el análogo de cetona-CoA (Compuesto C-69) se verificó obteniendo espectros ESI-MS desconvolucionados de la muestra reducida y desglucosilada. Las masas observadas estaban de acuerdo con los pesos moleculares calculados de las cadenas pesadas funcionalizadas con cetonas correspondientes. Después de separar las enzimas PPTasa y el exceso de análogo de cetona-CoA por cromatografía de afinidad de Proteína A (MabSelect SuRe, GE Healthcare Life Sciences), el anticuerpo activado con cetona, mAb5 anti-HER2-(C-69) se eluyó con tampón de elución Pierce™ IgG (Thermo Fisher Scientific) seguido de neutralización inmediata con tampón Tris-HCl 1 M (pH 8,0). La solución de anticuerpo neutralizado se intercambió con tampón en PBS y se concentró utilizando un filtro Amicon 50K.

La unión específica para el sitio de un grupo cetona permitió el ligamiento de oxima posterior de un compuesto agonista a mAb5 anti-HER2-(C-69) activado por cetona como la segunda etapa del método de dos etapas. Se hicieron reaccionar 48 μM de anticuerpo funcionalizado con cetona con un exceso molar de 30 veces (1,4 mM) de los agonistas de aminooxi C-35 y C-37 en tampón acetato de anilino 100 mM (pH 4,6) que contenía DMSO al 7% (v/v). Después de 17 horas de incubación a temperatura ambiente, se separó el exceso de reactivo aminooxi por ultrafiltración con un filtro Amicon 50K y lavado repetido con PBS. Los conjugados de anticuerpos fueron perfilados por MS, AnSEC y AnHIC tal como se describió arriba. La relación medida de compuesto a anticuerpo, el comportamiento de la agregación y los datos de hidrofobicidad se resumen en la Tabla 3. Como se muestra en la Tabla 3, el método de dos etapas proporcionó un marcaje casi cuantitativo de mAb5 anti-HER2-(C-69) activado por cetona con los agonistas aminooxi C-35 y C-37.

Análogo de Cetona-Coenzima A (Compuesto C-69)



5 El compuesto (int-4) se convirtió en el análogo de CoA funcionalizado con cetona (C69) haciendo reaccionar 5 mM de compuesto (int-4) con 25 mM de ATP en presencia de CoAA de *Staphylococcus aureus* 10 μ M, CoAD de *Escherichia coli* 25 μ M y CoAE de *Escherichia coli* 20 μ M durante aproximadamente 16 h a 37°C en tampón HEPES 50 mM (pH 8,0) que contiene MgCl₂ 20 mM. Después de la centrifugación de la mezcla de reacción a 20.817 x g durante 2 min, la enzima soluble se separó por ultrafiltración a través de un filtro centrífugo Amicon Ultra con un corte de 10 kDa. La conversión enzimática de compuesto (i-4) en el análogo de CoA funcionalizado con cetona (C59) se verificó mediante la formación de mAb5 anti-HER2-(C-69)-(C-35) y mAb5 anti-HER2- (C-69)-(C-37) (véase la Tabla 3).

Ejemplo 75

Testado de estabilidad in vitro de conjugados de agonistas anti-HER2-TLR7

15 La estabilidad del enlace formado entre cargas útiles que contienen maleimida y los residuos Cys del anticuerpo se potencia mediante la hidrólisis del anillo de succinimida formado en esta reacción. Los efectos de la hidrólisis del anillo de succinimida sobre la estabilidad de los conjugados de anticuerpos preparados con compuestos agonistas de la invención se estudiaron después de la incubación *in vitro* en suero de ratón. Los cambios en las masas resultantes de la desconjugación de cargas y la hidrólisis del anillo de succinimida de las cargas de maleimida conjugadas a los anticuerpos se monitorizaron mediante LC-MS. Se ha informado que la hidrólisis del anillo de succinimida es estimulada por ciertas condiciones tales como pH elevado, temperatura elevada o sales elevadas (J. Am. Chem. Soc. 1955, 77: 3922; Biochemistry 1976, 15: 2836; Biochem. J. 1979, 179: 191-197; J Pharm Sci. 1984, 73:1767-1771; Bioorg. Med. Chem. Lett. 17: 6286-6289, 2007). Para sondear la estabilidad *in vitro* de los conjugados, se incubaron conjugados mAb2 de anticuerpo anti-HER2 a 37°C en suero de ratón al 50-70%. Se tomaron cincuenta microgramos de muestras de conjugado en cada momento (típicamente 0, 8, 24, 48 y 72 horas) y se congelaron inmediatamente. Las muestras se descongelaron posteriormente para su procesamiento y análisis. Brevemente, los anticuerpos se trataron con PNGasaF para separar los glicanos enlazados a N y una enzima proteolítica que corta cerca de la región bisagra de la cadena pesada con el fin de separar el Fab del Fc antes de la reducción con DTT para romper los enlaces disulfuro. Fab de la cadena ligera, de la cadena pesada y fragmentos Fc de la cadena pesada fueron analizados después por ESI-MS. Las poblaciones relativas de anticuerpo desconjugado, conjugados con carga útil unida con anillo de succinimida hidrolizada y conjugados con carga útil unida con anillo de succinimida intacto, se calcularon a partir de las intensidades relativas de MS de las especies de conjugados correspondientes. El grado de desconjugación y el grado de hidrólisis de succinimida se muestran en las Tablas 4 y 5 para un subconjunto de conjugados. En general, los conjugados pierden menos del 13% del compuesto cargado durante una incubación *in vitro* de 72 horas y, en general, la hidrólisis del anillo de succinimida se completa por encima del 85% en 48 horas. Ciertos compuestos de la invención, ejemplificados por el Compuesto (C-5) y el Compuesto (C-21) exhiben una estabilidad del conjugado mejorada debido a una menor susceptibilidad a la desconjugación a través de la reacción inversa de maleimida y una mayor estabilización a través de la hidrólisis del anillo de succinimida.:

40 **Tabla 4. Hidrólisis en anillo de succinimida de conjugados de agonista anti-HER2-TLR7 en función del tiempo de incubación *in vitro* en suero de ratón**

Conjugado ^a	% Apertura del anillo (MS)									
	Aducto S375C					Aducto E152C				
	0	8 h	24 h	48 h	72 h	0	8 h	24 h	48 h	72 h
mAb2 anti-HER2 -(C-9)	0	45	64	86	94	19	58	73	86	88
mAb2 anti-HER2 -(C-11)	0	52	71	91	95	0	51	66	84	87
mAb2 anti-HER2 -(C-13)	0	50	69	90	96	0	58	75	87	89
mAb2 anti-HER2 -(C-23)	20	82	93	96	96	0	60	74	86	88
mAb2 anti-HER2 -(C-15)	0	81	91	95	96	0	58	71	85	87
mAb2 anti-HER2 -(C-17)	17	64	81	94	96	0	59	75	88	90
mAb2 anti-HER2 -(C-5)	79	93	93	93	94	51	88	87	90	88
mAb2 anti-HER2 -(C-25)	18	55	73	91	95	0	61	76	87	87

Conjugado ^a	% Apertura del anillo (MS)									
	Aducto S375C					Aducto E152C				
	0	8 h	24 h	48 h	72 h	0	8 h	24 h	48 h	72 h
mAb2 anti-HER2 -(C-21)	49	97	96	96	96	26	87	91	92	92
mAb2 anti-HER2 -(C-1)	0	58	76	92	96	0	82	86	86	89
mAb2 anti-HER2 -(C-27)	35	90	97	98	100	27	82	90	90	90
mAb2 anti-HER2 -(C-31)	23	64	90	95	97	23	48	74	85	88
mAb2 anti-HER2 -(C-30)	24	59	86	97	100	25	49	76	89	90

^a El mAb2 anti-HER2 tiene una LC de SEQ ID NO: 19; una HC de SEQ ID NO: 21.

Tabla 5. Relación de compuesto a anticuerpo de conjugados de agonista anti-HER2-TLR7 en función del tiempo de incubación *in vitro* en suero de ratón

Conjugado ^a	Relación compuesto a anticuerpo									
	Aducto S375C					Aducto E152C				
	0	8 h	24 h	48 h	72 h	0.	8 h	24 h	48 h	72 h
mAb2 anti-HER2 -(C-9)	0,93	0,88	0,84	0,82	0,80	1,00	0,92	0,91	0,87	0,87
mAb2 anti-HER2 -(C-11)	0,94	0,90	0,86	0,84	0,84	1,00	0,93	0,90	0,89	0,87
mAb2 anti-HER2 -(C-13)	0,93	0,88	0,85	0,82	0,80	1,00	0,94	0,91	0,88	0,86
mAb2 anti-HER2 -(C-23)	0,93	0,93	0,86	0,86	0,86	1,00	0,95	0,93	0,92	0,92
mAb2 anti-HER2 -(C-15)	0,93	0,88	0,87	0,86	0,85	1,00	0,95	0,93	0,90	0,90
mAb2 anti-HER2 -(C-17)	0,94	0,85	0,86	0,84	0,84	1,00	0,92	0,91	0,87	0,88
mAb2 anti-HER2 -(C-5)	0,95	0,95	0,94	0,94	0,94	1,00	0,98	0,98	0,90	0,96
mAb2 anti-HER2 -(C-25)	0,92	0,89	0,87	0,85	0,85	1,00	0,96	0,95	0,93	0,92
mAb2 anti-HER2 -(C-21)	0,94	0,91	0,91	0,91	0,90	1,00	0,96	0,95	0,95	0,94
mAb2 anti-HER2 -(C-1)	0,93	0,86	0,83	0,81	0,79	1,00	0,97	0,96	0,96	0,96
mAb2 anti-HER2 -(C-27)	0,95	0,87	0,85	0,85	0,85	0,95	0,91	0,90	0,90	0,90
mAb2 anti-HER2 -(C-31)	0,94	0,88	0,84	0,81	0,80	0,85	0,93	0,88	0,87	0,85
mAb2 anti-HER2 -(C-30)	0,94	0,86	0,80	0,80	0,79	0,95	0,88	0,81	0,80	0,78

^A El mAb2 anti-HER2 tiene una LC de SEQ ID NO: 19; una HC de SEQ ID NO: 21.

5

Ejemplo 76

Ensayo *in vivo* de conjugados de agonistas anti-HER2-TLR7 en un modelo de xenoinjerto de tumor gástrico N87

10

Material y Métodos

15

Para el modelo de ratón xenoinjerto de carcinoma gástrico N87, se utilizaron ratones hembra SCID-beige de 6-8 semanas de edad (adquiridos de Harlan Laboratories) para la implantación. Células N87 (obtenidas de ATCC, Catálogo n° CRL-5822, lote de proveedor n° 7686255) se cultivaron en condiciones estériles en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ durante dos semanas. Las células se cultivaron en medio RPMI con suero bovino fetal al 10%. Las células se hicieron pasar cada 3-4 días con tripsina al 0,05%/EDTA. El día de la implantación, las células N87 se descamaron (pase x4) y se re-suspendieron en medio libre de suero RPMI1640 a una concentración de 1 x 10⁶ células y matrigel al 50%/100 µl. Las células se sometieron a pruebas de Radies para asegurar que están libres de micoplasma y virus murinos.

20

Las células N87 se implantaron con una inyección subcutánea en el flanco inferior utilizando una aguja de 28 g (100 µl de volumen de inyección). Después del implante, los tumores se midieron con un calibrador y los ratones se pesaron

dos veces por semana una vez que los tumores eran palpables. Los tumores se midieron luego dos veces por semana en dos dimensiones. Las medidas del calibrador se calcularon utilizando $(L \times W^2)/2$. Los ratones fueron alimentados con una dieta normal y alojados en instalaciones de animales SPF de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y los Reglamentos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

5 Cuando los tumores de xenoinjertos alcanzaron aproximadamente 200 mm³, se administró a los ratones por vía intravenosa 0,3-10 mg/kg de anticuerpo anti-HER2 o conjugado anti-HER2-agonista de TLR7. El anticuerpo de control del isotipo se generó expresando un anticuerpo contra una diana no encontrada en roedores y conjugando a través de métodos similares descritos para anticuerpos anti-HER2. Los tumores se midieron dos veces por semana. Los volúmenes medios de los tumores se representaron utilizando el software Prism 5 (GraphPad). Se alcanzó un punto final para los estudios de eficacia cuando el tamaño del tumor alcanzó un volumen de 2000 mm³. Después de la inyección, los ratones también fueron monitorizados en cuanto a signos de deterioro clínico. Si por alguna razón los ratones mostraron signos de morbilidad, incluyendo dificultad respiratoria, postura encorvada, disminución de la actividad, parálisis de las patas traseras, taquipnea como signo de derrames pleurales, pérdida de peso cercana al 20% o 15% más otros signos, o si se vio afectada su capacidad para realizar actividades normales (alimentación, movilidad), los ratones fueron sacrificados.

Resultados

20 Los ratones con xenoinjerto de tumor gástrico N87 se trataron por vía intravenosa con una dosis única de conjugado mAb2 anti-HER2-(C-1), en que el Compuesto (C-1) se conjuga con Cys 152 y Cys 375 de la cadena pesada del mAb2 anti-HER2, a 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg. Se observó una regresión completa de los tumores de xenoinjerto N87 en ratones tratados con conjugado mAb2 anti-HER2- (C-1) en todas las dosis testadas, incluida la dosis más baja testada-1 mg/kg (FIG. 1). No se observó regresión del tumor en ratones de xenoinjerto N87 tratados con 10 mg/kg de mAb2 anti-HER2 no conjugado solo, o un conjugado de anticuerpo de control del isotipo (C-1), en comparación con los animales no tratados (FIG. 1).

30 Los ratones con xenoinjerto de tumor gástrico N87 fueron tratados con una dosis única de mAb1 anti-HER2-(C-1) o mAb1 anti-HER2-(C-5), a razón de 0,3 mg/kg o 1 mg/kg (10 ratones por grupo). Mientras que el tratamiento con una dosis única de 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2- (C-1) condujo a una regresión completa de los tumores de xenoinjerto humano N87, 0,3 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-1) resultó en estasis del tumor (FIG. 2). De manera similar, aunque el tratamiento con una dosis única de 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) condujo a una regresión completa de los tumores de xenoinjerto humano N87, 0,3 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) resultó en una estasis del tumor (FIG. 2). Una regresión de los tumores gástricos N87 no se observó en ratones de xenoinjerto N87 tratados con un conjugado de anticuerpo de control del isotipo-(C-5) en comparación con animales no tratados. Estos datos demostraron que la regresión del tumor se puede lograr con un solo tratamiento de un conjugado anti-HER2-agonista de TLR7 (p. ej., mAb1 anti-HER2-(C-1) o mAb1 anti-HER2-(C-5), mAb2 anti-HER2-(C-1)) en una dosis baja, p. ej., 1 mg/kg.

40 En un estudio separado, los ratones con xenoinjerto de tumor gástrico N87 fueron tratados con una dosis única de mAb1 anti-HER2-(C-5), a 1 mg/kg, 3 mg/kg o 5 mg/kg (8 ratones por grupo). Si bien el tratamiento con una dosis única de 3 mg/kg o 5 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) condujo a una regresión completa de los tumores de xenoinjerto humano N87, 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) resultó en estasis del tumor (FIG. 3) en este estudio.

45 Además, los ratones con xenoinjerto de tumor gástrico N87 fueron tratados con una dosis única de mAb1 anti-HER2-(C-5), mAb1 anti-HER2-(C-35), mAb1 anti-HER2-(C-37), mAb1 anti-HER2-(C-59), mAb1 anti-HER2-(C-60), mAb1 anti-HER2-(C-61), mAb1 anti-HER2-(C-62) o mAb1 anti-HER2-(C-64) a 1 mg/kg (6 ratones por grupo). El tratamiento con una dosis única de 1 mg/kg de conjugado mAb1 anti-HER2 con diferentes compuestos dio como resultado la estasis del tumor (FIG. 4), similar a lo que se observó después de un tratamiento de dosis única de 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5).

Ejemplo 77

55 **Testado in vivo de un conjugado agonista anti-ratHER2-TLR7 en el modelo singénico de cáncer de mama MMC (ratHER2⁺)**

Material y Métodos

60 Para el modelo singeneico de cáncer de mama MMC (ratHER2⁺), ratones transgénicos FVB/N hembra de 6-10 semanas de edad que expresan el oncogén Erbb2 (c-neu) de rata activado que contiene la mutación Val⁶⁶⁴ a Glu⁶⁶⁴ (FVB-Tg(MMTV-ErbB2)NK1Mul/J; originalmente adquirido de Jackson Laboratories, criados en casa) se utilizaron para la implantación. Células MMC (derivadas de tumores obtenidos de ratones transgénicos FVB/N obtenido del Profesor Nora Disis, Universidad de Washington) se cultivaron en condiciones estériles en una incubadora de 37°C con 5% de CO₂ durante dos semanas. Las células se cultivaron en medio DMEM con suero bovino fetal al 20% y Penicilina/Estreptomina. Las células se hicieron pasar cada 3-4 días con tripsina al 0,05%/EDTA. El día de la

implantación, las células se descamaron (pase x4) y se re-suspendieron en medio libre de suero RPMI1640 a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células y matrigel al 10%/100 μl . Las células se sometieron a pruebas de Raddi para asegurar que están libres de micoplasma y virus murinos.

5 Las células MMC se implantaron con una inyección subcutánea en el flanco inferior utilizando una aguja de calibre 28 (100 μl de volumen de inyección). Después del implante, los tumores se midieron con un calibrador y los ratones se pesaron 2 veces por semana una vez que los tumores eran palpables. Los tumores se midieron luego dos veces por semana en dos dimensiones. Las medidas del calibrador se calcularon utilizando $(L \times W^2)/2$. Los ratones fueron alimentados con una dieta normal y alojados en instalaciones de animales SPF de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y los Reglamentos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

10 Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 200 mm^3 , se administró a grupos de ocho ratones por vía intravenosa 1 mg/kg de anticuerpo anti-ratHER2 (7.16.4, adquirido de Bio X Cell; West Lebanon, NH) o 1 mg/kg de conjugado anti-HER2 de rata-agonista de (anti-ratHER2-(C-46)). Los tumores se midieron dos veces por semana. Los volúmenes medios de los tumores se representaron utilizando el software Prism 5 (GraphPad). Se alcanzó un punto final para los estudios de eficacia cuando el tamaño del tumor alcanzó un volumen de 2000 mm^3 . Después de la inyección, los ratones también fueron monitorizados en cuanto a signos de deterioro clínico. Si por alguna razón los ratones mostraron signos de morbilidad, incluyendo dificultad respiratoria, postura encorvada, disminución de la actividad, parálisis de las patas traseras, taquipnea como signo de derrames pleurales, pérdida de peso cercana al 20% o 15% más otros signos, o si se vio afectada su capacidad para realizar actividades normales (alimentación, movilidad), los ratones fueron sacrificados.

Resultados

25 Para probar la eficacia de los conjugados anti-ratHER2-(C-46) en el modelo singeneico de cáncer de mama MMC ratHER2 +, los ratones portadores de tumores de mama subcutáneos MMC fueron tratados por vía intravenosa con 1 mg/kg de conjugado anti-ratHER2-(C-46), o anti-ratHER2 no conjugado (8 ratones por grupo). Como se muestra en las FIGs. 5A y 5B, se observó una regresión completa de los tumores de mama de ratón MMC (ratHER2+) en siete ratones tratados con una dosis única de conjugados anti-ratHER2-(C-46) (Figura 5A), pero solo en tres de ocho ratones tratados con el anticuerpo anti-ratHER2 desnudo (figura 5B).

Estos datos sugieren que el conjugado anti-ratHER2-(C-46) es terapéuticamente más efectivo contra el cáncer de mama singeneico ratHER2-positivo que el anticuerpo anti-ratHER2 no conjugado solo.

35 **Ejemplo 78**

Ensayo *in vivo* de conjugados de anti-HER2-agonista de TLR7 en un modelo de xenoinjerto de tumor de mama HCC1954

40 Material y Métodos

Para el modelo de ratón xenoinjerto de cáncer de mama HCC1954 se utilizaron ratones hembra SCID-beige de 6-8 semanas de edad (adquiridos de Harlan Laboratories) para la implantación. Células HCC1954 (obtenidas de ATCC, Catálogo n° CRL-2338, lote de proveedor n° 5107643) se cultivaron en condiciones estériles en una incubadora a 37°C con 5% de CO_2 durante dos semanas. Las células se cultivaron en medio RPMI con suero bovino fetal al 10%. Las células se hicieron pasar cada 3-4 días con tripsina al 0,05%/EDTA. El día de la implantación, las células HCC1954 se (recolectaron) descamaron (pase x17) y se re-suspendieron en medio libre de suero RPMI1640 a una concentración de 1×10^6 células y matrigel al 50%/100 μl . Las células se sometieron a pruebas de Raddi para asegurar que están libres de micoplasma y virus murinos.

50 Las células HCC1954 se implantaron con una inyección subcutánea en el flanco inferior utilizando una aguja de 27 G (100 μl de volumen de inyección). Después del implante, los tumores se midieron con un calibrador y los ratones se pesaron dos veces por semana una vez que los tumores eran palpables. Los tumores se midieron luego dos veces por semana en dos dimensiones. Las medidas del calibrador se calcularon utilizando $(L \times W^2)/2$. Los ratones fueron alimentados con una dieta normal y alojados en instalaciones de animales SPF de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y los Reglamentos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

60 Cuando los tumores de xenoinjertos alcanzaron aproximadamente 200 mm^3 , se administró a los ratones por vía intravenosa 1-10 mg/kg de anticuerpo anti-HER2 o conjugado anti-HER2-agonista de TLR7. El anticuerpo de control del isotipo se generó expresando un anticuerpo contra una diana no encontrada en roedores y conjugando a través de métodos similares descritos para anticuerpos anti-HER2. Los tumores se midieron dos veces por semana. Los volúmenes medios de los tumores se representaron utilizando el software Prism 5 (GraphPad). Se alcanzó un punto final para los estudios de eficacia cuando el tamaño del tumor alcanzó un volumen de 2000 mm^3 . Después de la inyección, los ratones también fueron monitorizados en cuanto a signos de deterioro clínico. Si por alguna razón los ratones mostraron signos de morbilidad, incluyendo dificultad respiratoria, postura encorvada, disminución de la

actividad, parálisis de las patas traseras, taquipnea como signo de derrames pleurales, pérdida de peso cercana al 20% o 15% más otros signos, o si se vio afectada su capacidad para realizar actividades normales (alimentación, movilidad), los ratones fueron sacrificados.

5 **Resultados**

Los ratones con xenoinjerto de tumor de mama HCC1954 fueron tratados por vía intravenosa con una dosis única de conjugado mAb1 anti-HER2-(C-5), en que el Compuesto (C-5) se conjuga con Cys 152 y Cys 375 de la cadena pesada del mAb1 anti-HER2, a 1 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg (8 ratones por grupo). Si bien el tratamiento con una dosis única de 10 mg/kg o 3 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) condujo a una regresión completa de los tumores de xenoinjerto humano HCC1954, 1 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) resultó en una regresión inicial del tumor, seguido de estasis del tumor (FIG. 6). No se observó regresión del tumor en ratones de xenoinjerto HCC1954 tratados con 10 mg/kg de mAb2 anti-HER2 no conjugado solo (FIG. 6).

Estos datos demuestran que la regresión del tumor se puede lograr en el xenoinjerto de tumor de mama HCC1954 con alta expresión de HER2 mediante un tratamiento único de un conjugado anti-HER2-agonista de TLR7 (mAb1 anti-HER2-(C-5)) a 3 mg / kg.

20 **Ejemplo 79**

Ensayo *in vivo* de conjugados de anti-HER2-agonista de TLR7 en un modelo de xenoinjerto de tumor de ovario SKOV3

Material y Métodos

Para el modelo de ratón xenoinjerto de ovario SKOV3 se utilizaron ratones hembra SCID-beige de 6-8 semanas de edad (adquiridos de Harlan Laboratories) para la implantación. Células SKOV3 (obtenidas de ATCC, Catálogo n° HTB-77, lote de proveedor n° 7349765) se cultivaron en condiciones estériles en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ durante dos semanas. Las células se cultivaron en medio 5A de McCoy con suero bovino fetal al 10%. Las células se hicieron pasar cada 3-4 días con tripsina al 0,05%/EDTA. El día de la implantación, las células SKOV3 se (recolectaron) descamaron (pase x11) y se re-suspendieron en medio libre de suero 5A de McCoy a una concentración de 5 x 10⁶ células y matrigel al 50%/100 µl. Las células se sometieron a pruebas de Rapi para asegurar que están libres de micoplasma y virus murinos.

Las células SKOV3 se implantaron con una inyección subcutánea en el flanco inferior utilizando una aguja de 28 ½ G (100 µl de volumen de inyección). Después del implante, los tumores se midieron con un calibrador y los ratones se pesaron dos veces por semana una vez que los tumores eran palpables. Los tumores se midieron luego dos veces por semana en dos dimensiones. Las medidas del calibrador se calcularon utilizando $(L \times W^2)/2$. Los ratones fueron alimentados con una dieta normal y alojados en instalaciones de animales SPF de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y los Reglamentos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

Cuando los tumores de xenoinjertos alcanzaron aproximadamente 200 mm³, se administró a los ratones por vía intravenosa 3-10 mg/kg de anticuerpo anti-HER2 o conjugado anti-HER2-agonista de TLR7. El anticuerpo de control del isotipo se generó expresando un anticuerpo contra una diana no encontrada en roedores y conjugando a través de métodos similares descritos para anticuerpos anti-HER2. Los tumores se midieron dos veces por semana. Los volúmenes medios de los tumores se representaron utilizando el software Prism 5 (GraphPad). Se alcanzó un punto final para los estudios de eficacia cuando el tamaño del tumor alcanzó un volumen de 2000 mm³. Después de la inyección, los ratones también fueron monitorizados en cuanto a signos de deterioro clínico. Si por alguna razón los ratones mostraron signos de morbilidad, incluyendo dificultad respiratoria, postura encorvada, disminución de la actividad, parálisis de las patas traseras, taquipnea como signo de derrames pleurales, pérdida de peso cercana al 20% o 15% más otros signos, o si se vio afectada su capacidad para realizar actividades normales (alimentación, movilidad), los ratones fueron sacrificados.

Para la InmunoHistoQuímica (IHC), de HER2 se utilizaron directrices y protocolos estandarizados para la tinción de HER2 y la puntuación de xenoinjerto HER2 (véase, p. ej., English et al., Mol Diagn Ther. abril 2013; 17 (2): 85-99).

Resultados

Los ratones con xenoinjerto de tumor de ovario SKOV3 fueron tratados por vía intravenosa con una dosis única de conjugado mAb1 anti-HER2-(C-5), en que el Compuesto (C-5) se conjuga con Cys 152 y Cys 375 de la cadena pesada del mAb1 anti-HER2, a,3 mg/kg o 10 mg/kg. Si bien el tratamiento con una dosis única de 10 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) condujo a una regresión completa de los tumores de xenoinjerto humano SKOV3, en 7 de 8 ratones, 3 mg/kg de mAb1 anti-HER2-(C-5) resultó en una regresión inicial del tumor, seguido de crecimiento renovado del tumor (FIG. 7). No se observó regresión del tumor en ratones de xenoinjerto SKOV3 tratados con 10 mg/kg de mAb1 anti-

HER2 no conjugado solo, o un conjugado de anticuerpo de control del isotipo (C-5), en comparación con los animales no tratados (FIG. 7).

5 Estos datos demuestran que la regresión del tumor se puede lograr mediante un tratamiento único de un conjugado anti-HER2-agonista de TLR7 (p. ej., mAb1 anti-HER2-(C-1) o mAb1 anti-HER2-(C-5)) a 10 mg/kg en un modelo de xenoinjerto en el que Her2 se expresa a niveles más bajos en comparación con los modelos de xenoinjerto N87 y HCC (FIG. 8C en comparación con las FIGs. 8A y 8B). En base al nivel de expresión de HER2, N87 y HCC1954 tienen una puntuación de 3+ IHC, y SKOV3 tiene una puntuación de 2+ IHC. Por lo tanto, los conjugados anti-HER2-agonista de TLR7 descritos en la presente pueden suprimir el crecimiento del tumor no solo en tumores que expresan HER2
10 alto (p. ej., que tienen puntuaciones de 3+ IHC), sino también en tumores que expresan HER2 bajo (p. ej., que tienen puntuaciones de 2+ IHC).

LISTA DE SECUENCIAS

[0.472]

- 5 <110> NOVARTIS AG
 <120> CONJUGADOS DE ANTICUERPOS QUE CONTIENEN AGONISTAS DE RECEPTORES TIPO TOLL
 <130> PAT057064-WO-PCT
 <140>
 <141>
- 10 <150> 62/247,896
 <151> 2015-10-29
 <160> 34
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
- 15 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
- 20 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 1
 Asp Thr Tyr Ile His
 1 5
 <210> 2
 <211> 17
- 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
- 30 <400> 2
 Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 3
 <211> 11
- 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
- 40 <400> 3

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 4
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 10 1 5
 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 5
 Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr
 20 1 5
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 6
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
 30 1 5 10
 <210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 35 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

ES 2 798 649 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 360

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 8

gagggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc caggggggctc actccgtttg 60

tcctgtgcag cttctggcct caacattaaa gacacctata tacactgggt gcgtcaggcc 120

ccgggtaagg gcctggaatg ggttgcaagg atttatccta cgaatggtta tactagatat 180

gccgatagcg tcaagggccg tttcactata agcgcagaca catccaaaaa cacagcctac 240

ctgcagatga acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgttc tagatgggga 300

10 ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa ccctgggtcac cgtctcctcg 360

<210> 9

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 9

ES 2 798 649 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Cys Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

ES 2 798 649 T3

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 10

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 10

ES 2 798 649 T3

gaggttcagc tggtagatc tggcgggtgc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
 tcctgtgcag cttctggcct caacattaaa gacacctata tacactgggt gcgtcaggcc 120
 ccgggtaagg gcctggaatg ggttgcaagg atttatccta cgaatgggta tactagatat 180
 gccgatagcg tcaagggccg tttcactata agcgcagaca catccaaaaa cacagcctac 240
 ctgcagatga acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgttc tagatgggga 300
 ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa ccctggtcac cgtctcctcg 360
 gctagcacca agggcccaag tgtgtttccc ctggcccca gcagcaagtc tacttccggc 420
 ggaactgctg ccctgggttg cctggggaag gactacttcc cctgtcccgt gacagtgtcc 480
 tggaactctg gggctctgac ttccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggctgtaca gcctgagcag cgtggtgaca gtgccctcca gctctctggg aaccagacc 600
 tatactgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
 aagagctgag acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag ctccagaact gctgggaggg 720
 ccttccgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag caggaccccc 780
 gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
 gaatacaagt gcaaagtctc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaa gacaatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccacg ggagcccag gtgtacacc tgccccccag ccgggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc ctgtgatatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggaaa gtccaggtgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagtccc tgagcctgag ccccgcaag 1350

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 11

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

10 1

5

10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 12
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5
 5 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 13
Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 14
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 20 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 14
Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 1 5
 <210> 15
 <211> 3
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 30 <400> 15
Ser Ala Ser
 1
 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 16
 His Tyr Thr Thr Pro Pro
 1 5
 <210> 17
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 10 <400> 17
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 18
 <211> 321
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
 <400> 18
 gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc 60
 atcacctgcc gtgccagtca ggatgtgaat actgctgtag cctggatatca acagaaacca 120
 ggaaaagctc cgaactact gatttactcg gcatccttcc tctactctgg agtcccttct 180
 cgcttctctg gatccagatc tgggacggat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg 240
 gaagacttgc caacttatta ctgtcagcaa cattatacta ctcctcccac gttcggacag 300
 20 ggtaccaagg tggagatcaa a 321

ES 2 798 649 T3

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<221> fuente

<223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

10

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 20

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 20

gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc	60
atcacctgcc gtgccagtca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca acagaaacca	120
ggaaaagctc cgaaactact gatttactcg gcatccttcc tctactctgg agtcccttct	180
cgcttctctg gatccagatc tgggacggat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg	240
gaagacttgc caacttatta ctgtcagcaa cattatacta ctctcccac gttcggacag	300
ggtaccaagg tggagatcaa acgtacgggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
agcgacgagc agctgaagag tggcaccgcc agcgtgggtg gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642

<210> 21

10 <211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

15 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 21

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 798 649 T3

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 22

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 22

ES 2 798 649 T3

gaggttcagc tggaggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
 tcctgtgcag cttctggcctt caacattaaa gacacctata tacactgggt gcgtcaggcc 120
 ccgggtaagg gcctggaatg ggttgcaagg atttatccta cgaatgggta tactagatat 180
 gccgatagcg tcaagggccg tttcactata agcgcagaca catccaaaaa cacagcctac 240
 ctgcagatga acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgttc tagatgggga 300
 ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa ccctggtcac cgtctcctcg 360
 gctagcacca agggccccag cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420
 ggcacagccg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttcc cttgtcccgt gaccgtgtcc 480
 tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
 ggcctgtaca gcctgtccag cgtgggtgaca gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agtggagccc 660
 aagagctgcg acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag ccccagagct gctgggcgga 720
 ccctccgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacaccc tgatgatcag caggaccccc 780
 gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
 agcacctaca ggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
 gaatacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgccagccc ccatcgaaaa gaccatcagc 1020
 aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacaccc tgccccctc ccgggaggag 1080
 atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc ctgcgacatc 1140
 gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac acctccagtg 1200
 ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg 1260
 cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagagcc tgagcctgtc ccccggaag 1350

<210> 23

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 23

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

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

ES 2 798 649 T3

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 24

<211> 1350

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 24

gagggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60

10 tcctgtgcag cttctggctt caacattaa gacacctata tacactgggt gcgtcaggcc 120

ES 2 798 649 T3

ccgggtaagg gcctggaatg ggttgcaagg atttatccta cgaatggtta tactagatat 180
gccgatagcg tcaagggccg ttctactata agcgcagaca catccaaaaa cacagcctac 240
ctgcagatga acagcctgcg tgctgaggac actgccgtct attattgttc tagatgggga 300
ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcaaggaa ccctggtcac cgtctcctcg 360
gctagcacca agggccccag cgtgttcccc ctggccccca gcagcaagag caccagcggc 420
ggcacagccg ccctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgtcc 480
tggaacagcg gagccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgtccag cgtggtgaca gtgcccagca gcagcctggg caccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agtggagccc 660
aagagctgcg acaagacca cacctgcccc ccctgcccag ccccagagct gctgggcgga 720
ccctccgtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacaacc tgatgatcag caggaccccc 780
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
agcacctaca ggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 960
gaatacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgccagccc ccatcgaaaa gaccatcagc 1020
aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacacc tgccccctc ccgggaggag 1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc cagcgacatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac acctccagtg 1200
ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagagcc tgagcctgtc ccccgcaag 1350

<210> 25
<211> 4664
<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 25
gcttgctccc aatcacagga gaaggaggag gtggaggagg agggctgctt gaggaagtat 60
aagaatgaag ttgtgaagct gagattcccc tccattggga ccggagaaac caggggagcc 120
ccccgggcag ccgcgcgccc ctcccccagc ggccctttac tgcgccgcgc gcccgcccc 180
caccctcgc agcaccgcc gccccgcgcc ctcccagccg ggtccagccg gagccatggg 240
gccggagccg cagtgagcac catggagctg gcggccttgt gccgctgggg gtcctcctc 300
gccctcttgc cccccggagc gcgagcacc caagtgtgca ccggcacaga catgaagctg 360
cggctccctg ccagtccga gaccacctg gacatgctcc gccaccteta ccagggtgctg 420

ES 2 798 649 T3

caggtggtgc agggaaacct ggaactcacc tacctgcccc ccaatgccag cctgtccttc 480
 ctgcaggata tccaggaggt gcagggctac gtgctcatcg ctcaacaacca agtgaggcag 540
 gtcccactgc agaggctgcg gattgtgcca ggcaccagc tctttgagga caactatgcc 600
 ctggccgtgc tagacaatgg agaccgctg aacaatacca ccctgtcac aggggcctcc 660
 ccaggaggcc tgcgggagct gcagcttoga agcctcacag agatcttgaa aggaggggtc 720
 ttgatccagc ggaaccccc gctctgctac caggacacga ttttgtgaa ggacatcttc 780
 cacaagaaca accagctggc tctcacaactg atagacacca accgctctcg ggctgccac 840
 ccctgttctc cgatgtgtaa gggctcccgc tgtggggag agagttctga ggattgtcag 900
 agcctgacgc gcactgtctg tgccggtggc tgtgccgct gcaaggggcc actgccact 960
 gactgctgcc atgagcagtg tgctgccggc tgcacgggcc ccaagcactc tgactgcctg 1020
 gcctgcctcc acttcaacca cagtggcatc tgtgagctgc actgcccagc cctggtcacc 1080
 tacaacacag acacgttga gtccatgccc aatcccagg gccggtatac attcggcgcc 1140
 agctgtgtga ctgcctgtcc ctacaactac ctttctacgg acgtgggatc ctgcaccctc 1200
 gtctgcccc tgcacaacca agaggtgaca gcagaggatg gaacacagcg gtgtgagaag 1260
 tgcagcaagc cctgtgcccg agtgtgctat ggtctgggca tggagcactt gcgagaggtg 1320
 agggcagtta ccagtgccaa tatccaggag tttgctggct gcaagaagat ctttgggagc 1380
 ctggcatttc tgccggagag ctttgatggg gaccagcct ccaacactgc cccgctccag 1440
 ccagagcagc tccaagtgtt tgagactctg gaagagatca caggttacct atacatctca 1500
 gcattgcccg acagcctgcc tgacctcagc gtcttccaga acctgcaagt aatccgggga 1560
 cgaattctgc acaatggcgc ctactcgctg accctgcaag ggctgggcat cagctggctg 1620
 gggctgcgct cactgaggga actgggcagt ggactggccc tcatccacca taacaccac 1680
 ctctgcttcg tgcacacggg gccctgggac cagctcttcc ggaacccgca ccaagctctg 1740
 ctccacactg ccaaccggcc agaggacgag tgtgtgggcg agggcctggc ctgccaccag 1800
 ctgtgcgccc gagggcactg ctggggtcca gggcccacc agtgtgtcaa ctgcagccag 1860
 ttccttcggg gccagagtg cgtggaggaa tgccgagtac tgcaggggct cccagggag 1920
 tatgtgaatg ccaggcactg tttgccgtgc caccctgagt gtcagcccca gaatggctca 1980
 gtgacctgtt ttggaccgga ggctgaccag tgtgtggcct gtgccacta taaggacct 2040
 cccttctgcg tggcccgtg cccagcggg gtgaaacctg acctctccta catgccatc 2100
 tggaaagttc cagatgagga gggcgcatgc cagccttggc ccatcaactg caccactcc 2160
 tgtgtggacc tggatgacaa gggctgcccc gccgagcaga gagccagccc tctgacgtcc 2220
 atcatctctg cgggtggttg cattctgctg gtctgtgtct tgggggtggg ctttgggatc 2280
 ctcatcaagc gacggcagca gaagatccgg aagtacacga tgcgggagact gctgcaggaa 2340

ES 2 798 649 T3

acggagctgg tggagccgct gacacctagc ggagcgatgc ccaaccaggc gcagatgcgg 2400
 atcctgaaag agacggagct gaggaagggtg aagggtgcttg gatctggcgc ttttggcaca 2460
 gtctacaagg gcatctggat ccctgatggg gagaatgtga aaattccagt ggccatcaaa 2520
 gtgttgaggg aaaacacatc ccccaaagcc aacaaagaaa tcttagacga agcatacgtg 2580
 atggctgggtg tgggctcccc atatgtctcc cgccttctgg gcatctgcct gacatccacg 2640
 gtgcagctgg tgacacagct tatgcctat ggctgcctct tagaccatgt cgggaaaac 2700
 cgcggacgcc tgggctcca ggacctgctg aactgggtga tgcagattgc caaggggatg 2760
 agctacctgg aggatgtgcg gctcgtacac agggacttgg ccgctoggaa cgtgctggtc 2820
 aagagtccca accatgtcaa aattacagac ttggggctgg ctggctgct ggacattgac 2880
 gagacagagt accatgcaga tgggggcaag gtgccatca agtggatggc gctggagtcc 2940
 attctccgcc ggcggttcac ccaccagagt gatgtgtgga gttatggtgt gactgtgtgg 3000
 gagctgatga cttttggggc caaaccttac gatgggatcc cagcccgga gatccctgac 3060
 ctgctggaaa agggggagcg gctgccccag cccccatct gcaccattga tgtctacatg 3120
 atcatggtca aatggtgat gattgactct gaatgtcggc caagattccg ggagttggtg 3180
 tctgaattct cccgatggc cagggacccc cagcgtttg tggatcatca gaatgaggac 3240
 ttgggcccag ccagtccctt ggacagcacc ttctaccgct cactgctgga ggacgatgac 3300
 atgggggacc tggtgatgc tgaggagtat ctggtacccc agcagggctt cttctgtcca 3360
 gaccctgcc cgggcgctgg gggcatggtc caccacagge accgcagctc atctaccagg 3420
 agtggcgggtg gggacctgac actagggctg gagccctctg aagaggagge ccccaggtct 3480
 ccactggcac cctccgaagg ggctggctcc gatgtatttg atggtgacct gggaatgggg 3540
 gcagccaagg ggtgcaaa cctccccaca catgaccca gccctctaca gcggtacagt 3600
 gaggaccca cagtaccctt gccctctgag actgatggct acgttgcccc cctgacctgc 3660
 agccccagc ctgaatatgt gaaccagcca gatgttcggc cccagcccc ttcgccccga 3720
 gagggccctc tgctgctgc cgcacctgct ggtgccactc tggaaaggcc caagactctc 3780
 tccccagga agaatgggtt cgtcaaagac gttttgcct ttgggggtgc cgtggagaac 3840
 cccgagtact tgacaccca gggagagct gccctcagc cccaccctcc tctgccttc 3900
 agcccagcct tcgacaacct ctattactgg gaccaggacc caccagagcg ggggctcca 3960
 cccagcaoct tcaaaggac acctacggca gagaaccag agtacctggg tctggacgtg 4020
 ccagtgtgaa ccagaaggcc aagtccgag aagccctgat gtgtcctcag ggagcagga 4080
 aggcctgact tctgctggca tcaagaggtg ggagggccct ccgaccactt ccaggggaac 4140
 ctgccatgcc aggaacctgt cctaaggaac cttccttctt gcttgagttc ccagatggct 4200

ES 2 798 649 T3

ggaaggggtc cagcctcggt ggaagaggaa cagcactggg gagtctttgt ggattctgag 4260
 gccctgccca atgagactct aggggtccagt ggatgccaca gccagcttg gcccttcct 4320
 tccagatcct gggtagtgaa agccttaggg aagctggcct gagaggggaa gcgccctaa 4380
 gggagtgtct aagaacaaaa gcgaccatt cagagactgt ccctgaaacc tagtactgcc 4440
 ccccatgagg aaggaacagc aatgggtgtca gtatccaggc tttgtacaga gtgcttttct 4500
 gtttagtttt tacttttttt gttttgtttt tttaaagatg aaataaagac ccagggggag 4560
 aatgggtgtt gtatggggag gcaagtgtgg ggggtccttc tccacacca ctttgcctat 4620
 ttgcaaatat attttgaaa acagctaaaa aaaaaaaaaa aaaa 4664

<210> 26

<211> 1255

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 26

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30

Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45

Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60

Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80

Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95

Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110

Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125

Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140

Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160

ES 2 798 649 T3

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn
 165 170 175
 Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys
 180 185 190
 His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser
 195 200 205
 Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys
 210 215 220
 Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
 225 230 235 240
 Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu
 245 250 255
 His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val
 260 265 270
 Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg
 275 280 285
 Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu
 290 295 300
 Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln
 305 310 315 320
 Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys
 325 330 335
 Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu
 340 345 350
 Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys
 355 360 365
 Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp
 370 375 380
 Pro Ala Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 405 410 415

ES 2 798 649 T3

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg
 420 425 430

Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu
 435 440 445

Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly
 450 455 460

Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val
 465 470 475 480

Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His Thr
 485 490 495

Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala Cys His
 500 505 510

Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro Thr Gln Cys
 515 520 525

Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys Val Glu Glu Cys
 530 535 540

Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val Asn Ala Arg His Cys
 545 550 555 560

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys
 565 570 575

Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp
 580 585 590

Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu
 595 600 605

Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln
 610 615 620

Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys
 625 630 635 640

Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser
 645 650 655

Ala Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly
 660 665 670

ES 2 798 649 T3

Ile Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg
675 680 685

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly
690 695 700

Ala Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu
705 710 715 720

Arg Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
725 730 735

Gly Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile
740 745 750

Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu
755 760 765

Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg
770 775 780

Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu
785 790 795 800

Met Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg
805 810 815

Leu Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly
820 825 830

Met Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala
835 840 845

Arg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe
850 855 860

Gly Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp
865 870 875 880

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
885 890 895

Arg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val
900 905 910

Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala

ES 2 798 649 T3

915	920	925
Arg Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro 930	935	940
Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met 945	950	955 960
Ile Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe 965	970	975
Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu 980	985	990
Asp Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu 995	1000	1005
Leu Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr 1010	1015	1020
Leu Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly 1025	1030	1035
Ala Gly Gly Met Val His His Arg His Arg Ser Ser Ser Thr Arg 1040	1045	1050
Ser Gly Gly Gly Asp Leu Thr Leu Gly Leu Glu Pro Ser Glu Glu 1055	1060	1065
Glu Ala Pro Arg Ser Pro Leu Ala Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ser 1070	1075	1080
Asp Val Phe Asp Gly Asp Leu Gly Met Gly Ala Ala Lys Gly Leu 1085	1090	1095
Gln Ser Leu Pro Thr His Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser 1100	1105	1110
Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu Pro Ser Glu Thr Asp Gly Tyr Val 1115	1120	1125
Ala Pro Leu Thr Cys Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro 1130	1135	1140
Asp Val Arg Pro Gln Pro Pro Ser Pro Arg Glu Gly Pro Leu Pro 1145	1150	1155

ES 2 798 649 T3

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu Glu Arg Pro Lys Thr Leu
1160 1165 1170

Ser Pro Gly Lys Asn Gly Val Val Lys Asp Val Phe Ala Phe Gly
1175 1180 1185

Gly Ala Val Glu Asn Pro Glu Tyr Leu Thr Pro Gln Gly Gly Ala
1190 1195 1200

Ala Pro Gln Pro His Pro Pro Pro Ala Phe Ser Pro Ala Phe Asp
1205 1210 1215

Asn Leu Tyr Tyr Trp Asp Gln Asp Pro Pro Glu Arg Gly Ala Pro
1220 1225 1230

Pro Ser Thr Phe Lys Gly Thr Pro Thr Ala Glu Asn Pro Glu Tyr
1235 1240 1245

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1250 1255

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 27

Met Lys Thr Phe Ile Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Ile
1 5 10 15

10 Phe Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala
20

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<221> fuente

<223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 28

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

20 <210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 29

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys
20

5

<210> 30

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 30

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

15

ES 2 798 649 T3

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Cys Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

ES 2 798 649 T3

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

ES 2 798 649 T3

325

330

335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Gly Asp Ser Leu Asp Met Leu Glu Trp
 385 390 395 400

Ser Leu Met Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 33

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 33

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Pro
 1 5 10 15

10

Ala Met Pro Glu Asn Leu
 20

<210> 34

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota=>Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

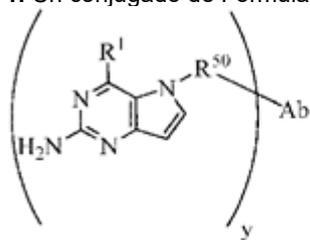
<400> 34

ES 2 798 649 T3

gatatccaga tgaccagtc cccgagctcc ctgtccgct ctgtgggca tagggtcacc	60
atcacctgcc gtgccagtca ggatgtgaat actgctgtag cctggtatca acagaaacca	120
ggaaaagctc cgaactact gatttactcg gcatccttcc tctactctgg agtcccttct	180
cgcttctctg gatccagatc tgggacggat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg	240
gaagacttgc caacttatta ctgtcagcaa cattatacta ctctcccac gttcggacag	300
ggtaccaagg tggagatcaa acgaacgggtg gccgctccca gcgtgttcat cttccccccc	360
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc agcgtgggtg gcctgctgaa caacttctac	420
ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	480
gagagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc	540
ctgagcaagg ccgactacga gaagcataag gtgtacgctt gcgaggtgac ccaccagggc	600
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gc	642

REIVINDICACIONES

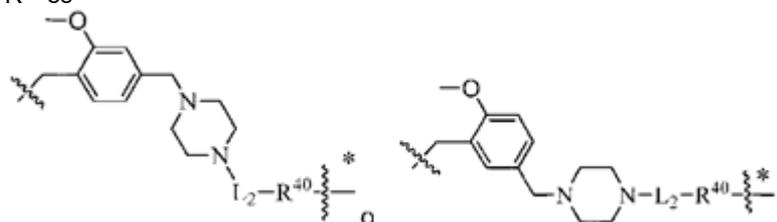
1. Un conjugado de Fórmula (II), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Fórmula (II)

5 en donde:

R⁵⁰ es



en que el * indica el punto de unión a Ab;

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano;

10 R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

R³ es L₁OH;

L₁ es -(OH₂)_m-;

15 L₂ es -(CH₂)_n-, -(CH₂)_nO_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(OH₂)_nNHO(=O)(OH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

-(CH₂)_nO_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO_t(CH₂)_n)-, -C(=O)((CH₂)_nO_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n)-,

15 C(=O)((CH₂)_nO_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

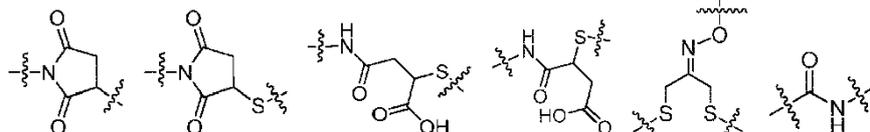
C(=O)NH((CH₂)_nO_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-,

20 C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO_t(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-,

C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO_t(CH₂)_n- o

20 C(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n;

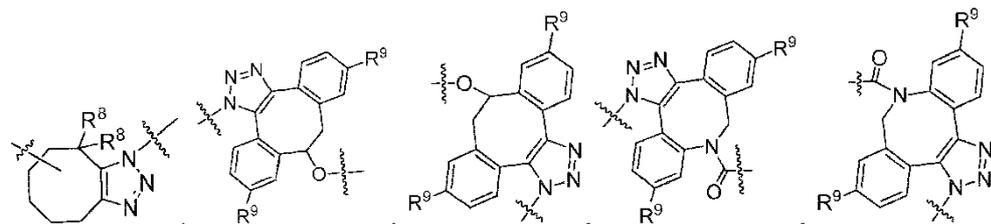
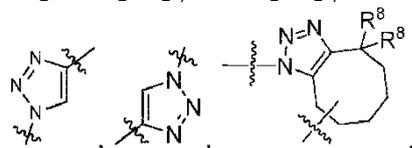
R⁴⁰ es

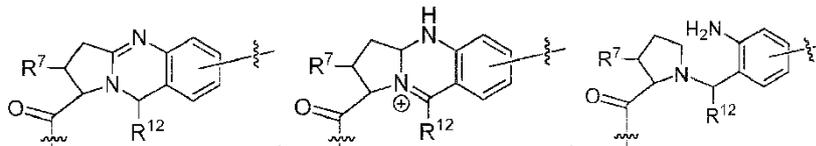
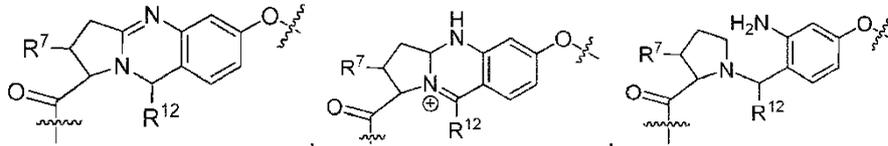
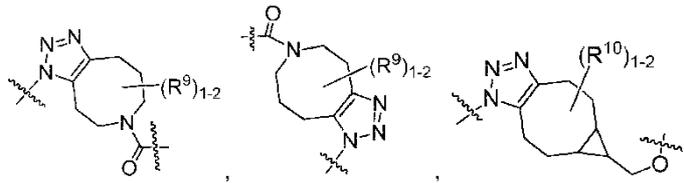


-S-, -NHC(=O)CH₂-, -S(=O)₂CH₂CH₂-, -(CH₂)₂S(=O)₂CH₂CH₂-, -NHS(=O)₂CH₂CH₂-, -NHC(=O)CH₂CH₂-,

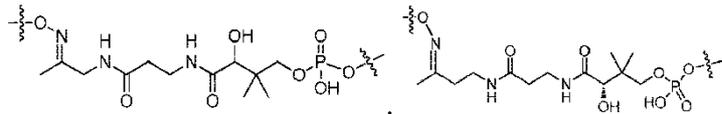
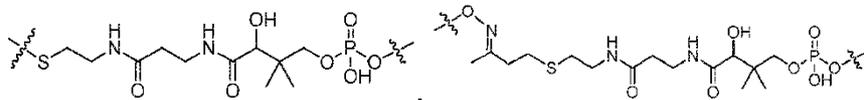
CH₂NHCH₂CH₂-, -NHCH₂CH₂-,

25

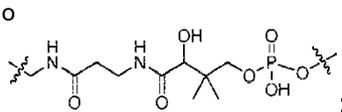
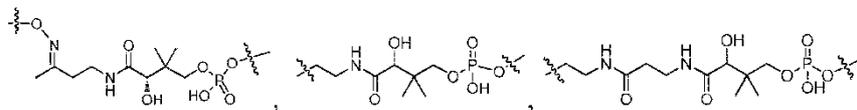




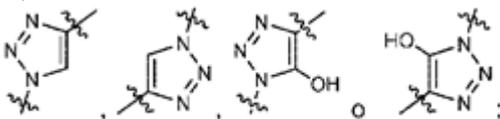
5



10

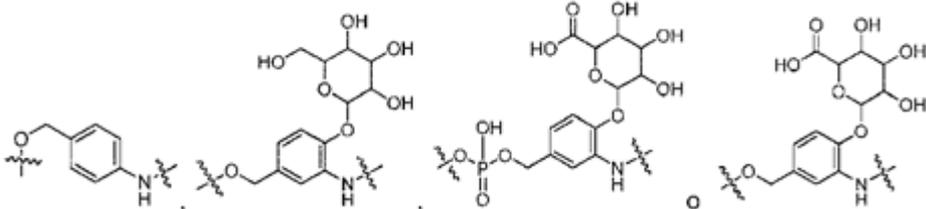


X1 es

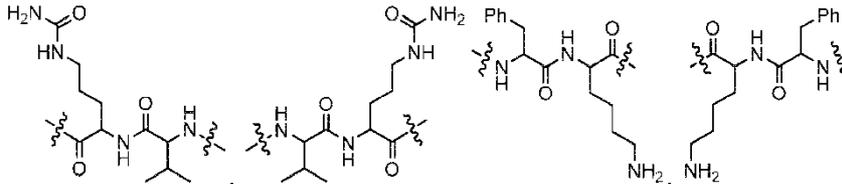


15

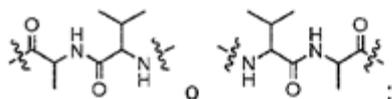
X2 es



X3 es



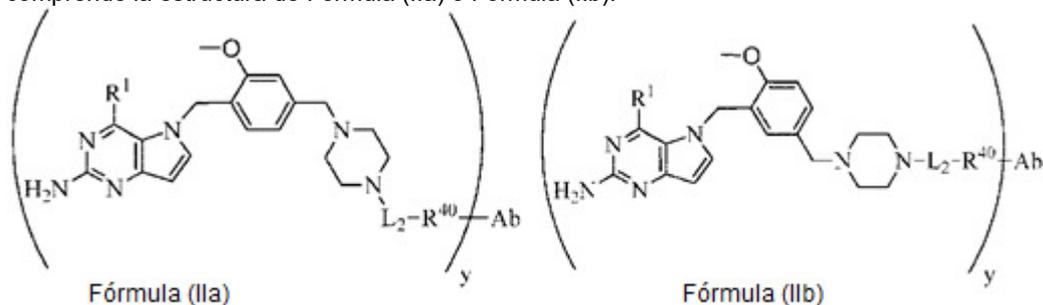
20



- cada R^7 se selecciona independientemente entre H y alquilo C_1-C_6 ;
 cada uno de los R^8 se selecciona independientemente de H y alquilo C_1-C_6 , F, Cl y -OH;
 cada uno de los R^9 se selecciona independientemente de H, alquilo C_1-C_6 , F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;
 cada uno de los R^{10} se selecciona independientemente de H, alquilo C_1-6 , fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C_{1-4} sustituido con -C(=O)OH y alquilo C_{1-4} sustituido con -C(=O)OH;
 R^{12} es H, metilo o fenilo;
 cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;
 cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, e y es un número entero de 1 a 16.
- 2.** El conjugado de la reivindicación 1, en donde Ab se selecciona de trastuzumab, pertuzumab, margetuximab, o HT-19, o un mutante de cisteína específico para el sitio del mismo, en donde el mutante de cisteína específico para el sitio comprende cisteína en una o más de las siguientes posiciones (todas las posiciones por numeración de la UE):
 (a) posiciones 152, 360 y 375 de la cadena pesada del anticuerpo, y
 (b) posiciones 107, 159 y 165 de la cadena ligera del anticuerpo.
- 3.** El conjugado de la reivindicación 1, en donde Ab se selecciona de cualquiera de los siguientes:
 (a) un anticuerpo que comprende:
 una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
 una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
 una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
 una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
 una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y
 una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
 (b) un anticuerpo que comprende:
 una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
 una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;
 una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
 una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
 una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y
 una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
 (c) un anticuerpo que comprende la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
 (d) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;
 (e) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;
 (f) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; o
 (g) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.
- 4.** El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde Ab es un anticuerpo anti-HER2 humano o humanizado.
- 5.** El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde Ab es una región Fc modificada.
- 6.** El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde Ab comprende cisteína en una o más de las siguientes posiciones (todas las posiciones por numeración de la UE):
 (a) posiciones 152, 360 y 375 de la cadena pesada del anticuerpo, y
 (b) posiciones 107, 159 y 165 de la cadena ligera del anticuerpo.

7. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde Ab comprende cisteínas en las posiciones 152 y 375 de las cadenas pesadas de anticuerpos (todas las posiciones por numeración de la UE).

5 8. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el conjugado de anticuerpos de Fórmula (II) comprende la estructura de Fórmula (IIa) o Fórmula (IIb):



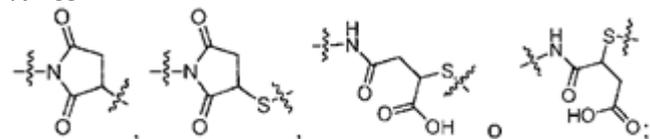
en donde:

R¹ es -NHR²;

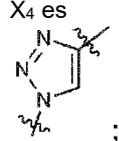
10 R² es alquilo C₄-C₆;

L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n- u -O(=O)X₂O(=O)(OH₂)_nNHO(=O)(OH₂)_n-;

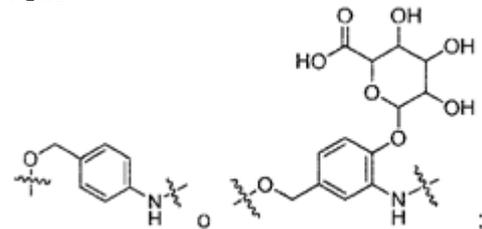
R⁴⁰ es



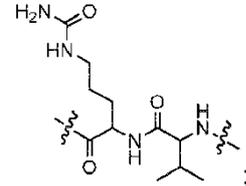
15 X₄ es



X₂ es



20 X₃ es



cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 and 18, e y es un número entero de 1 a 16.

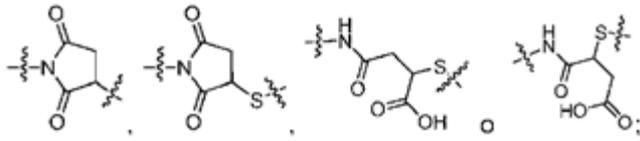
25 9. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde

R¹ es -NHR²;

R² es alquilo C₄-C₆;

L₂ es -(CH₂)_n- o -C(=O)(CH₂)_n;

30 R⁴⁰ es

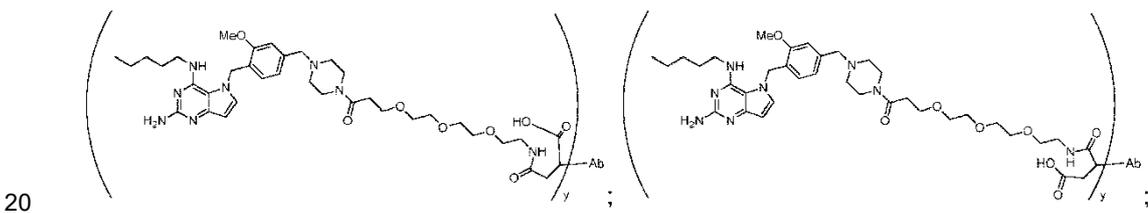
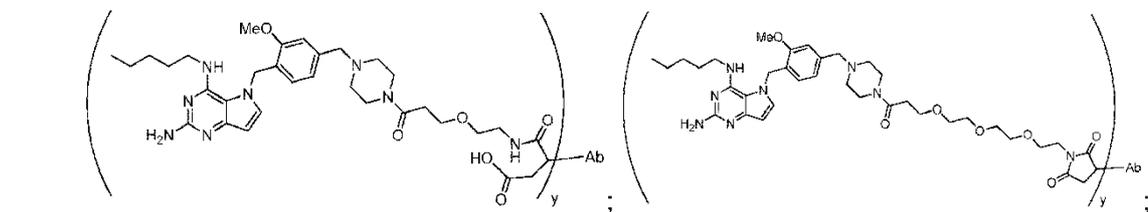
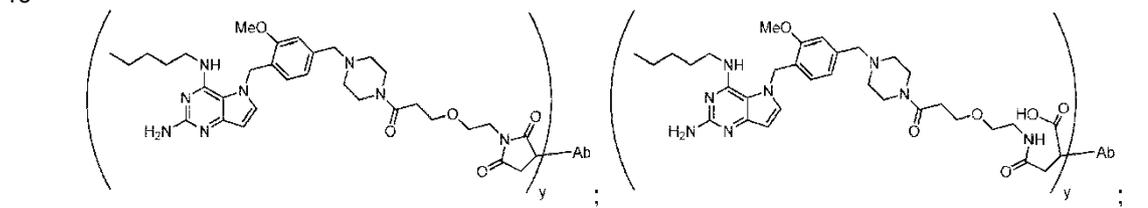
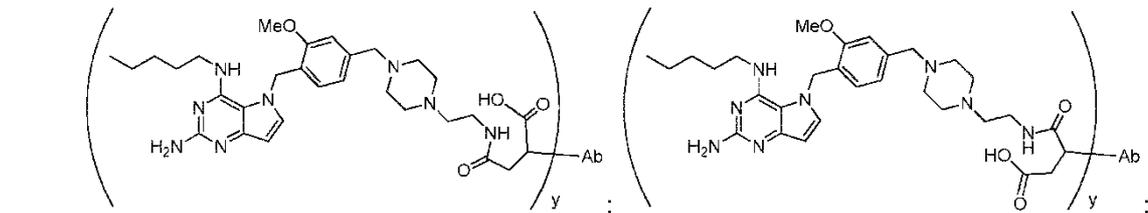
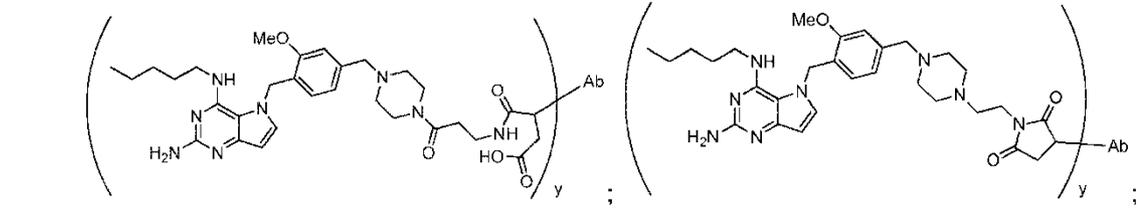
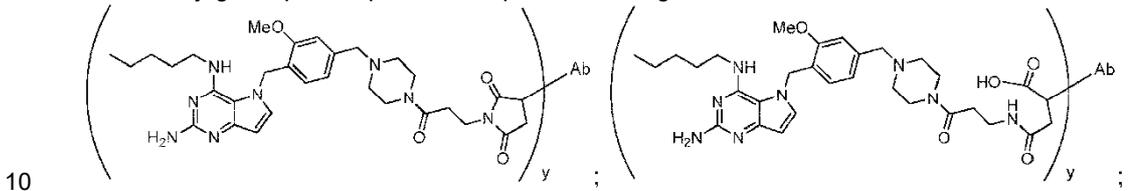


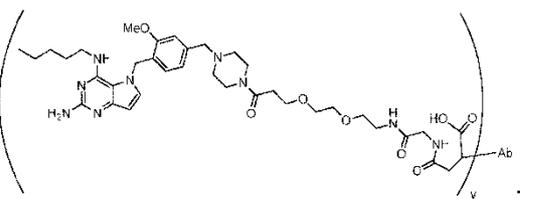
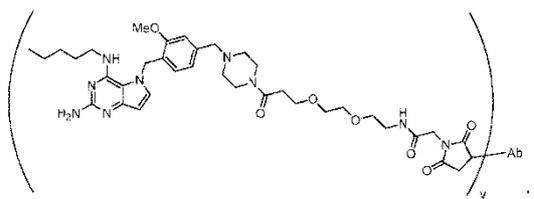
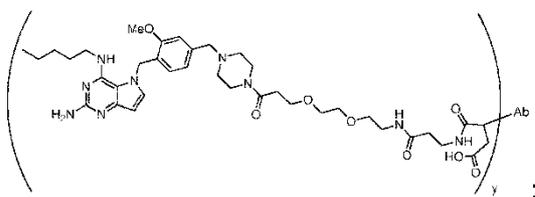
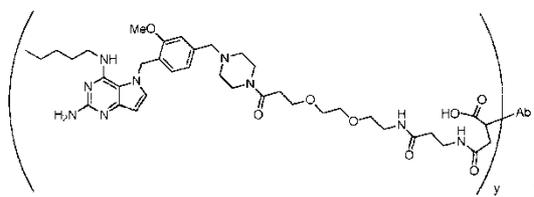
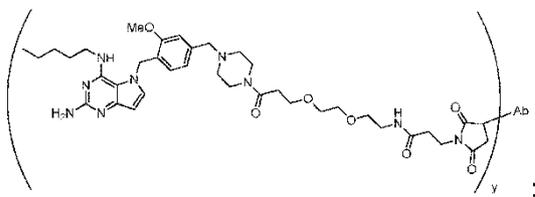
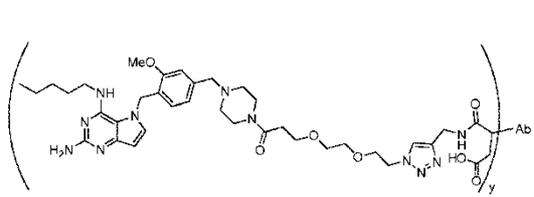
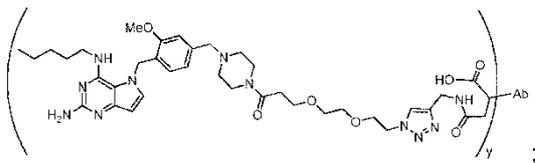
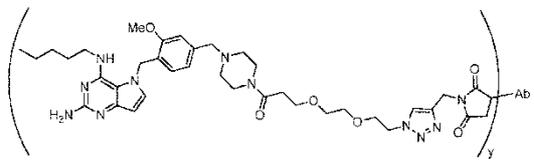
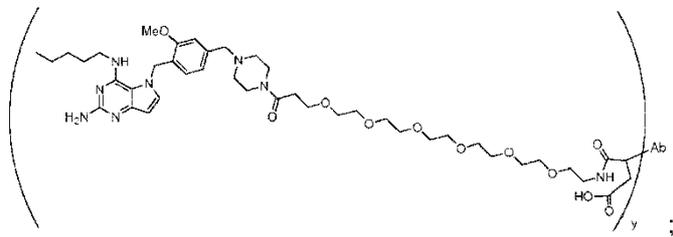
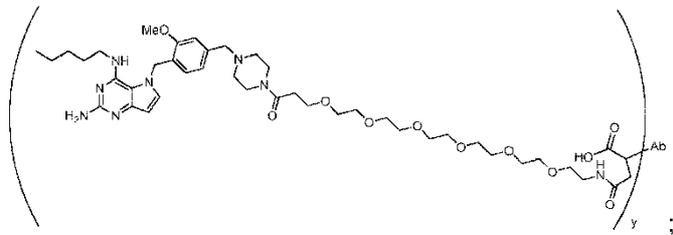
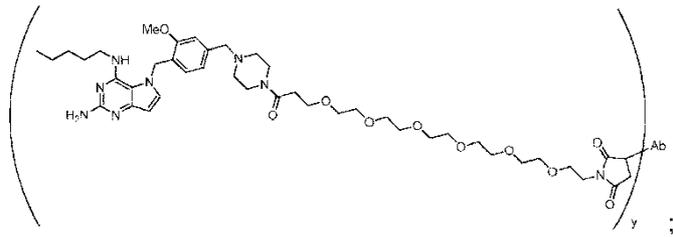
y
 cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4, e
 y es un número entero de 1 a 16.

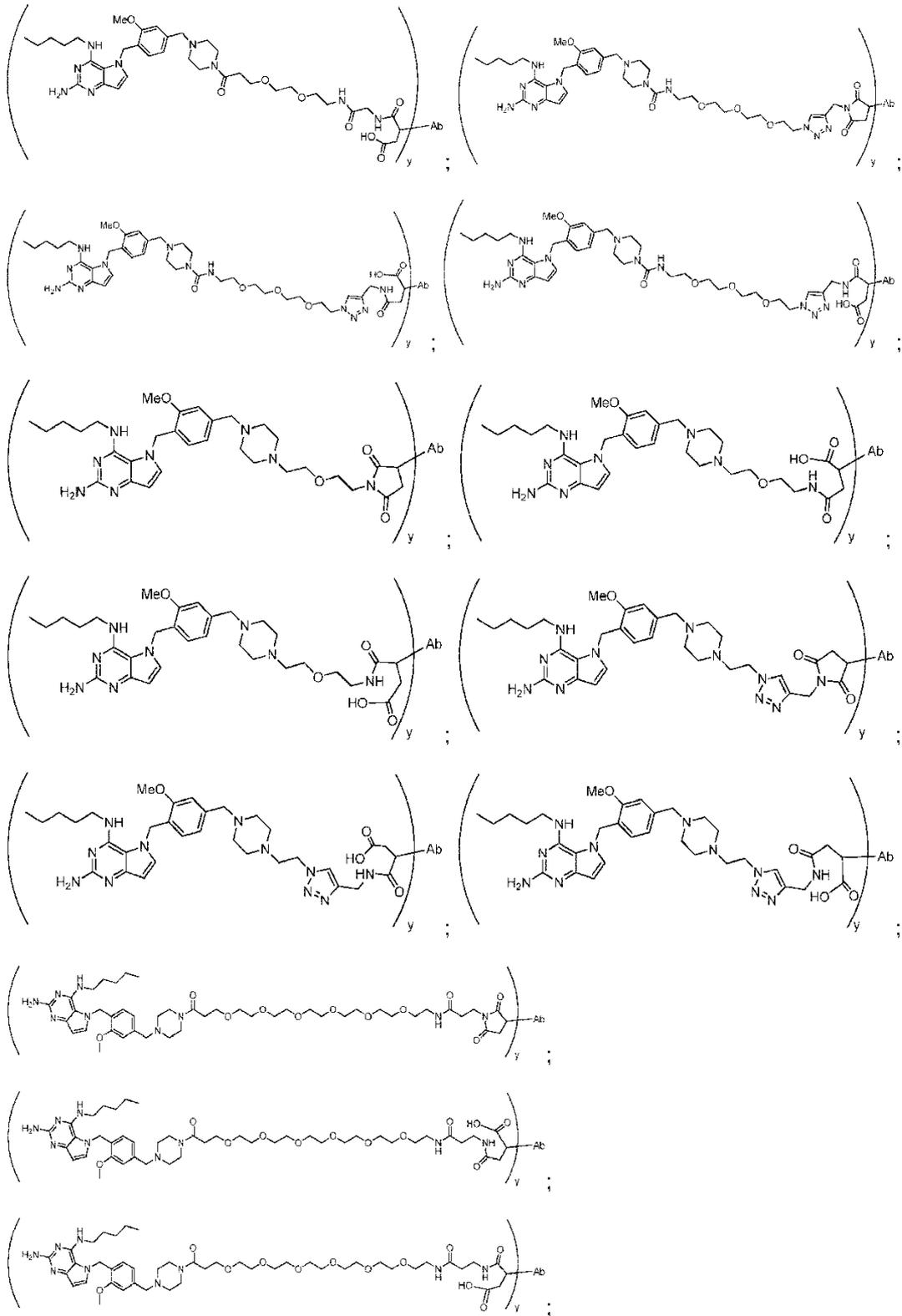
5

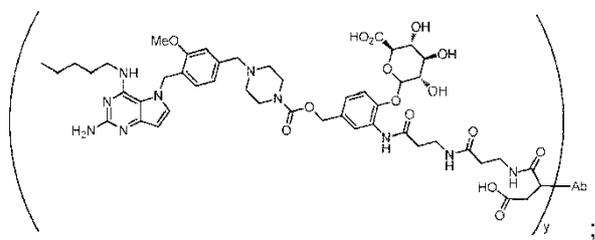
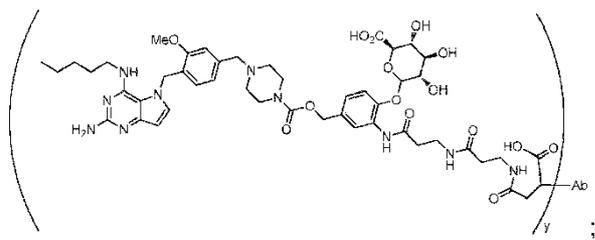
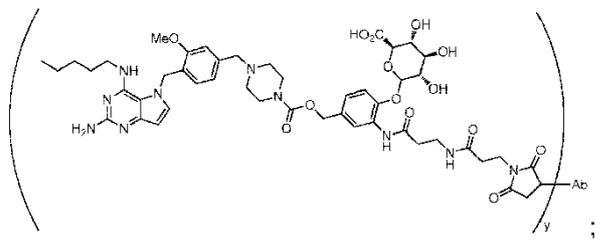
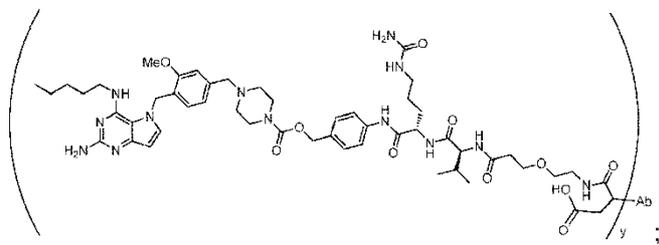
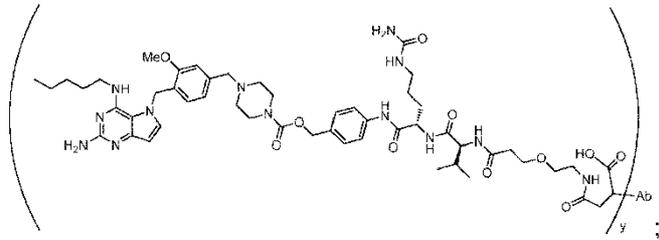
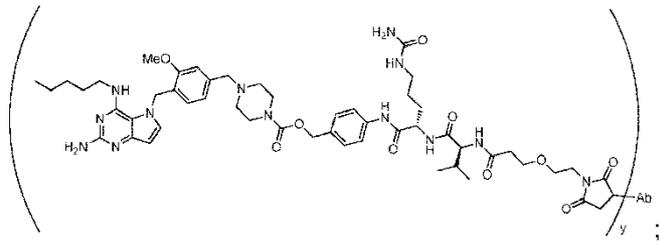
10. El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el conjugado tiene un índice de hidrofobicidad de 0,8 o mayor, según se determina por cromatografía de interacción hidrofóbica.

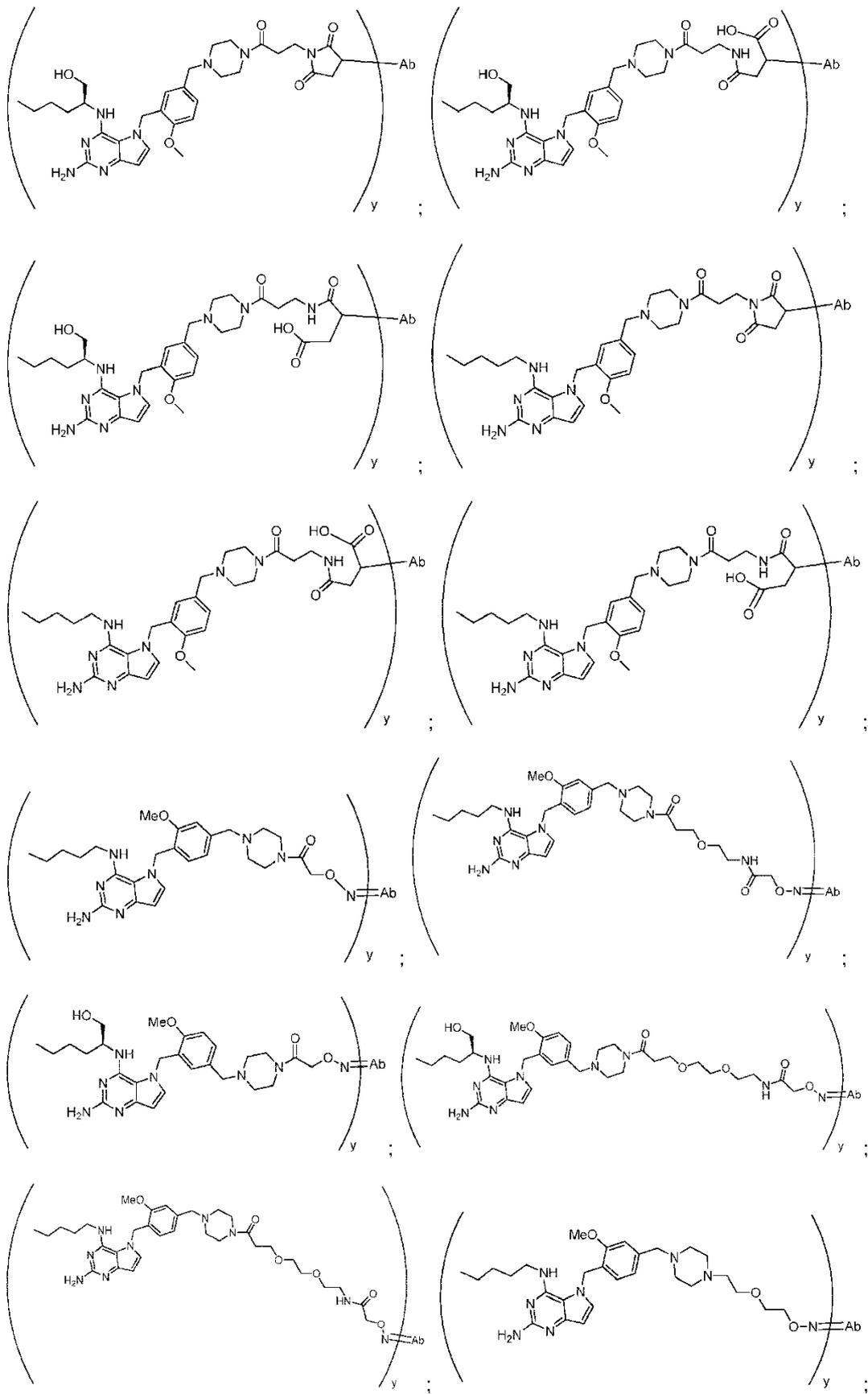
11. Un conjugado que comprende cualquiera de las siguientes fórmulas:

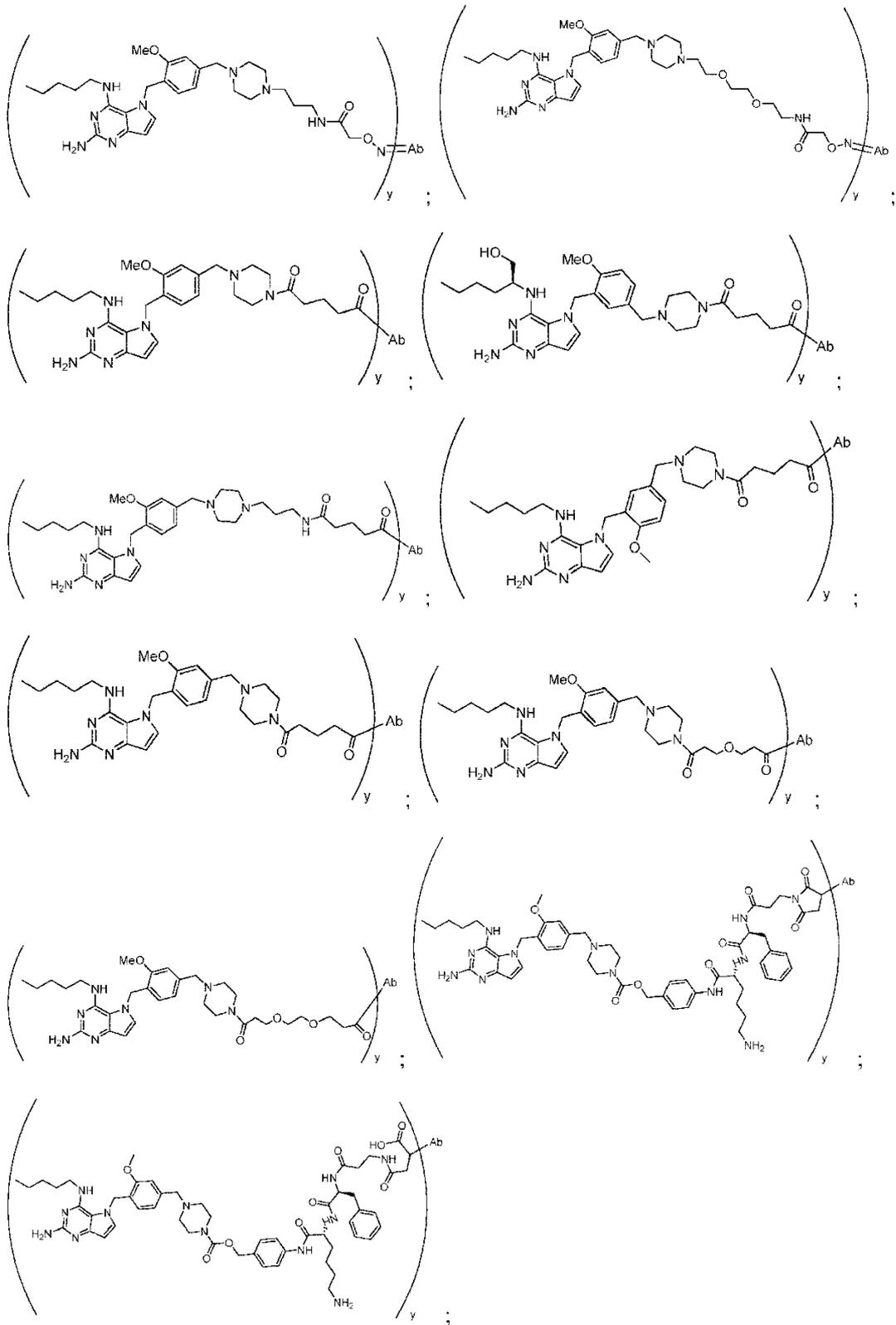


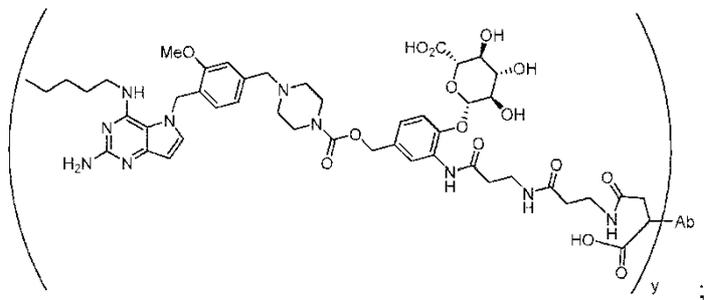
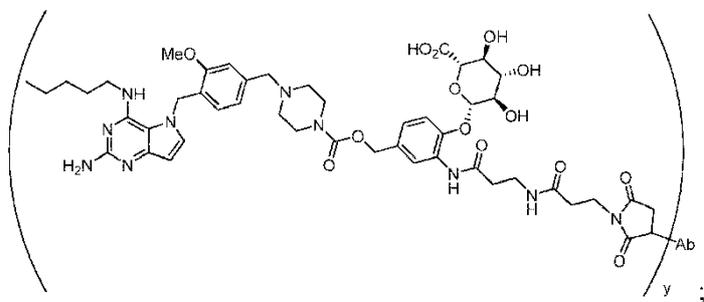
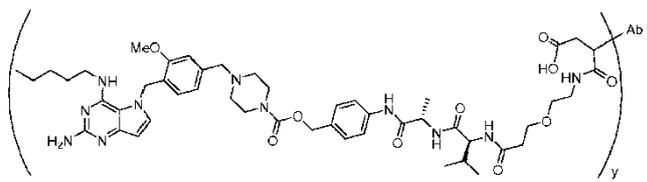
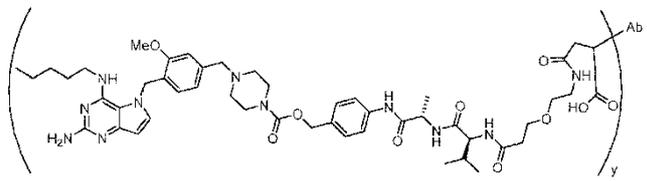
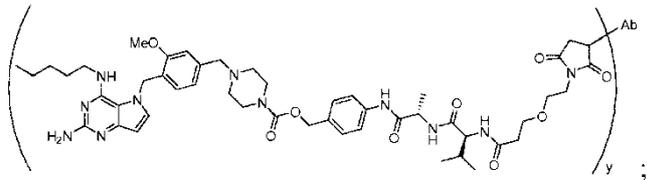
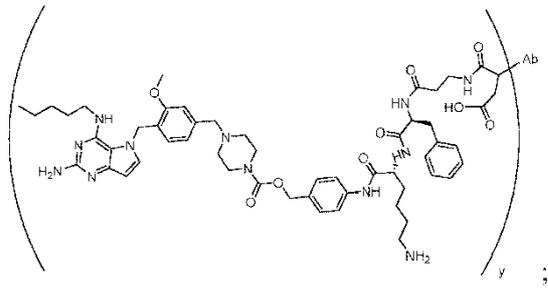


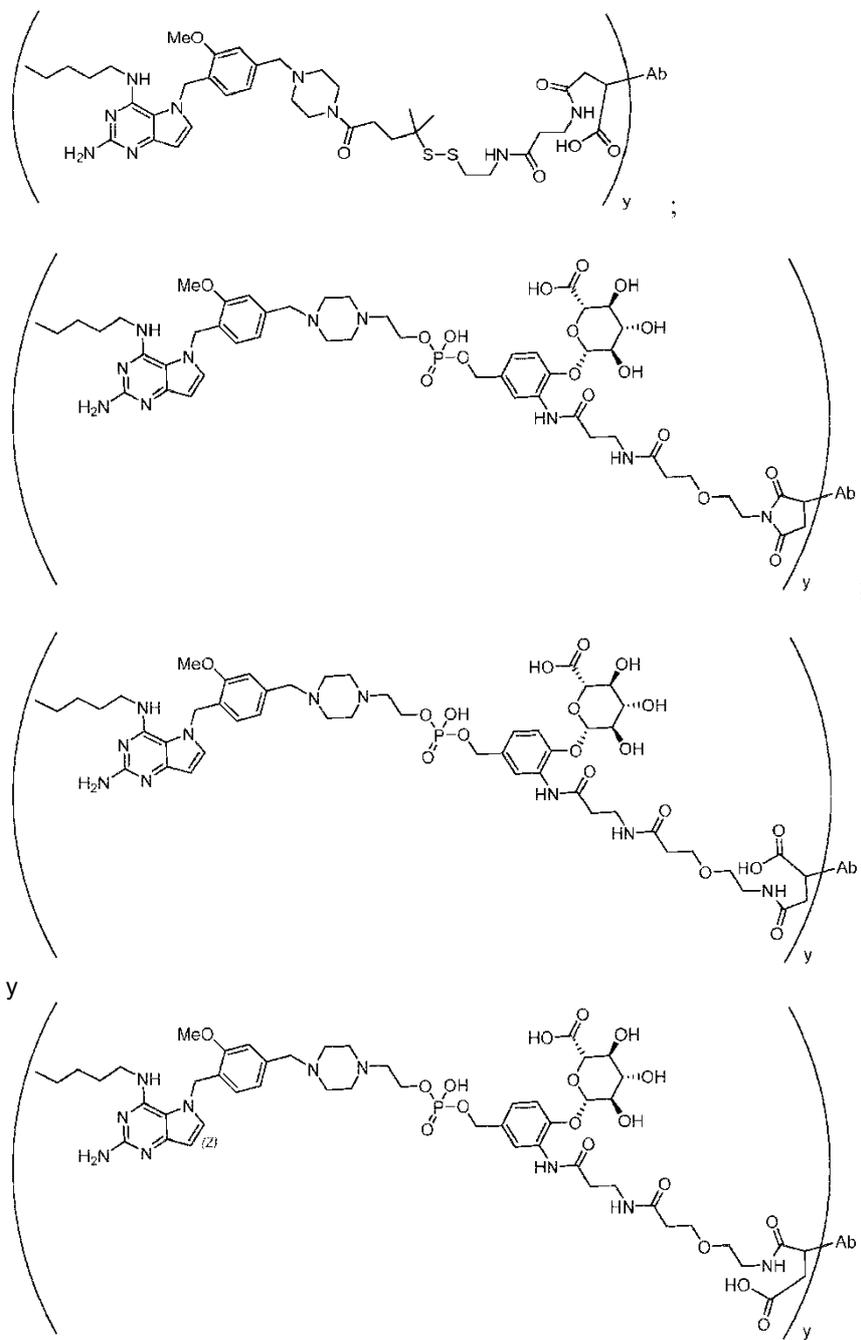












en donde Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a HER2 humano, e y es un número entero de 1 a 4.

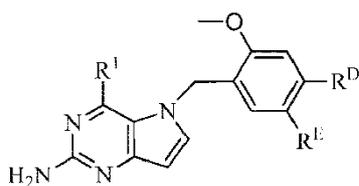
12. El conjugado de la reivindicación 11, en donde Ab se selecciona de trastuzumab, pertuzumab, margetuximab, o HT-19, o un mutante de cisteína específico para el sitio del mismo, en donde el mutante de cisteína específico para el sitio comprende cisteína en una o más de las siguientes posiciones (todas las posiciones por numeración de la UE):

- (a) posiciones 152, 360 y 375 de la cadena pesada del anticuerpo, y
- (b) posiciones 107, 159 y 165 de la cadena ligera del anticuerpo.

13. El conjugado de la reivindicación 11, en donde Ab se selecciona de cualquiera de los siguientes:

- (a) un anticuerpo que comprende:
 - una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
 - una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

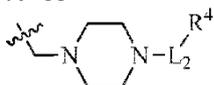
- una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
- 5 una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y
- una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
- (b) un anticuerpo que comprende:
- 10 una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
- una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;
- una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
- 15 una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y
- una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- (c) un anticuerpo que comprende la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- (d) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;
- 20 (e) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;
- (f) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; o
- 25 (g) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.
- 14.** El conjugado de la reivindicación 11, en donde Ab comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y una cadena Ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.
- 30 **15.** El conjugado de la reivindicación 14, en donde el compuesto está unido a las cisteínas en las posiciones 152 y 375 de la cadena pesada del anticuerpo (todas las posiciones por numeración de la UE).
- 16.** El conjugado de la reivindicación 11, en donde y es aproximadamente 3 a 4.
- 17.** El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde el conjugado tiene un índice de hidrofobicidad de 0,8 o mayor, según se determina por cromatografía de interacción hidrofóbica.
- 40 **18.** Una composición farmacéutica que comprende uno o más conjugados de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 19.** El conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 o la composición farmacéutica de la reivindicación 18 para uso en el tratamiento de un cáncer HER2-positivo en un sujeto que lo necesite.
- 45 **20.** El conjugado para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el conjugado es capaz de suprimir el cáncer HER2-positivo durante un período sostenido y/o reducir la recurrencia del cáncer HER2-positivo, en comparación con un anticuerpo anti-HER2 solo.
- 50 **21.** El conjugado para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el cáncer HER2-positivo se selecciona de cáncer gástrico, cáncer de esófago, adenocarcinoma de unión gastroesofágica, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer endometrial, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, osteosarcoma, neuroblastoma, glioblastoma y cáncer de cabeza y cuello.
- 55 **22.** El conjugado para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el conjugado se administra al sujeto por vía intravenosa, intratumoral o subcutánea.
- 23.** El conjugado para uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el conjugado se administra a una dosis de aproximadamente 0,01-20 mg por kg de peso corporal.
- 60 **24.** El conjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende, además, administrar un segundo agente al sujeto.
- 65 **25.** Un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (I), o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



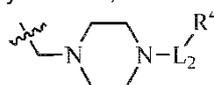
Formula (I)

en donde:

5 R^D es



y R^E es H; o R^E es



y R^D es H;

10 R¹ es -NHR² o -NHCHR²R³;

R² es -alquilo C₃-C₆ o -alquilo C₄-C₆;

R³ es L₁OH;

L₁ es -(CH₂)_m;

15 L₂ es -(CH₂)_n-, -((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-,

-((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -

C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nC(=O)NH(CH₂)_n-, -

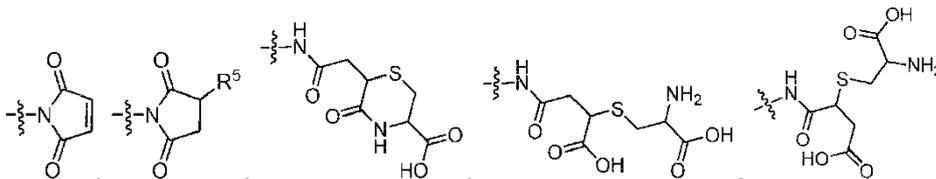
C(=O)NH((CH₂)_nO)_t(CH₂)_nX₁(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)X₂X₃C(=O)(CH₂)_n-,

O(=O)X₂O(=O)(OH₂)_nNHO(=O)(OH₂)_n-, -C(=O)X₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂-,

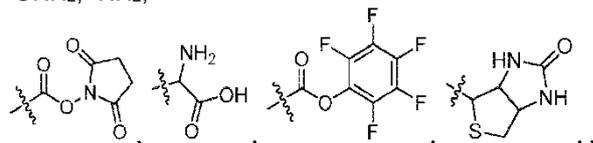
C(=O)(CH₂)_nC(R₇)₂SS(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(CH₂)_nX₂C(=O)(CH₂)_nNHC(=O)((CH₂)_nO)_t(CH₂)_n u -

20 O(=O)(OH₂)_nO(=O)NH(CH₂)_n;

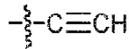
R⁴ es



-ONH₂, -NH₂,

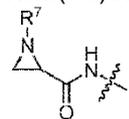


25 -N₃,

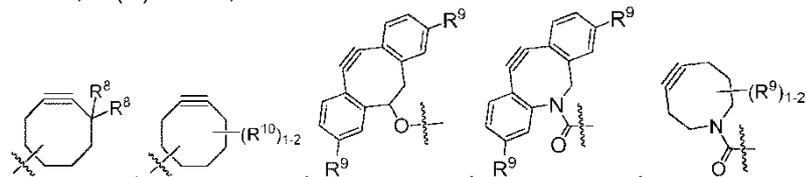


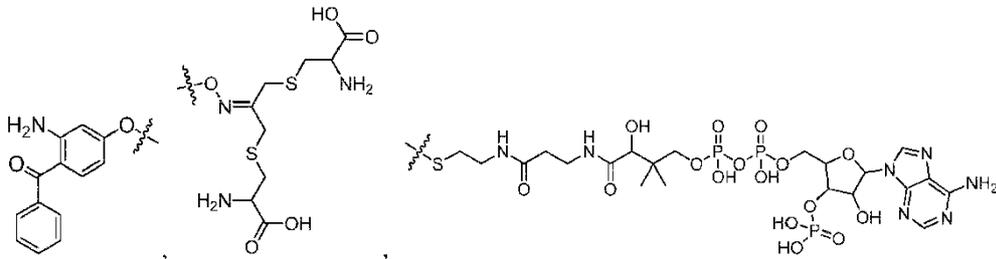
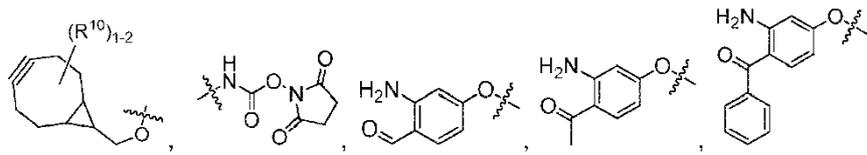
NHC(=O)CH=CH₂, -SH, -SR⁷, -OH -SSR⁶, -S(=O)₂(CH=CH₂), -(CH₂)₂S(=O)₂(CH=CH₂), -NHS(=O)₂(CH=CH₂), -

NHC(=O)CH₂Br, -NHC(=O)CH₂I, -C(O)NHNH₂,

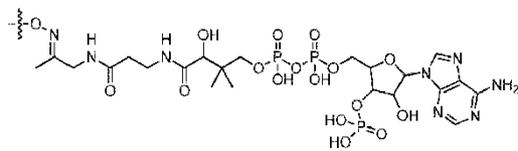
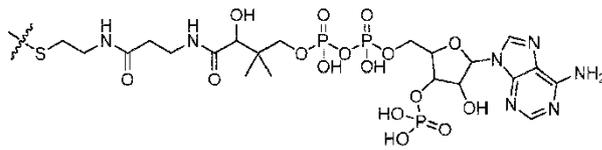


30 -CO₂H, -C(O)NHNH₂,

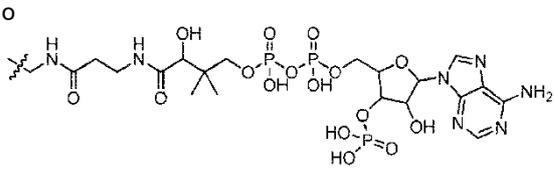
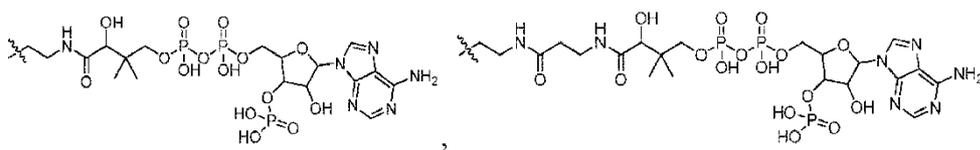
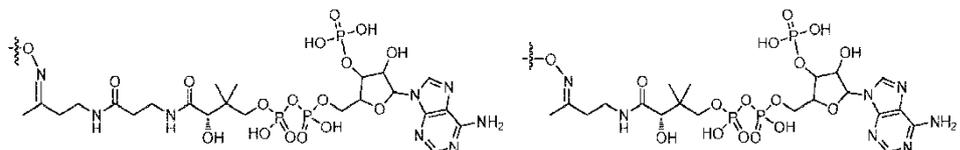




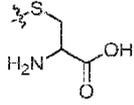
5



10

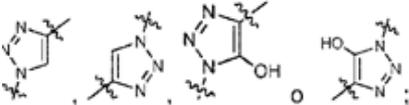


R⁵ es

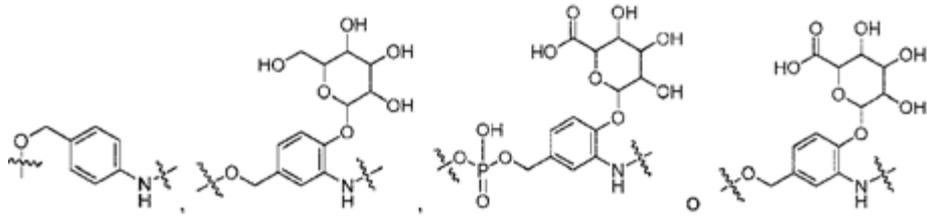


15

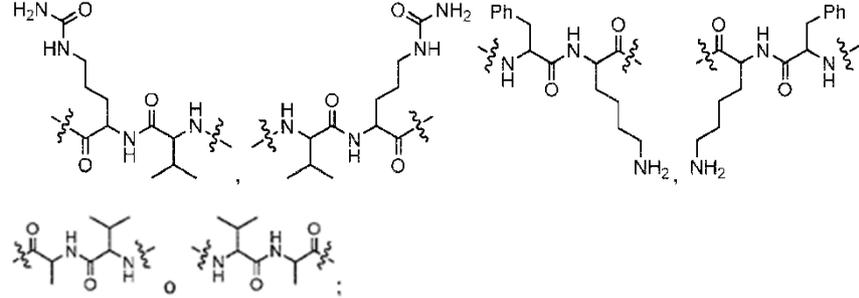
X₁ es



X₂ es



X₃ es



5

R⁶ es 2-piridilo o 4-piridilo;

cada R⁷ se selecciona independientemente entre H y alquilo C₁-C₆;

cada uno de los R⁸ se selecciona independientemente de H y alquilo C₁-C₆, F, Cl y -OH;

10 cada uno de los R⁹ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ y -OH;

cada uno de los R¹⁰ se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-6, fluoro, benciloxi sustituido con C(=O)OH, bencilo sustituido con -C(=O)OH, alcoxi C₁-4 sustituido con -C(=O)OH y alquilo C₁-4 sustituido con -C(=O)OH;

cada uno de los m se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

cada uno de los n se selecciona independientemente de 1, 2, 3 y 4;

15 y

cada uno de los t se selecciona independientemente de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18.

26. Un conjugado que comprende el compuesto de la reivindicación 25 unido a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Fig. 1

Tamaño Medio del Tumor

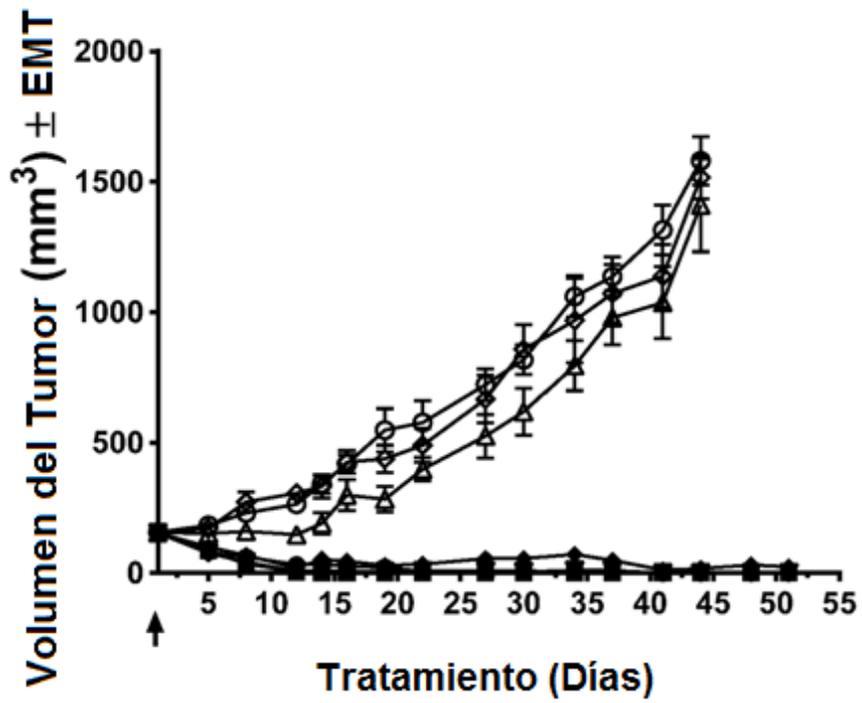


Fig. 2

Tamaño Medio del Tumor

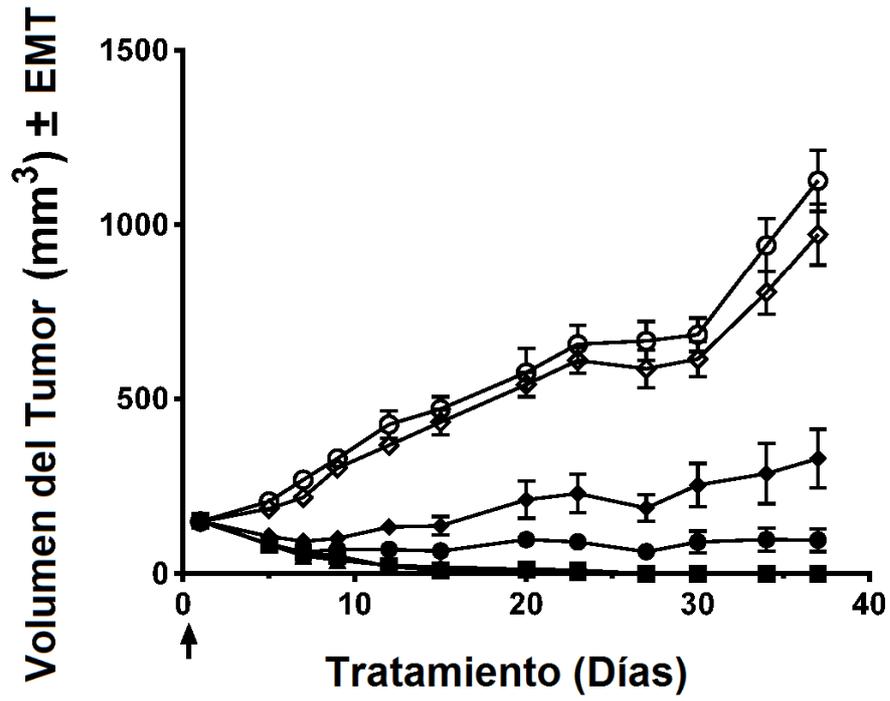


Fig. 3

Tamaño Medio del Tumor

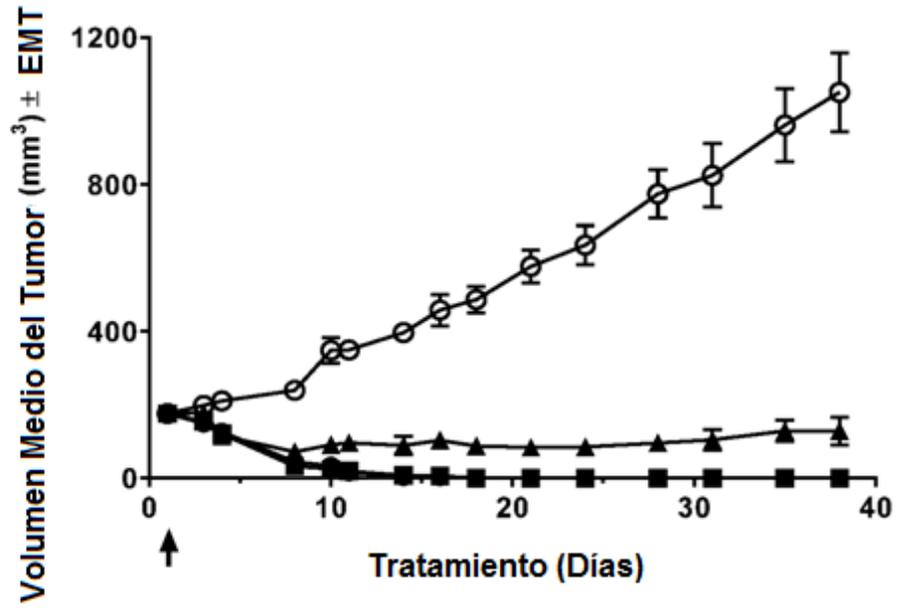


Fig. 4

Tamaño Medio del Tumor

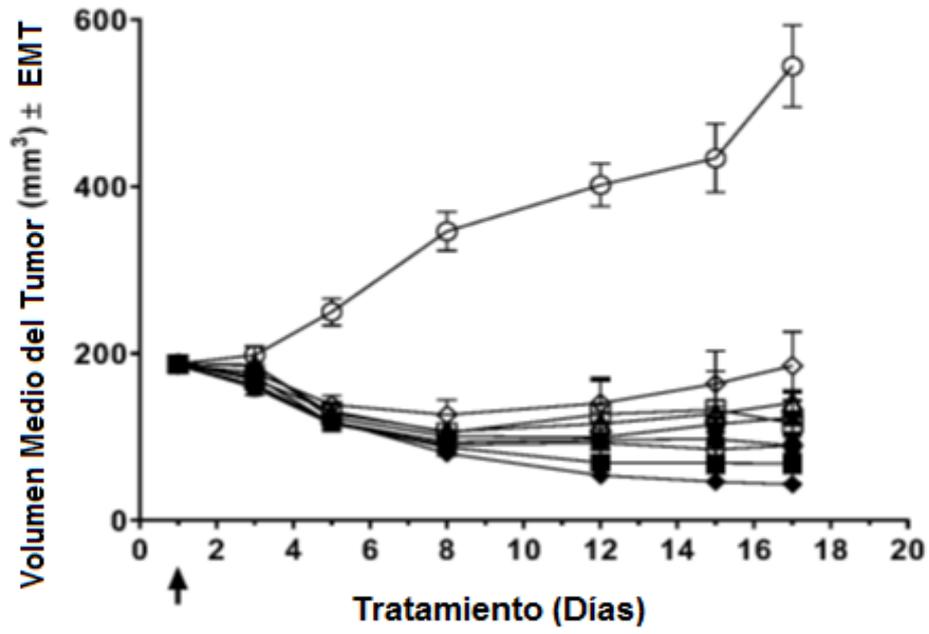


Fig. 5A

Volumen individual del tumor

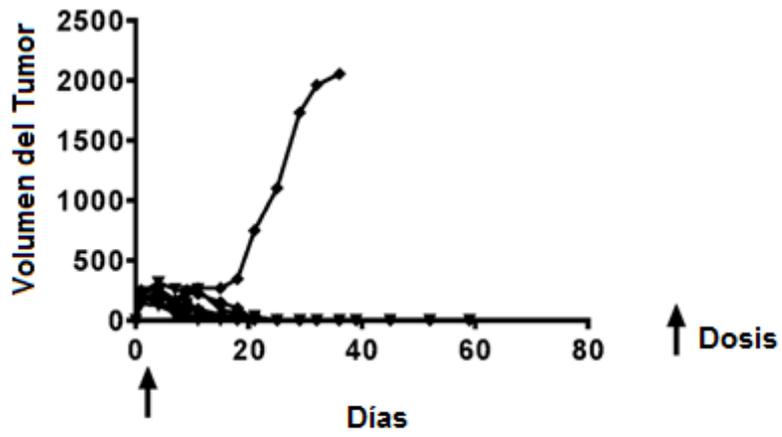


Fig. 5B

Volumen individual del tumor

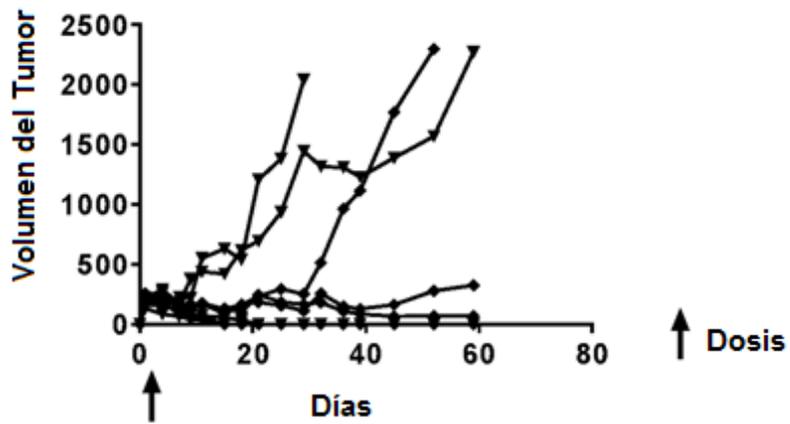


Fig. 6

Tamaño Medio del Tumor

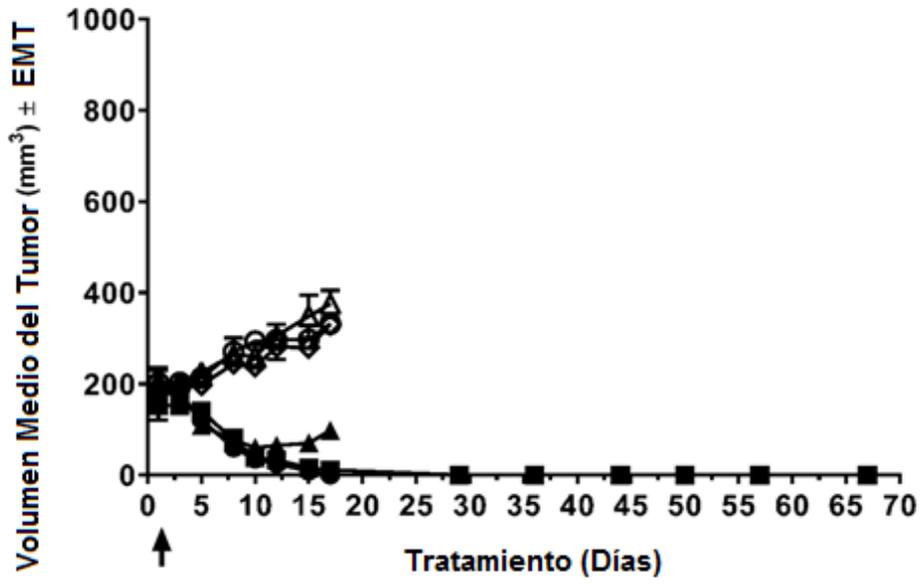


Fig. 7

Tamaño Medio del Tumor

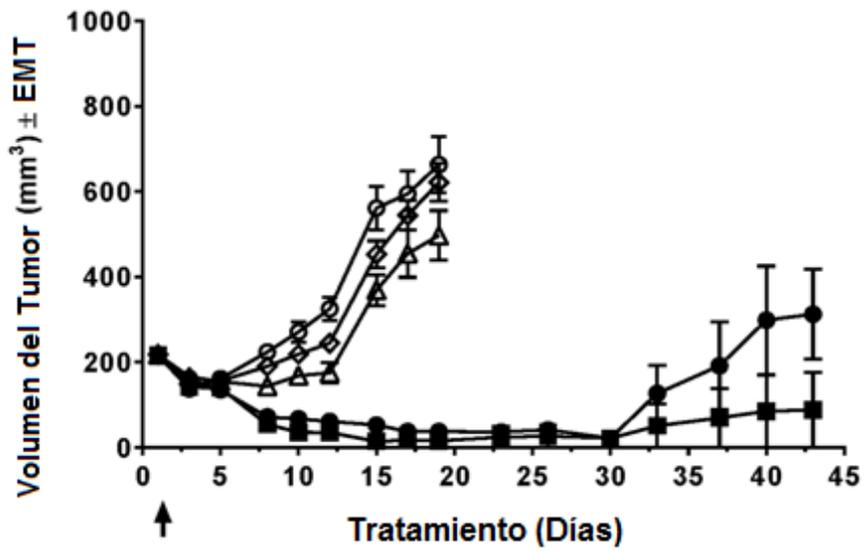


Fig. 8A

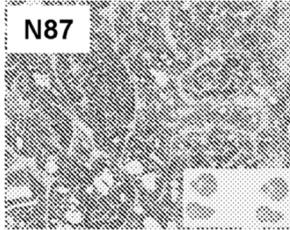


Fig. 8B



Fig. 8C

