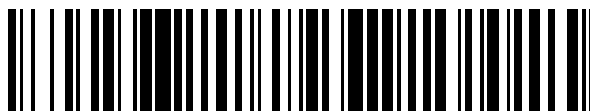


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 458**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2006** **E 17179428 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.12.2021** **EP 3248613**

54 Título: **Conjugados de fármaco-enlazador de beta-glucurónido**

30 Prioridad:

18.07.2005 US 700422 P

04.03.2006 US 779076 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.04.2022

73 Titular/es:

SEAGEN INC. (100.0%)

21823 30th Drive, S.E.

Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

JEFFREY, SCOTT

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 908 458 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de fármaco-enlazador de beta-glucurónido

5 **Antecedentes**

Los tratamientos con anticuerpos monoclonales están ganando impulso como tratamientos complementarios y de primera línea contra el cáncer. Los éxitos de los tratamientos con mAb de tipo AVASTIN (dirigido contra VEGF) para el cáncer de colon, RITUXAN (Rituximab; dirigido contra CD20) para linfoma no de Hodgkin y HERCEPTIN (dirigido contra Her2) para el cáncer de mama han demostrado que anticuerpos sin conjugar pueden mejorar la supervivencia del paciente sin la incidencia de una toxicidad significativamente aumentada.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden conjugarse con un agente terapéutico para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC). Los ADC pueden presentar eficacia aumentada, en comparación con un anticuerpo sin conjugar. El enlace del anticuerpo con el fármaco puede ser directo, o indirecto, mediante un enlazador. Uno de los componentes que se cree que es importante para desarrollar unos ADC eficaces y bien tolerados es la composición y la estabilidad del enlazador. Para algunos tipos de ADC, el enlazador proporciona deseablemente la estabilidad del suero, además, libera selectivamente el fármaco en o en el interior de la célula diana.

La unión de un enlazador a un mAb puede llevarse a cabo en varias formas, tales como a través de lisinas superficiales, acoplamiento reductor a hidratos de carbono oxidados, y a través de restos de cisteína liberados reduciendo los enlaces disulfuro intercadena. Se han descrito en la bibliografía varios enlaces a ADC, incluyendo enlaces basados en hidrazona, disulfuro, y péptidos. Algunos enlazadores basados en hidrazona y disulfuro pueden ser lábiles en circulación, dando como resultado una liberación del fármaco fuera del tejido diana. Se cree que esta liberación prematura del fármaco puede conducir a una toxicidad sistémica o a una toxicidad específica de órgano y/o, menor eficacia terapéutica óptima. Las estrategias de enlazadores basados en péptidos pueden proporcionar enlazadores de mayor estabilidad; sin embargo, la hidrofobicidad asociada aumentada de algunos enlazadores puede conducir a la agregación, particularmente con fármacos fuertemente hidrófobos. Dicha agregación puede conducir a una captación no específica de los ADC en tejidos no dianas, que afecta potencialmente a la toxicidad no diana.

Los β -glucurónidos son metabolitos producidos en el hígado y los riñones por una clase de enzimas conocidas como UDP-glucuronosil transferasas. Estas transferasas están implicadas en una transformación metabólica que conduce a la eliminación de los xenobióticos del cuerpo. La glucuronidación aumenta drásticamente la solubilidad de los compuestos sustrato, permitiendo una eliminación renal más eficaz.

β -glucuronidasa es una UDP-glucuronosil transferasa que está presente en los lisosomas de esencialmente todos los tejidos humanos. La enzima cataliza la hidrólisis del enlace glucosídico de los glucurónidos con configuración β y se informa que tiene una amplia especificidad de sustrato. Es la más activa a un pH bajo, con la eficacia enzimática disminuyendo hasta aproximadamente un 10 % a pH neutro. Se ha notificado que β -glucuronidasa se expresa en exceso en tejido de cáncer de mama con respecto al tejido peritumoral. A pesar de su naturaleza ubicua, la enzima es secuestrada eficazmente en el interior de los lisosomas celulares, y se observa una mínima tinción inmunohistoquímica en el espacio extracelular de las muestras de tejido normal. Una excepción es la actividad de la β -glucuronidasa que se observa en el tracto intestinal, que surge de la presencia de *E. coli*.

En contraste con los tejidos normales, el tejido intersticial del tejido tumoral necrótico expresa altos niveles de actividad β -glucuronidasa. Se cree que la fuente son células inflamatorias y que no proceden directamente del tejido tumoral. Basándose en esta observación, se han preparado profármacos de β -glucurónido (principalmente de doxorubicina) para la investigación en monoterapia. La lógica de esta estrategia es que el profármaco de β -glucurónido sería menos tóxico que el fármaco libre debido a su incapacidad de entrar en las células. El profármaco tiene dos destinos principales: el profármaco próximo al tumor se convertirá en fármaco libre, a la vez que el profármaco restante se eliminará rápidamente a través de los riñones. Se han indicado fármacos de β -glucurónido para el uso en ADEPT (Terapia con Profármaco Enzimático Dirigido a Anticuerpos). Los tratamientos basados en profármacos de β -glucurónido requieren, sin embargo, altos niveles sistémicos de profármacos, que pueden asociarse con toxicidades indeseadas.

Sigue existiendo necesidad, por lo tanto, de la administración dirigida de profármacos, que den como resultado la eliminación de células diana reduciendo a la vez la toxicidad de células no diana.

Existe una necesidad adicional de ADC con sistemas enlazadores que proporcionen un alto nivel de estabilidad en suero del enlazador y una solubilidad aumentada, permitiendo la conjugación eficaz de fármacos hidrófobos y que efectúen la administración intracelular de fármacos.

El documento WO 2004/010957 A2 se refiere a "conjugados de fármaco y su uso para tratar el cáncer".

Sanderson *et al.*, CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 11, n.º 2 Pt 1, enero de 2005, se refiere a la "estabilidad de

un fármaco-enlazador *in vivo* de un inmunoconjugado de auristatina enlazado al dipéptido anti-CD30.

El documento WO 03/086312 A2 se refiere a "conjugados que comprenden ligandos específicos de células cancerosas, un azúcar, y un agente quimioterapéutico contra el cáncer/agente de terapia por captura de neutrones de boro".

De Groot *et al.*, CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 8, n.º 9, julio de 2001 se refiere a "profármacos contra el cáncer para su uso en monoterapia".

De Graaf *et al.*, CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, vol. 8, enero de 2002, se refiere a la "liberación de fármaco mediada por beta-glucuronidasa" y a la "mejora de los efectos terapéuticos de los profármacos de glucorónido".

Desbene *et al.*, ANTICANCER DRUG DES, vol 13, n.º 8, diciembre de 1998, se refiere a profármacos de doxorrubicina con citotoxicidad reducida adecuados para activación específica de tumor".

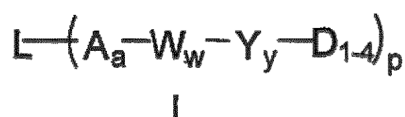
Estas y otras limitaciones y problemas del pasado se resuelven mediante la presente divulgación. (La cita de cualquier referencia en esta solicitud no es una admisión de que la referencia es el estado de la técnica de esta solicitud).

Breve resumen

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. Este y otro aspecto de la presente divulgación se pueden comprender con más detalle por referencia a la descripción a continuación.

La presente divulgación proporciona conjugados de ligando fármaco y conjugados de enlazador-fármaco para la administración dirigida de fármacos. Los conjugados ligando-fármaco incluyen un ligando, tal como un anticuerpo, para dirigir el conjugado a una célula o tejido diana. Los conjugados incluyen además un enlazador basado en β -glucurónido que comprende un sitio que se puede escindir mediante una enzima que tiene una actividad β -glucuronidasa. El enlazador se une al ligando y a un fármaco. La divulgación proporciona además métodos para tratar el cáncer, enfermedades inmunitaria, enfermedades infecciosas y otras enfermedades o trastornos que utilizan un conjugado de ligando fármaco que incluye un enlazador basado en β -glucurónido. Los conjugados de ligando fármaco presentan todavía, de forma sorprendente, estabilidad del suero para proporcionar una administración dirigida del fármaco unido a una célula diana.

En un aspecto, un compuesto conjugado de ligando fármaco que tiene la siguiente fórmula:

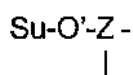


o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que:

- L- es una unidad de ligando,
- A_a-W_w-Y_y- es una unidad de enlazador (LU),
- A- una unidad ensanchadora opcional,
- a es 0, 1 o 2,
- cada -W- es, de forma independiente, una unidad de glucurónido,
- w es un número entero comprendido entre 1 y 2,
- Y- es una unidad separadora autoinmolable,
- y es 0, 1 o 2,
- p varía de 1 a aproximadamente 20, y
- D es una unidad de fármaco.

En algunas realizaciones, el ligando es un anticuerpo, tal como un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o un fragmento de anticuerpos de unión a antígeno.

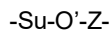
En algunas realizaciones, la unidad de glucurónido (-W-) comprende la fórmula:



en la que S es un resto de azúcar, -O'- es un enlace glucosídico (por ejemplo, escindible mediante una β -

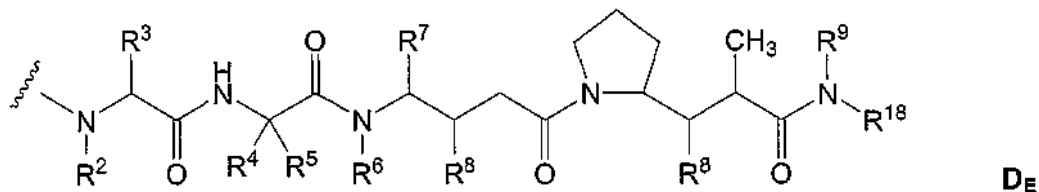
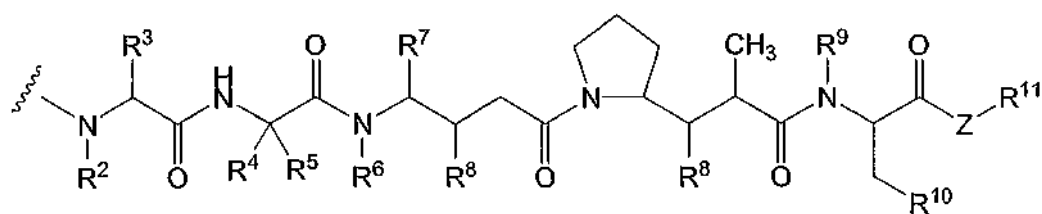
glucuronidasa) y Z es un grupo autoinmolable; y en el que Z forma un primer enlace covalente con Y o D y un segundo enlace covalente con L o A.

En algunas realizaciones, la unidad de glucurónido (-W-) comprende la fórmula:



en la que S es un resto de azúcar, -O'- es un enlace escindible mediante una β -Glucuronidasa y Z es un grupo autoinmolable; y en el que Z forma un enlace covalente con Y o D y Su forma un lace covalente con L o A.

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco se selecciona entre las fórmulas D_E y D_F:

D_ED_F

en la que:

R² se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R³ se selecciona entre H, alquilo -C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y X¹- (heterociclo C₃-C₈);

R⁴ se selecciona entre H, alquilo -C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y X¹- (heterociclo C₃-C₈);

R⁵ se selecciona entre H y metilo;

o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_n- en la que R^a y R^b se seleccionan de forma independiente entre H, alquilo C₁-C₈ y carbociclo C₃-C₈ y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;

R⁶ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R⁷ se selecciona entre H, alquilo -C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y X¹- (heterociclo C₃-C₈);

cada R₈ se selecciona de forma independiente entre H, OH, alquilo -C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈ y -O-(alquilo C₁-C₈);

R⁹ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R¹⁰ se selecciona entre arilo y heterociclo C₃-C₈;

Z es O, S, NH, o NR¹², en la que R¹² es alquilo C₁-C₈;

R¹¹ se selecciona entre H, alquilo -C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(R¹³O)_m-R¹⁴, y -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;

m es un número entero que varía entre 1-1000;

en el que R¹³ es alquilo C₂-C₈;

R¹⁴ es H o -alquilo (C₁-C₈);

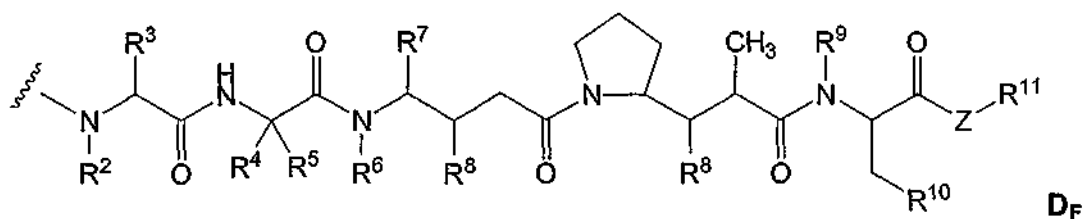
cada incidencia de R¹⁵ es, de forma independiente, H, COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, o -(CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₈; cada incidencia de R¹⁶ es, de forma independiente, H, alquilo C₁-C₈, o -(CH₂)_n-COOH;

R¹⁸ se selecciona entre -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo, -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(heterociclo C₃-C₈), y -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(carbociclo C₃-C₈);

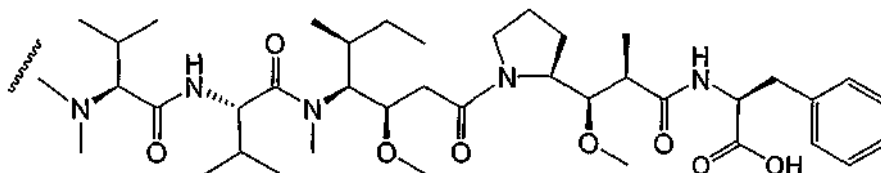
X¹ es alquileo C₁-C₁₀; y

n es un número entero comprendido entre 0 y 6.

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco es la fórmula D_F:

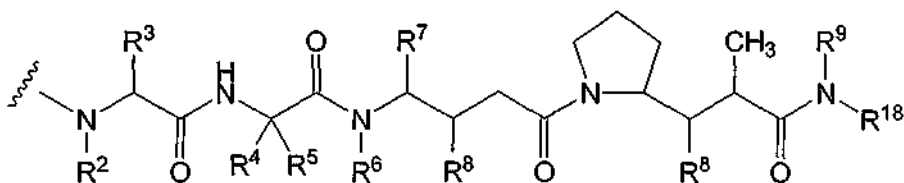


En algunas realizaciones, la unidad de fármaco tiene la fórmula:



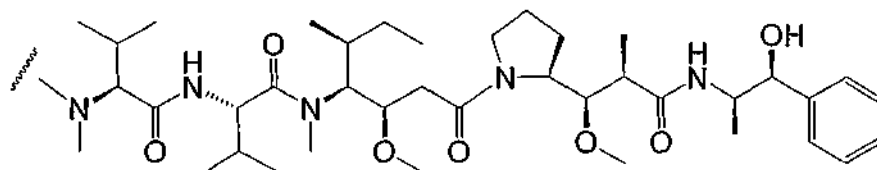
5

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco tiene la fórmula D_E:

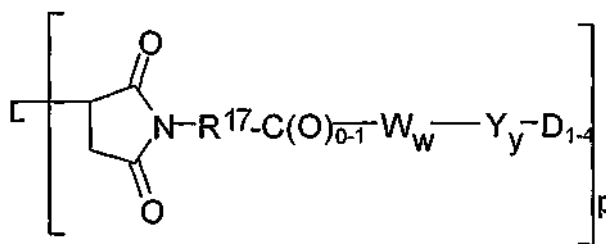


10

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco tiene la fórmula:

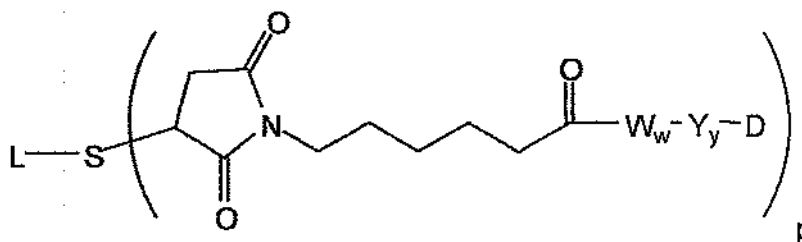


15 En algunas realizaciones, el compuesto conjugado de ligando fármaco tiene la siguiente fórmula:



20 en la que R¹⁷ es un enlace directo de alquileo-C₁-C₁₀, -carbociclo C₃-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arileno-, alquileo-C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-C₁-C₁₀ alquileo-, -alquileo C₁-C₁₀-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈-, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, o - (CH₂CH₂O)_rCH₂-CH₂-; y r es un entero que varía entre 1-10.

25 En algunas realizaciones, el compuesto conjugado de ligando fármaco tiene la fórmula:



Los compuestos conjugados de ligando fármaco pueden formularse como una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de compuesto conjugado de ligando fármaco, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede incluir opcionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de agente quimioterapéutico.

En otro aspecto, se divulga en el presente documento un método de destruir o inhibir la proliferación de células tumorales o células cancerosas. Los métodos incluyen generalmente tratar células tumorales o células cancerosas con una cantidad del compuesto conjugado de ligando fármaco o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, siendo eficaz para destruir o inhibir la proliferación de células tumorales o células cancerosas.

En otro aspecto, se divulga en el presente documento un método para tratar el cáncer. El método incluye generalmente administrar a un paciente una cantidad del compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, siendo la cantidad eficaz para tratar el cáncer. El método puede incluir opcionalmente administrar una cantidad eficaz de un agente anticanceroso adicional, un agente inmunosupresor o un agente antiinfeccioso.

En otro aspecto, se divulga un método para tratar una enfermedad autoinmunitaria. El método incluye administrar a un paciente una cantidad de compuesto conjugado de ligando fármaco, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, siendo la cantidad eficaz para tratar la enfermedad autoinmunitaria.

En otro aspecto, se divulga en el presente documento un método para tratar una enfermedad infecciosa. El método incluye generalmente administrar a un paciente una cantidad del compuesto conjugado de ligando fármaco o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, siendo la cantidad eficaz para tratar la enfermedad infecciosa.

Estos y otros aspectos de la divulgación se entenderán por referencia a la siguiente descripción detallada, tomada conjuntamente con los dibujos acompañantes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la reactividad de un enlazador-MMAF de glucurónido inactivado con cisteína conjugado con β -glucuronidasa de *E. coli*. Se añadió c1F6-9b inactivado con cisteína a la enzima y se incubó a 37 °C. Se vigiló la hidrólisis hasta el fármaco libre mediante HPLC (254 nm) muestreando cada 30 min. La vida media de la digestión fue de 41 min.

La Figura 2 muestra la actividad citotóxica *in vitro* de los ADC sobre las líneas de células CD30+ y CD70+ de cáncer: (A) Células Karpas 299 (CD30+) ALCL tratadas con ADC cAC10-9a dirigido contra CD30 y c1F6-9a del control sin unión durante 96 horas. (B) Células 786-O (CD70+) RCC con ADC c1F6-9b dirigido contra CD70 y cAC10-9b del control sin unión durante 96 horas. (C) Células Caki-1 (CD70+) RCC tratadas con c1F6-17 y cAC10-17 del control sin unión. Los resultados se muestran como promedio $\pm$ SD.

La Figura 3 muestra estudios *in vivo* con ADC. El panel A muestra el efecto de cAC10-9a (con MMAE) sobre ratones SCID que soportan tumores subcutáneos Karpas 299 (ALCL) CD30+. Un único tratamiento (flecha: día 14) de ratones con 0,75 (+), 1,0 ($\square$), y 3 (x) mg/kg proporcionó curas en 5/5 animales para cada grupo. Una dosis de 3 mg/kg del conjugado de control sin unión c1F6-9a (Δ) no produjo respuesta tumoral como en el grupo no tratado (*). El panel B muestra el efecto de c1F6-9b (con MMAF) sobre ratones SCID que soportan tumores subcutáneos 786-O (RCC) CD70+. Un único tratamiento (flecha: día 20) de ratones con 0,75 ($\blacktriangle$), 1,5 (Δ), y una única dosis de 3,0 (Δ) mg/kg proporcionó regresiones del tumor. Se observaron curas (2/7) en los grupos de dosis de 0,75 y 3 mg/kg. Todos los animales en el grupo no tratado (x) se sacrificaron en o antes del día 40.

Descripción detallada

Para mayor claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada se divide en las subsecciones que siguen.

Definiciones

A menos que se afirme otra cosa, se pretende que los siguientes términos y frases que se usan en el presente

documento tengan los siguientes significados. Cuando se usan nombre comerciales en el presente documento, los nombres comerciales incluyen la formulación del producto del nombre comercial, el fármaco genérico, y el(los) principio(s) farmacéutico(s) activo(s) del producto del nombre comercial, a no ser que el contexto indique otra cosa.

- 5 El término "anticuerpo" se utiliza en el presente documento en el sentido más amplio y se refiere a anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecífico), y a fragmentos de anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada (por ejemplo, unión a antígeno). El anticuerpo puede ser de cualquier tipo o clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA) o subclases (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

10 Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera (C_L) y dominios constantes de la cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} , según sea adecuado para la clase de anticuerpo. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencias naturales (por ejemplo, dominios constantes de secuencias naturales humanas) o las secuencias variantes de aminoácidos de los mismos.

15 Un anticuerpo puede tener una o más "funciones efectoras" que se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de la secuencia natural o una región Fc de la secuencia variante) de un anticuerpos. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen la unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por defecto de los receptores superficiales celulares (por ejemplo, receptores de los linfocitos B; BCR), etc.

25 Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenarios" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. El polipéptido F_v comprende además normalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore, eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

30 El término "diacuerpo" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica. Utilizando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios ($V_H - V_L$) de la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen los diacuerpos más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 0 404 097; WO 93/11161; y en Hollinger *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448. Los dos sitios de unión a antígeno pueden ser iguales o diferentes.

35 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante el método de Lowry, o en más de un 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia del extremo N o la secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción o sin reducción utilizando la tinción de plata o del azul de Coomassie. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en el interior de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

50 Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés es uno capaz de unirse al antígeno con afinidad suficiente de tal manera que el anticuerpo es útil al dirigirse a una célula que expresa el antígeno.

Los términos "se une específicamente" y una "unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo con un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente 1×10^7 M⁻¹, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

60 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco (por ejemplo, un conjugado de ligando fármaco o un conjugado de enlazador fármaco) eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir en alguna extensión, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento

del cáncer, la eficacia, por ejemplo, puede medirse evaluando el tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o mediante la determinación de la tasa de respuesta (RR).

Las expresiones "polipéptido diana", "proteína diana" y "antígeno diana" se refieren a una proteína, polipéptido, y además, en el caso de un "antígeno diana", otra molécula sobre la superficie de o asociada con una célula diana.

"Compuesto", como en las expresiones "compuesto de fórmula", "compuesto de la fórmula", y similares, se refiere a y abarca el propio compuesto químico así como, tanto si se indica explícitamente como si no, y a menos que el contexto aclare que se deben excluir los siguientes: las formas amorfas y cristalinas del compuesto, incluyendo las formas polimórficas, donde estas formas puedan ser parte de una mezcla o estar en aislamiento; las formas de ácido libre y base libre del compuesto, que son normalmente las formas que muestran en las estructuras proporcionadas en el presente documento; los isómeros del compuesto, que se refieren a isómeros ópticos, e isómeros tautómeros, donde los isómeros ópticos incluyen enantiómeros y diastereómeros, los isómeros quirales y no quirales, y los isómeros ópticos incluyen isómeros ópticos aislados así como mezclas de isómeros ópticos que incluyen mezclas racémicas y mezclas no racémicas; donde un isómero puede estar en forma aislada o en premezcla con uno o más isómeros diferentes; isótopos del compuesto, incluyendo compuestos que contienen deuterio y tritio, e incluyendo compuestos que contienen radioisótopos, incluyendo radioisótopos terapéutica y diagnósticamente eficaces; formas multiméricas del compuesto, incluyendo formas dimericas, triméricas, etc.; las sales del compuesto, preferentemente las sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo las sales de adición de ácido y las sales de adición de base, incluyendo las sales que tienen contraiones orgánicos y contraiones inorgánicos, e incluyendo las formas de iones híbridos, donde si un compuesto se asocia con dos o más contraiones, los dos o más contraiones pueden ser iguales o diferentes; y solvatos del compuesto, incluyendo hemisolvatos, monosolvatos, disolvatos, etc., incluyendo solvatos orgánicos y solvatos inorgánicos, dichos solvatos inorgánicos incluyen hidratos; donde si un compuesto se asocia con dos o más moléculas de disolvente, las dos o más moléculas de disolvente pueden ser iguales o diferentes. En algunos casos, se hace referencia en el presente documento a un compuesto de la divulgación incluirán una referencia explícita a una de las anteriores formas, *por ejemplo*, sales y solvatos, sin embargo, esta referencia es solo para enfatizar, y no se considera como excluyente de las diferentes formas anteriores como se ha identificado anteriormente.

El término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada que tiene el número indicado de átomos de carbono (por ejemplo, "alquilo C₁-C₈" se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1 a 8 átomos de carbono). Cuando el número de átomos de carbono no está indicado, el grupo alquilo utilizado tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos "alquilo C₁-C₈" incluyen, aunque no de forma limitativa, metilo (Me, -CH₃), etilo (Et, -CH₂CH₃), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH₂CH₂CH₃), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH₃)₃), 1-pentilo (n-pentilo, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-pentil (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-pentil (-CH(CH₂CH₃)CH₂CH₃), 2-metil-2-butil (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-metil-2-butil (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 3-metil-1-butil (-CH₂CH₂CH(CH₃)CH₃), 2-metil-1-butil (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-hexil (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-hexil (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-hexil (-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃)), 2-metil-2-pentil (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-metil-2-pentil (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-metil-2-pentil (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)CH₃), 3-metil-3-pentil (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-metil-3-pentil (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)CH₃), 2,3-dimetil-2-butil (-C(CH₃)₂CH(CH₃)CH₃), y 3,3-dimetil-2-butil (-CH(CH₃)C(CH₃)₃). Un grupo alquilo puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, -O-(alquilo C₁-C₈), arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona de forma independiente entre -H, alquilo C₁-C₈ no sustituido y arilo.

El término "alquenilo" se refiere a un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, *es decir*, un doble enlace carbono-carbono, sp². Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa: etileno o vinilo (-CH=CH₂), alilo (-CH₂CH=CH₂), ciclopentenilo (-C₅H₇) y 5-hexenilo (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH=CH₂).

El término "alquinilo" se refiere a un hidrocarburo C₂-C₁₈ que contiene átomos de carbono normales, secundarios, terciarios o cíclicos con al menos un sitio de insaturación, *es decir*, un doble enlace carbono-carbono, sp. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa: acetilénico (-C≡CH) y propargilo (-CH₂C≡CH).

El término "alquilenilo" se refiere a un radical hidrocarburo saturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 1-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivado mediante la retirada de dos átomos de hidrógeno de los mismos o dos átomos de carbono diferentes de un alcano precursor. Los alquilenos típicos incluyen, aunque no de forma limitativa: metileno (-CH₂-), 1,2-etil (-CH₂CH₂-), 1,3-propil (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-butil (-CH₂CH₂CH₂CH₂-) y similares.

El término "alquenilenilo" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivado mediante la retirada de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alqueno precursor. Los radicales alquenilenilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa: 1,2-etileno (-CH=CH-).

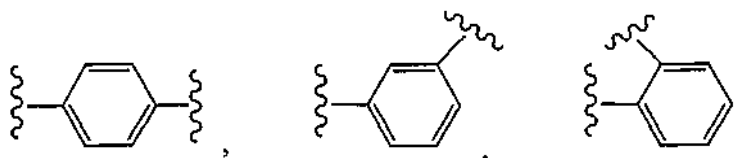
El término "alquinileno" se refiere a un radical hidrocarburo insaturado, de cadena lineal o ramificada o cíclico de 2-18 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes derivado mediante la retirada de dos átomos de hidrógeno procedente de átomos de carbono de un alquino precursor. Los radicales alquinileno típicos incluyen, aunque no de forma limitativa: acetileno ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), propargilo ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$) y 4-pentinilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$).

El término "arilo" se refiere a un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono derivado mediante la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras a modo de ejemplo como "Ar". Un grupo arilo puede estar sustituido o no sustituido. Los grupos arilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa, los radicales se derivan a partir de benceno, benceno sustituido, fenilo, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares. Un arilo puede estar sustituido con uno o más grupos incluyendo, aunque no de forma limitativa, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, $-\text{O}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_8)$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, $-\text{halógeno}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ y $-\text{CN}$; en el que cada R' se selecciona de forma independiente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$ y arilo no sustituido.

El término "arilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp^3 , está reemplazado por un radical arilo. Los grupos arilalquilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares. El grupo arilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del resto arilalquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el resto arilo tiene de 5 a 14 átomos de carbono.

El término "heteroarilalquilo" se refiere a un radical alquilo acíclico en el que uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono, normalmente un átomo de carbono terminal o sp^3 , está sustituido por un radical heteroarilo. Los grupos heteroarilalquilo típicos incluyen, aunque no de forma limitativa, 2-bencimidazolilmetilo, 2-furilmetilo, y similares. El grupo heteroarilalquilo comprende 6 a 20 átomos de carbono, por ejemplo, el resto alquilo, incluyendo los grupos alcanilo, alquenilo o alquinilo, del grupo heteroarilalquilo tiene de 1 a 6 átomos de carbono y el resto heteroarilo tiene de 5 a 14 átomos del anillo, normalmente 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S, siendo el resto átomos de carbono. el resto heteroarilo del grupo heteroarilalquilo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono) o un biciclo que tiene 7 a 10 miembros del anillo (4 a 9 átomos de carbono) y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P y S, por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6].

El término "arileno" se refiere a un grupo arilo que tiene dos enlaces covalentes y puede estar en las configuraciones para, meta, u orto como se muestra en las siguientes estructuras:



en las que el grupo fenilo puede estar sustituido o no sustituido o sustituido con hasta cuatro grupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$, $-\text{O}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_8)$, $-\text{arilo}$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, $-\text{halógeno}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ y $-\text{CN}$; en el que cada R' se selecciona de forma independiente entre H, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_8$ y arilo.

Las expresiones "alquilo sustituido", "arilo sustituido", y "arilalquilo sustituido" se refieren a alquilo, arilo, y arilalquilo, respectivamente, en el que uno o más átomos de hidrógeno se sustituyen, cada uno independientemente, con un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, aunque no de forma limitativa, $-\text{X}$, $-\text{R}$, $-\text{O}^-$, $-\text{OR}$, $-\text{SR}$, $-\text{S}^-$, $-\text{NR}_2$, $-\text{NR}_3$, $=\text{NR}$, $-\text{CX}_3$, $-\text{CN}$, $-\text{OCN}$, $-\text{SCN}$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $-\text{NCS}$, $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $=\text{N}_2$, $-\text{N}_3$, $\text{NRC}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{R}$, $-\text{OS}(=\text{O})_2\text{OR}$, $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}$, $-\text{S}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR})_2$, $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$, $-\text{PO}_3^-$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{R}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{X}$, $-\text{C}(\text{S})\text{R}$, $-\text{CO}_2\text{R}$, $-\text{CO}_2^-$, $-\text{C}(=\text{S})\text{OR}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}$, $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$, $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_2$, y $-\text{C}(=\text{NR})\text{NR}_2$, en donde cada X es, de forma independiente, un halógeno: F, Cl, Br o I; y cada R es independientemente $-\text{H}$, alquilo $\text{C}_2\text{-C}_{18}$, arilo $\text{C}_6\text{-C}_{20}$, heterociclo $\text{C}_3\text{-C}_{14}$, un grupo protector o resto profármaco. Los grupos alquileno, alquenileno y alquinileno tal como se han descrito anteriormente también se pueden sustituir de forma similar.

Los términos "heteroarilo" y "heterociclo" se refieren a un sistema de anillo en el que uno o más átomos del anillo es un heteroátomo, *por ejemplo*, nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. El radical heterociclo comprende 1 a 20 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene 3 a 7 miembros del anillo (2 a 6 átomos de carbono y 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 miembros del anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados entre N, O, P, y S), por ejemplo: un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6], o [6,6]. Se describen heterociclos en Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), particularmente Capítulos 1, 3, 4, 6, 7, y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A Series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York,

1950 hasta la actualidad), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960).

Los ejemplos de heterociclos incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiofenilo oxidado con azufre, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzoimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, pteridinilo, 4aH-carbazolilo, carbazolilo, β -carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzoisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, e isatinoilo.

A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a carbonos se unen en las siguientes posiciones: posición 2, 3, 4, 5, o 6 de una piridina; posición 3, 4, 5, o 6 de una piridazina; posición 2, 4, 5, o 6 de una pirimidina; posición 2, 3, 5, o 6 de una pirazina; posición 2, 3, 4, o 5 de un furano, tetrahidrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol; posición 2, 4, o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol; posición 3, 4, o 5 de un isoxazol, pirazol, o isotiazol; posición 2 o 3 de una aziridina; posición 2, 3, o 4 de una azetidina; posición 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una quinolina; o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una isoquinolina. De forma aún más típica, los heterociclos unidos a carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo y 5-tiazolilo.

A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno están unidos en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina, o 1H-indazol; posición 2 de un isoindol o isoindolina; posición 4 de una morfolina; y posición 9 de un carbazol o β -carbolina. De forma aún más típica, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

El término "carbociclo" se refiere a un anillo saturado o insaturado que tiene 3 a 7 átomos de carbono como un monociclo o 7 a 12 átomos de carbono como un biciclo. Los carbociclos monocíclicos tienen de 3 a 6 átomos de anillo, aún más normalmente 5 o 6 átomos de anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen de 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos del anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

Un "carbociclo C₃-C₈" es un anillo carbocíclico de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros, saturado o insaturado, no aromático. Los carbociclos C₃-C₈ representativos incluyen, aunque no de forma limitativa, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo y -ciclooctadienilo. Un grupo "carbociclo C₃-C₈" puede estar sustituido o no sustituido con uno o más grupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente entre H, alquilo C₁-C₈ y arilo.

Un "carbociclo C₃-C₈" se refiere a un grupo carbociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo está sustituido con un enlace.

Un "alquileo C₁-C₁₀" es un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal, de fórmula -(CH₂)₁₋₁₀-. Los ejemplos de alquileo -C₁-C₁₀- incluyen metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno y decaleno.

Un "heterociclo C₃-C₈" se refiere a un carbociclo C₃-C₈ aromático o no aromático en el que uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo están sustituidos de forma independiente con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. Los ejemplos representativos de un heterociclo C₃-C₈ incluyen, aunque no de forma limitativa, benzofuranilo, benzotiofeno, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo. Un heterociclo C₃-C₈ puede estar sustituido o no sustituido con hasta siete grupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en el que cada R' se selecciona de forma independiente entre H, alquilo C₁-C₈ y arilo.

"Heterociclo C₃-C₈" se refiere a un grupo heterociclo C₃-C₈ definido anteriormente en el que uno de los átomos de hidrógeno del grupo carbociclo está sustituido con un enlace. Un heterociclo -C₃-C₈ puede estar sustituido o no sustituido con hasta seis grupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; en el que cada R' se selecciona de forma independiente entre H, alquilo C₁-C₈ y arilo.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal orgánica o inorgánica farmacéuticamente de un conjugado de ligando fármaco o un conjugado de enlazador fármaco. Los conjugados pueden contener al menos un grupo amino, y, de acuerdo con ello, se pueden formar sales de adición de ácidos con el grupo amino. Las sales ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluensulfonato y pamoato [es decir, 1,1' metilen bis -(2 hidroxí 3 naftoato)]. Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraion. El contraion puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga del compuesto precursor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. De este modo, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/ uno o más contraiones.

Las frases "solvato farmacéuticamente aceptable" o "solvato" se refiere a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un conjugado de ligando fármaco o conjugado de enlazador fármaco. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no de forma limitativa, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

Los ejemplos de un "paciente" o "sujeto" incluyen, aunque no de forma limitativa, un ser humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdos, cabras, vaca, caballo, perros, gatos, pájaros y aves. En una realización ilustrativa, el individuo o sujeto es un ser humano.

Los términos "tratar" o "tratamiento", a no ser que el contexto indique otra cosa, se refieren tanto a un tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, cuyo objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado, como el desarrollo o proliferación del cáncer. Los beneficios o resultados clínicos deseados incluyen, aunque no de forma limitativa, alivio de síntomas, disminución de la extensión de una enfermedad, patología estabilizada (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización en la evolución de la enfermedad, mejora o paliación de la patología, y remisión (tanto parcial como total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibiera tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o trastorno así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se quiera prevenir la afección o trastorno.

En el contexto del cáncer, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todos de: evitar el crecimiento de células tumorales, células cancerosas, o de un tumor; evitar la replicación de las células tumorales o las células cancerosas, disminuir la carga tumoral total o disminuir el número de células cancerosas, y mejorar uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad.

En el contexto de una enfermedad autoinmunitaria, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todos de: evitar la replicación de las células asociadas con una patología autoinmunitaria incluyendo, aunque no de forma limitativa, las células que producen un anticuerpo autoinmune, disminuir la carga de anticuerpo autoinmune y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad autoinmune.

En el contexto de una enfermedad infecciosa, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todos de: evitar el crecimiento, la multiplicación o la replicación del patógeno que produce la enfermedad infecciosa y mejorar uno o más síntomas de una enfermedad infecciosa.

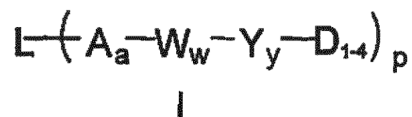
En el presente documento se utilizan las siguientes abreviaturas: MMAE es mono-metil auristatina E (PM 718); MMAF es N-metilvalina-valina-dolaisoleucina-dolaproína-fenilalanina (PM 731,5); AEVB es auristatina E valeril bencilhidrazona, un enlazador lábil a ácido a través del extremo C de AE (PM 732); DMSO es dimetilsulfóxido; DMF es N,N dimetilformamida; HPLC es cromatografía líquida de alta presión, THF es tetrahidrofurano; y Mc-OSu es el éster de maleimidocaproil N-hidroxisuccinimido.

Conjugados de ligando-fármaco

La presente enseñanza se obtiene de una serie de compuestos de fármaco-enlazador y compuestos conjugados que contienen un compuesto de fármaco (-D) y una unidad de enlazador que comprende una unidad de glucurónido (-W-). Los compuestos de fármaco-enlazador son útiles como entidades individuales, o se pueden conjugar con ligandos

L, en algunas realizaciones, anticuerpos). La unidad de enlazador puede funcionar para proporcionar una liberación dirigida adecuada, de un(os) compuesto(s) de fármaco(s). Además, algunas unidades de enlazador pueden tener múltiples fármacos unidos (por ejemplo, uno a cuatro fármacos unidos se pueden representar como -LU-(D)₁₋₄).

- 5 En un grupo de realizaciones, los compuestos conjugados de ligando fármaco en general comprenden la siguiente fórmula I:



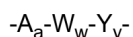
- 10 o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que:

L- es una unidad de ligando,
 -A_a-W_w-Y_y- es una unidad de enlazador (LU),
 -A- una unidad ensanchadora opcional,
 a es 0, 1 o 2,
 cada -W- es, de forma independiente, una unidad de glucurónido,
 w es un número entero comprendido entre 1 y 2,
 -Y- es una unidad separadora autoinmolable,
 y es 0, 1 o 2,
 p varía de 1 a 20, y
 -D es una unidad de fármaco.

- En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 1, e y es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 1, e y es 0 o 1. En algunas realizaciones, a es 0, w es 1, e y es 0. En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 1, e y es 1. En algunas realizaciones, a es 1, w es 1, e y es 0. En algunas realizaciones, a es 1, w es 1, e y es 1. En algunas realizaciones, p es 1 a 10, 1 a 8, 1 a 6, 1 a 4, 6, 4 o 2. Cada una de estas unidades se describe con más detalle en el presente documento.

Unidades de enlazador

- 30 Una "unidad de enlazador" (LU) es un compuesto bifuncional que se puede usar para enlazar una unidad de fármaco y una unidad de ligando para formar un compuesto conjugado de ligando fármaco (denominado también compuesto conjugado de ligando-enlazador-fármaco), con una unidad de fármaco para formar una unidad de enlazador-fármaco, o que es útil en la formación de inmunoconjugados. En algunas realizaciones, la unidad de enlazador tiene la fórmula:



en la que:

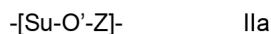
- 40 -A- una unidad ensanchadora opcional,
 a es 0, 1 o 2,
 cada -W- es, de forma independiente, una unidad de glucurónido,
 45 w es un número entero comprendido entre 1 y 2,
 -Y- es una unidad separadora autoinmolable opcional, e
 50 y es 0, 1 o 2.

En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 1, e y es 0, 1 o 2. En algunas realizaciones, a es 0 o 1, w es 1, e y es 0 o 1.

55 La unidad de glucurónido

- La unidad de glucurónido (-W-) enlaza una unidad ensanchadora con una unidad separadora si están presentes las unidades de estiramiento y separadoras, enlaza una unidad ensanchadora con el resto del fármaco si está ausente la unidad separadora, y enlaza la unidad del ligando con la unidad del fármaco si están ausentes las unidades de estiramiento y separadora. La unidad de glucurónido incluye un sitio que se escinde mediante una enzima β-glucuronidasa.

En algunas realizaciones, la unidad de glucurónido comprende un resto azúcar (Su) enlazado mediante un enlace glucósido (-O') a un grupo autoinmolable (Z) de la fórmula:



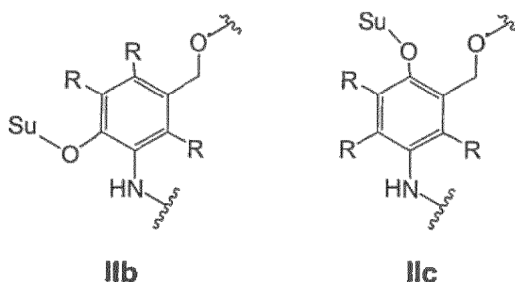
El enlace glucosídico (-O') es normalmente un sitio de enlace a la β -glucuronidasa, tal como una unión escindible por una β -glucuronidasa lisosómica humana.

En el contexto de una unidad de glucurónido, el término "grupo autoinmolable" se refiere a un resto químico di o trifuncional que es capaz de unirse covalentemente junto a dos o tres restos químicos separados (es decir, el resto azúcar (mediante un enlace glucosídico), una unidad de fármaco (directa o indirectamente mediante una unidad separadora), y, en algunas realizaciones, una unidad de ligando (directa o indirectamente mediante una unidad ensanchadora en una molécula estable. El grupo autoinmolable se separará de forma espontánea del primer resto químico (por ejemplo, la unidad separadora o la unidad de fármaco) si se escinde su unión al resto de azúcar.

En algunas realizaciones, el resto de azúcar (Su es hexosa cíclica, tal como piranosa, o una pentosa cíclica, tal como una furanosa. En algunas realizaciones, la piranosa es un glucurónido o hexosa. El resto de azúcar está normalmente en la conformación β -D. En una realización específica, la piranosa es un resto β -D-glucurónido (es decir, un ácido β -D-glucurónico unido a un grupo Z autoinmolable mediante un enlace glucosídico que es escindible por la β -glucuronidasa). En algunas realizaciones, el resto de azúcar no está sustituido (por ejemplo, una hexosa cíclica o pentosa cíclica que se produce naturalmente). En otras realizaciones, el resto de azúcar puede ser un β -D-glucurónido sustituido (es decir, ácido glucurónico sustituido con uno o más grupos, tales como hidrógeno, hidroxilo, halógeno, azufre, nitrógeno o alquilo inferior.

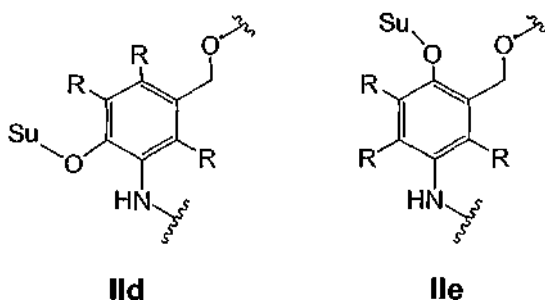
En algunas realizaciones, el grupo Z autoinmolable es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB), como se describe adicionalmente en el presente documento. Se conocen en la técnica otros grupos autoinmolables adecuados.

En algunas realizaciones, la unidad de glucurónido tiene una de las siguientes fórmulas:



en las que S es un resto de azúcar, el enlace glucosídico comprende el enlace de oxígeno entre Su y el grupo Z autoinmolable, y cada R es, de forma independiente, hidrógeno, halo (por ejemplo, cloro, bromo, flúor, etc.), -CN, -NO₂, u otro grupo aceptor o donante de electrones, con la condición de que la unidad de glucurónido (y Z en particular) experimente autoinmolación tras la escisión del enlace glucosídico. En algunas realizaciones, cada R es, de forma independiente, hidrógeno, halo (por ejemplo, cloro, bromo, flúor, etc.), -CN o -NO₂.

En algunas realizaciones, la unidad de glucurónido tiene una de las siguientes fórmulas:



en las que S es un resto de azúcar, el enlace glucosídico (-O') comprende el enlace de oxígeno entre Su y el grupo Z autoinmolable, y cada R es, de forma independiente, hidrógeno.

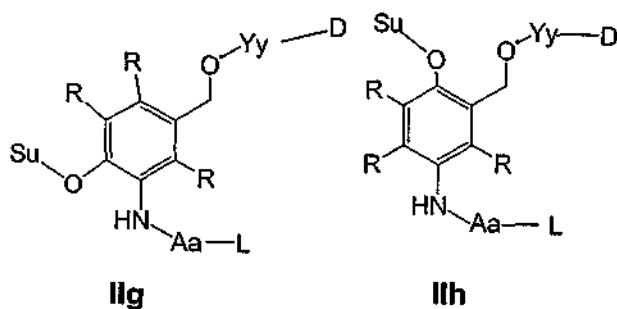
En algunas realizaciones, el grupo (Z) autoinmolable está unido covalentemente al resto de azúcar, a la unidad de

fármaco (directa o indirectamente mediante la(s) unidad(es) separadora(s) y a la unidad de ligando (directa o indirectamente mediante la(s) unidad(es) de estiramiento)). En algunas realizaciones, un conjugado enlazador de fármaco tiene la siguiente fórmula:



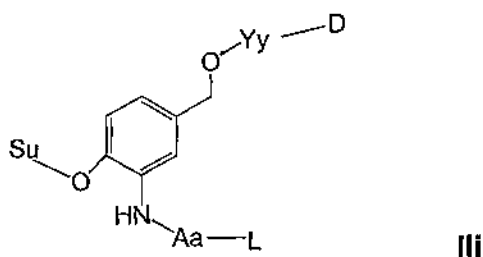
en la que Su, O', Z, Y, y, D, A y a se definen como anteriormente. Normalmente de 1 a 20 de dichos conjugados de fármaco-enlazador pueden unirse a la unidad de ligando.

En algunas realizaciones, un compuesto conjugado de ligando fármaco (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo fármaco (ADC)) que comprende la unidad de glucurónido tiene una de las siguientes fórmulas:



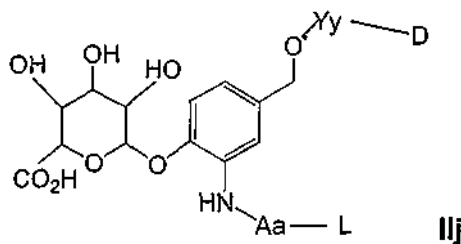
en la que Su, Y, y, D, A, a, R y L se definen como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, un compuesto conjugado de ligando fármaco que comprende la unidad de glucurónido tiene la siguiente fórmula:



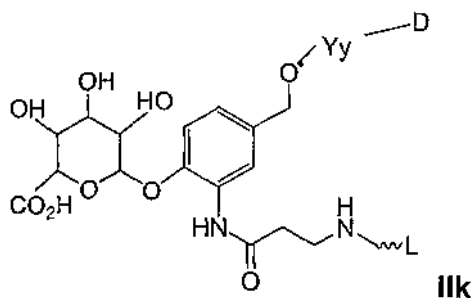
en la que Su, Y, y, D, A, a y L se definen como se ha descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, un compuesto conjugado de ligando fármaco que comprende la unidad de glucurónido tiene la siguiente fórmula:



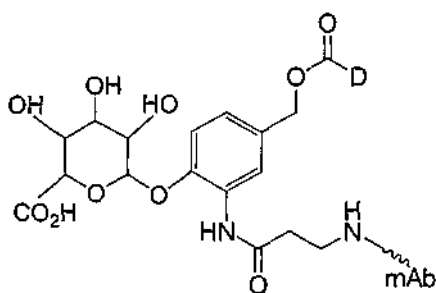
en la que Y, y, D, A, a y L son como se han definido anteriormente.

En algunas realizaciones, un compuesto conjugado de ligando fármaco que comprende la unidad de glucurónido tiene la siguiente fórmula:



en la que Y, y, D y L se definen como se ha descrito anteriormente.

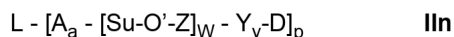
- 5 En algunas realizaciones, un compuesto conjugado de ligando fármaco que comprende la unidad de glucurónido tiene la siguiente fórmula:



IIIm

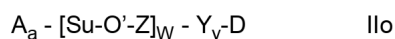
10 en la que D es como se ha descrito anteriormente y mAb es un anticuerpo monoclonal.

En otro grupo de realizaciones, la unidad de ligando está unida (directa o indirectamente) al resto azúcar (S), que está unido al grupo (Z) autoinmolable que está unido (directa o indirectamente) a la unidad de fármaco, de acuerdo con la siguiente fórmula.



20 en la que A, a, Su, O', Z, w, Y, y, D y L se definen como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el resto de azúcar (Su) puede estar unido directamente a la unidad de ligando o indirectamente mediante una unidad ensanchadora. El grupo (Z) autoinmolable puede estar unido directamente a la unidad de fármaco o indirectamente mediante una unidad separadora.

En realizaciones relacionadas, un compuesto de fármaco-enlazador tiene la siguiente fórmula:



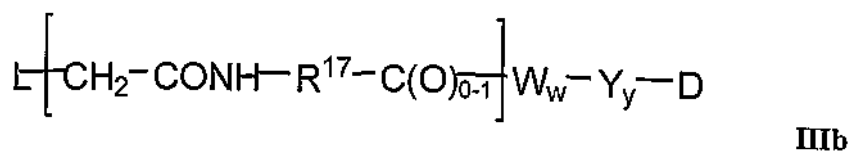
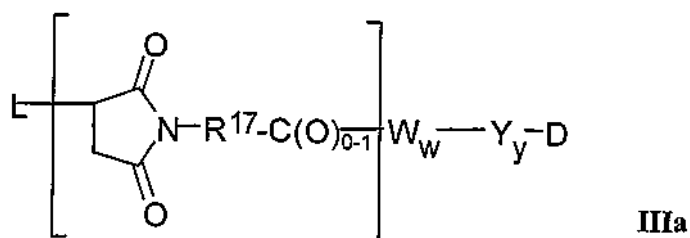
en la que A, a, Su, O', Z, w, Y, y y D son como se ha definido anteriormente. Normalmente de 1 a 20 de dichos compuestos de fármaco pueden estar unidos a la unidad de ligando.

La unidad ensanchadora

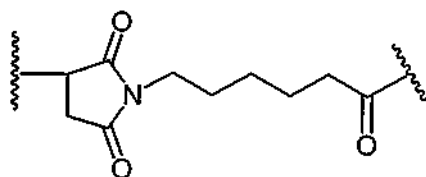
La unidad ensanchadora (-A-), cuando está presente, es capaz de unir una unidad de ligando con una unidad de glucurónido (-W-). En este sentido, una unidad de ligando (L) tiene un grupo funcional que puede formar un grupo funcional de un ensanchador. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en una unidad de ligando, tanto naturalmente como mediante manipulación química incluyen, aunque no de forma limitativa, sulfhidrilo (-SH), amino, hidroxilo, carboxi, el grupo hidroxilo anómero de un hidrato de carbono, y carboxilo. En algunas realizaciones, los grupos funcionales de la unidad de ligando son sulfhidrilo y/o amino. Se pueden generar grupos sulfhidrilo mediante reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un ligando. Se pueden generar también grupos sulfhidrilo mediante la reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un ligando utilizando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otro reactivo generador de sulfhidrilos.

En una realización, la unidad ensanchadora forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de ligando. Se

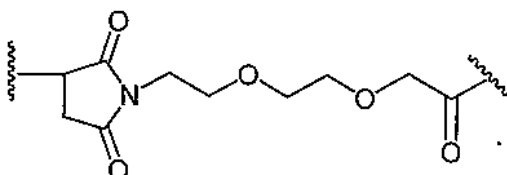
puede derivar el átomo de azufre de un grupo sulfhidrido de un ligando. Las unidades ensanchadoras representativas de esta realización se representan gráficamente en los corchetes de las fórmulas IIIa y IIIb, donde L-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se ha definido anteriormente, y R¹⁷ es un enlace directo o seleccionado de alquileo C₁-C₁₀, -carbociclo C₃-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -arileno-, -alquileo-arileno C₁-C₁₀, -arileno-C₁-C₁₀ alquileo-, -alquileo C₁-C₁₀- (carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈, -alquileo C₁-C₁₀-(heterociclo C₃-C₈)-, -(heterociclo C₃-C₈)-alquileo C₁-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r-, -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-CH₂-; y r es un entero que varía entre 1-10. Debe entenderse a partir de todas las realizaciones ilustrativas de Fórmula I, tales como III-VI, que incluso no se han denotado de forma expresa, que de 1 a 20 restos de fármacos se unen a una unidad de ligando (p = 1-20).



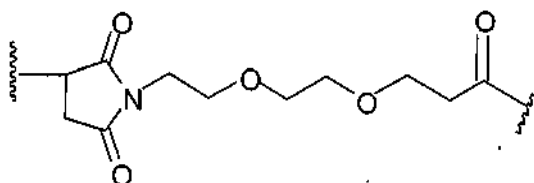
Una unidad ensanchadora ilustrativa es la de la Fórmula IIIa en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅-:



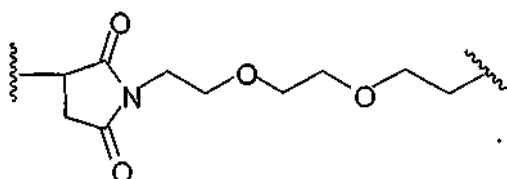
Otra unidad ensanchadora ilustrativa es la de la Fórmula IIIa en la que R¹⁷ es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es 2:



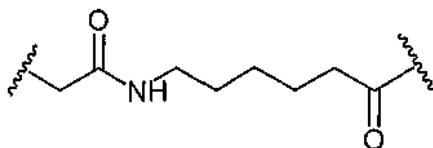
Otra unidad ensanchadora ilustrativa es la de la Fórmula IIIa en la que R¹⁷ es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-CH₂-; y r es 2:



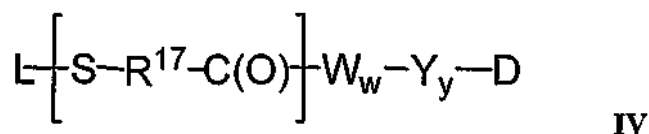
Otra unidad ensanchadora ilustrativa es la de la Fórmula IIIa en la que R¹⁷ es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-CH₂-; y r es 2:



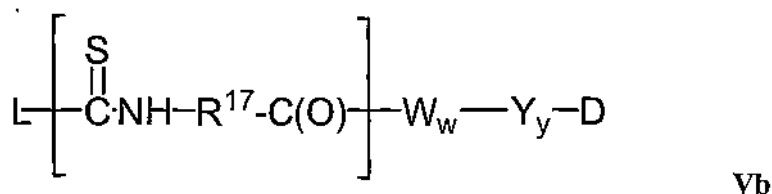
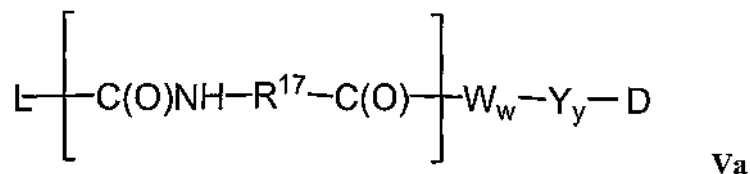
Otra unidad ensanchadora adicional en la de la Fórmula IIIb en la que R¹⁷ es -(CH₂)₅-:



En otra realización, La unidad ensanchadora está unida al ligando mediante un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de ligando y un átomo de azufre de la unidad ensanchadora. Una unidad ensanchadora representativa de esta realización se representa entre los corchetes de la Fórmula IV, en la que R_{17} , L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se ha definido anteriormente.



En otra realización más, el grupo reactivo de la unidad ensanchadora contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario de un ligando. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, aunque no de forma limitativa, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades ensanchadoras representativas de esta realización se representan gráficamente entre los corchetes de las fórmulas Va y Vb, en la que $-R_{17}$ -, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se ha definido anteriormente;



En algunas realizaciones, el grupo reactivo del ensanchador contiene un sitio reactivo que es reactivo con un grupo de hidratos de carbono modificado (-CHO) que puede estar presente en un ligando. Por ejemplo, un hidrato de carbono se puede oxidar suavemente utilizando un reactivo como peryodato de sodio y la unidad (-CHO) resultante del hidrato de carbono oxidado se puede condensar con una unidad ensanchadora de forma que contenga una funcionalidad como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina, y una arilhidrazida tal como las descritas por Kaneko *et al.*, 1991, Bioconjugate Chem. 2:133 41. de acuerdo con otro ejemplo, se puede preparar un hidrato de carbono modificado mediante aminación reductora. Las unidades ensanchadoras representativas de la presente realización se representan entre los corchetes de las Fórmulas VIa, VIb, y VIc, en la que $-R_{17}$ -, L-, -W-, -Y-, -D, w e y son tal como se ha definido anteriormente.



La unidad separadora

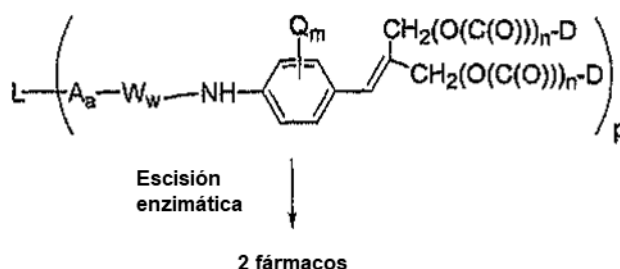
5 La unidad separadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad de glucurónido al resto del fármaco. En algunas realizaciones, la(s) unidad(es) separadora(s) es un separador autoinmolable. En este contexto, la expresión "separador autoinmolable" se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de unir covalentemente de forma conjunta dos restos químicos separados en una molécula tripartita normalmente estable. Esta se separará espontáneamente del segundo resto químico si su unión al primer resto se escinde.

10 En algunas realizaciones, -Y- está unido a -Ww- mediante el átomo de carbono del metileno del grupo autoinmoleable, y se une vinculado directamente a D mediante un grupo carbonato, carbamato o éter. Sin pretender quedar vinculado a teoría o mecanismo alguno, El Esquema 1 representa un mecanismo de liberación del fármaco de un enlazador basado en glucurónido que está unido directamente a D mediante un grupo carbonato.

En algunas realizaciones, -Yy- es una unidad de alcohol p-aminobencílico (véanse, por ejemplo, los Esquemas 1 y 2, posteriormente) cuya parte de fenileno está sustituida con Qm en el que Q es alquilo C1-C8, -O-(alquilo C1-C8), halógeno, nitro o ciano; y m es un número entero que varía entre 0-4. En otra realización, -Yy- puede ser un grupo carbonato.

Otros ejemplos de separadores autoinmolables incluyen, aunque no de forma limitativa, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase por ejemplo, Hay *et al.*, 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. pueden usarse separadores que se someten a ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (véase, por ejemplo, Rodrigues *et al.*, 1995, Chemistry Biology 2:223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] (véase, por ejemplo, Storm *et al.*, 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas del ácido 2-aminodfenilpropiónico (véase, por ejemplo, Amsberry *et al.*, 1990, J. Org. Chem. 55:5867). Eliminación de fármacos que contienen aminas que están sustituidos en la posición α de la glicina (véase, por ejemplo, Kingsbury *et al.*, 1984, J. Med. Chem. 27:1447) son también ejemplos de separadores autoinmolables.

En una realización, la unidad separadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno ramificada (BHMS) como se representa en el siguiente Esquema, que se puede usar para incorporar y liberar múltiples fármacos.



en la que Q es alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, nitro o ciano; m es un número entero que varía entre 0-4; n es 0 o 1; y p varía entre 1 y 20. En una realización, los restos D son iguales. En otra realización más, los restos D son diferentes.

- 5 Se divulgan otras unidades separadoras adecuadas en la patente de Estados Unidos publicada 7.498.298.

La unidad de ligando

- 10 Una unidad de ligando incluye en su alcance cualquier molécula que se une o se asocia reactivamente o compleja con un receptor, antígeno u otro resto receptor asociado con una célula o población de células diana dada. En un aspecto, la unidad de ligando actúa para administrar una unidad de fármaco (posteriormente) a la célula o población de células diana concreta con la cual reacciona la unidad de ligando. Dichas unidades de ligando incluyen, aunque no de forma limitativa, proteínas de peso molecular grande tales como, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, proteínas, polipéptidos o péptidos de pequeño peso molecular, lectinas, glucoproteínas, no péptidos, vitaminas, moléculas vehículos de nutrientes, y cualquier otra molécula o sustancia de unión a célula.

- 15 Las proteínas, polipéptidos, o ligandos peptídicos no inmunorreactivos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformantes ("TGF"), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), insulina y factores de crecimiento I y II de tipo insulina, lectinas, somatostatinas y apoproteínas procedentes de una lipoproteína de baja densidad.

- 20 Los anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos, tales como aquellas derivadas de los sueros de animales inmunizados. Para la producción de anticuerpos policlonales contra un antígeno de interés pueden utilizarse diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar diversos hospedadores animales mediante inyección con un antígeno de interés o uno de sus derivados, incluyendo, aunque no de forma limitativa, conejos, ratones, ratas, y cobayas. Se pueden utilizar diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, e incluyen, aunque no de forma limitativa adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y corynebacterium parvum. Son bien conocidos también en la materia dichos adyuvantes.

- 25 Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un determinante antigénico concreto (por ejemplo, un antígeno celular (tal como un antígeno de células cancerosas o autoinmunitarias), un antígeno vírico, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un compuesto químico, un ácido nucleico o sus fragmentos de unión a antígeno). Se puede preparar un anticuerpo monoclonal (mAb) de un antígeno de interés utilizando cualquier técnica conocida en la materia. Estas incluyen, aunque no de forma limitativa, la técnica del hibridoma originalmente descrita por Köhler y Milstein (1975, Nature 256, 495-497), la técnica del hibridoma los linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today 4:72), y la técnica del hibridoma del VEB (Cole *et al.*, 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, e IgD y cualquiera de sus subclases. El hibridoma que produce los mAb de uso en la presente divulgación puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*.

- 30 Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos y fragmentos de anticuerpos funcionalmente activo. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos mediante cualquiera de numerosas técnicas conocidas en la materia (véanse, por ejemplo, Teng *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 80:7308-7312; Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today 4:72-79; Olsson *et al.*, 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16; y las patentes de Estados Unidos números 5.939.598 y 5.770.429.

- 35 Además, los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que pueden fabricarse utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, son anticuerpos útiles. (Véanse, por ejemplo, Cabilly *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Boss *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 4.816.397) Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos procedentes de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR de la especie no humana, y una región marco procedente de una región de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Queen, patente de Estados Unidos n.º 5.585.089) Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la publicación internacional N° WO 87/02671; publicación de patente europea EP 0 184 187; publicación de patente europea EP 0 171 496; publicación de patente europea EP 0 173 494; publicación internacional N° WO 86/01533; Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; publicación de patente europea n.º EP 012 023; Berter *et al.*, 1988, Science 240:1041-1043; Liu *et al.*,

1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura *et al.*, 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood *et al.*, 1985, Nature 314:446-449; Shaw *et al.*, 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214; Patente de Estados Unidos n.º 5.225.539; Jones *et al.*, 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan *et al.*, 1988, Science 239:1534; y Beidler *et al.*, 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Se pueden producir anticuerpos completamente humanos utilizando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar los genes de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar los genes de la cadena pesada y ligera humana. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, *por ejemplo*, todo o parte de un polipéptido de la divulgación. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno utilizando la tecnología del hibridoma convencional. Los transgenes de la inmunoglobulina humana hospedados por los ratones transgénicos se redisponen durante la diferenciación de los linfocitos B y experimentan posteriormente cambio de clase y mutación somática. De esta manera, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase, *por ejemplo*, Lonberg y Huzsar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos (véanse, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; y 5.545.806). Se pueden obtener otros anticuerpos humanos comercialmente de, *por ejemplo*, Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Medarex (Sunnyvale, CA).

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada "selección guiada". En esta solución, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, *por ejemplo*, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Véase, *por ejemplo*, Jespers *et al.*, 1994, Biotechnology 12:899-903). Los anticuerpos humanos pueden producirse también usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo las bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol. 222:581; Quan y Carter, 2002, The rise of monoclonal antibodies as therapeutics, En Anti-IgE and Allergic Disease, Jardieu y Fick Jr., eds., Marcel Dekker, Nueva York, NY, Capítulo 20, págs. 427-469).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es mono-específico. El anticuerpo puede ser también un anticuerpo biespecífico. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión simultánea de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (véase, *por ejemplo*, Millstein *et al.*, 1983, Nature 305:537-539). Debido a la mezcla aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. Se divulgan procedimientos similares en la publicación internacional n.º WO 93/08829 y en Trauneker *et al.*, 1991, EMBO J. 10:3655-3659.

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión normalmente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos una parte de la bisagra, los dominios C_H2 y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ácidos nucleicos con secuencias que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan simultáneamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son de significancia particular.

Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden tener una cadena pesada de la inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación (publicación internacional n.º WO 94/04690).

Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véanse, *por ejemplo*, Suresh *et al.*, 1996, Methods in Enzymology 121:210; Rodrigues *et al.*, 1993, J. Immunology 151:6954-6961; Carter *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:163-167; Carter *et al.*, 1995, J. Hematotherapy 4:463-470; Merchant *et al.*, 1998, Nature Biotechnology 16:677-681. Utilizando dichas técnicas, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos para uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad como se define en el presente documento.

Se describen también anticuerpos bifuncionales en la publicación de patente europea n.º 0 105 360. Como se

divulga en esta referencia, los anticuerpos híbridos o bifuncionales pueden derivarse ya sea biológicamente, *por ejemplo*, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes de reticulación o reactivos formadores de puentes disulfuro, y pueden comprender anticuerpos completos o sus fragmentos. Los métodos para obtener dichos anticuerpos híbridos se divulgan, por ejemplo, en la publicación internacional WO 83/03679, y en la publicación de patente europea n.º 0 217 577.

El anticuerpo puede ser un fragmento, derivado o análogo de un anticuerpo funcionalmente activo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno diana deseado (por ejemplo, un antígeno de células cancerosas, un antígeno vírico, o un antígeno microbiano) u otros anticuerpos unidos a una(s) célula(s) o matriz diana. En este sentido, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de estimular anticuerpos anti-antidiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo del cual se deriva el fragmento, derivado o análogo reconocido. En una realización ilustrativa se puede potenciar la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina mediante la delección de las secuencias marco y de las CDR que están en el extremo C de la secuencia de la CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de las CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de las CDR en los ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la materia (por ejemplo, el ensayo BIAcore) (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, National Institutes of Health, Bethesda, Md; Kabat *et al.*, 1980, *J. Immunology* 125(3):961-969).

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, aunque no de forma limitativa, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab, Fv, anticuerpos monocatenarios (SCA) (por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos. n.º 4.946.778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544-54), scFv, sc-Fv-Fc, FvdsFv, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y cualquier otra molécula que comprende las CDR y que tiene la misma especificidad que el anticuerpo.

En otras realizaciones, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionalmente activos, por ejemplo, en el que el anticuerpo se fusiona mediante un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), en cualquiera del extremo N o el extremo C de una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o de una de sus porciones, normalmente, al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es el anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o su fragmento está unido covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante.

Los anticuerpos pueden incluir también análogos y derivados que son cualesquiera modificados, *por ejemplo*, mediante el enlace covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicho enlace covalente permita al anticuerpo retener su inmunoespecificidad de unión a antígeno. Por ejemplo, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólico en presencia de tunicamicina, o similares. Además, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

En realizaciones específicas, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Véanse, *por ejemplo*, Publicaciones de patentes de Estados Unidos números 2006-0003412 y 2006-0008882. Se preparan variantes de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos introduciendo los cambios de nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de delección, inserción, y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos pueden alterar también los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por barrido de alanina" tal como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science* 244:1081-1085). En este caso, se identificaron un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyeron por un aminoácido neutro o cargado negativamente (de forma típica alanina o polialanina) que influye sobre la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. De esta manera, aunque se predetermine el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita determinarse. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se llevó a cabo el barrido de alanina o la mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de anticuerpos expresadas se seleccionaron para la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en

longitud de uno resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico.

- 5 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de la región marco.
- 10 Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en el mantenimiento (a) de la estructura del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga de hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de la cadena lateral:
- 15
 - (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
 - (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
 - (3) ácidos: asp, glu;
 - (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
 - 20 (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
 - (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

- 25 Un tipo particular de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad utilizando una biblioteca de expresión en fagos. En resumen, algunos sitios de la región hipervariable (por ejemplo, los sitios 6-7) están mutados para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Las variantes de anticuerpos generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto génico III del paquete M13 en cada partícula. Las variantes expresadas en fagos se seleccionan a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). A fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación,
- 30 se puede llevar a cabo la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel
- 35 de variantes se somete a cribado y se pueden seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.
- 40

- Puede ser deseable modificar el anticuerpo con respecto a la función efectora, *por ejemplo*, con el fin de potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas. Véanse, *por ejemplo*,
- 45 Caron *et al.*, 1992, J. Exp Med. 176:1191-1195; y Shopes, 1992, J. Immunol. 148:2918-2922. pueden prepararse también anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada utilizando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, 1993, Cancer Research 53:2560-2565. Como alternativa, puede diseñarse mediante ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc dobles y puede de este modo potenciarse la lisis por el complemento y las capacidades de ADCC. Véanse, *por ejemplo*, Stevenson *et al.*, 1989, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230.
 - 50
 - 55

- Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero de la molécula de IgG *in vivo*.
- 60

- Se pueden glicosilar anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes (véanse, por ejemplo, Jefferis y Lund, 1997, Chem. Immunol. 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas alteran la función de la proteína (véanse, por ejemplo, Boyd *et al.*, 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, Biochem. 29:4175-4180), y la interacción molecular
- 65

entre porciones de la glucoproteína que pueden alterar la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glucoproteína (véanse, por ejemplo, Jefferis y Lund, *anteriormente*; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7:409-416). Los oligosacáridos pueden servir también para dirigir una glucoproteína dada a determinadas moléculas basándose en las estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha notificado que en la IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido se 'voltea' hacia fuera del espacio inter-C_H2 y los restos de N-acetilglucosamina terminales que quedan disponibles para unirse a la proteína de unión a manosa (véase, por ejemplo, Malhotra *et al.*, 1995, Nature Med. 1:237-243). La eliminación por la glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal de murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de los linfocitos humanos) producida en células de ovario de hámster chino (CHO) dio como resultado una reducción completa en la lisis mediada por el complemento (CMCL) (Boyd *et al.*, 1996, Mol. Immunol. 32:1311-1318), mientras que la eliminación selectiva de restos de ácido siálico utilizando neuraminidasa no dio como resultado la pérdida de CMCL. Se ha notificado también que la glicosilación de anticuerpos altera la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, células CHO con tetraciclina regularon la expresión de la $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), se notificó que una glicosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc bisectora, tenía una actividad ADCC mejorada (véase, por ejemplo, Umana *et al.*, 1999, Mature Biotech. 17:176-180).

La glicosilación de anticuerpos es normalmente una unión al átomo de N o una unión al átomo de O. La unión al átomo de N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. De esta manera, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Las variantes de glicosilación de anticuerpos son variantes en las que está alterado el modelo de glicosilación de un anticuerpo. Por alterar se entiende eliminar uno o más de los restos de hidratos de carbono que se encuentran en el anticuerpo, añadiendo uno o más restos de hidratos de carbono al anticuerpo, cambiando la composición de la glicosilación (modelo de glicosilación), la extensión de la glicosilación o similares.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unida al átomo de N). La alteración puede realizarse también mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O). De manera similar, la eliminación de sitios de glicosilación puede llevarse a cabo mediante la alteración de aminoácidos en los sitios de glicosilación naturales del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos se altera usualmente alterando la secuencia de ácido nucleico subyacente. Estos métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), la mutagénesis mediante la PCR, y la mutagénesis de casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del anticuerpo.

La glicosilación (incluyendo el modelo de glicosilación) de los anticuerpos puede alterarse también sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende en gran parte de la célula hospedadora utilizada para expresar el anticuerpo. Debido al tipo de célula utilizado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, *por ejemplo*, anticuerpos, ya que la terapéutica potencial rara vez es la célula nativa, se pueden esperar variaciones significativas en el modelo de glicosilación de los anticuerpos. Véanse, *por ejemplo*, Hse *et al.*, 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070. Además de la selección de las células hospedadoras, los factores que alteran la glicosilación durante la producción de anticuerpos recombinantes incluyen el modo de crecimiento, la formulación de medios, la densidad del cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos métodos para alterar la glicosilación, el modelo conseguido en un organismo hospedador concreto incluye introducir o expresar en exceso determinadas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.047.335; 5.510.261; y 5.278.299). La glicosilación, o determinados tipos de glicosilación, puede ser eliminada de la glicoproteína, utilizando, por ejemplo, la endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula hospedadora recombinante puede diseñarse mediante ingeniería genética, por ejemplo, haciendo defectivo el procesamiento de determinados tipos de polisacáridos. Estas técnicas, y técnicas similares son bien conocidas en la materia.

La estructura de la glicosilación de los anticuerpos puede analizarse fácilmente mediante técnicas convencionales de análisis de hidratos de carbono, incluyendo la cromatografía de lectina, RMN, espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis de composición de monosacáridos, digestión enzimática secuencial, y HPAEC-PAD, que utiliza una cromatografía e intercambio aniónico a pH alto para separar los oligosacáridos basándose en la carga. Se conocen también los métodos para liberar oligosacáridos para fines analíticos, e incluyen, sin limitación, tratamiento enzimático (llevando a cabo comúnmente utilizando la péptido-N-glicosidasa F/endo- β -galactosidasa), eliminación

utilizando un ambiente alcalino severo para liberar principalmente las estructuras unidas a átomo de O, y los métodos químicos utilizando hidrazina anhidra para liberar los oligosacáridos unidos a átomos de N y a átomos de O.

5 Los anticuerpos pueden tener también modificaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con receptores Fc. En particular, los anticuerpos incluyen anticuerpos que tienen modificaciones en restos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio dirigido contra Fc y el receptor de FcRn (véase, por ejemplo, publicación internacional n.º WO 97/34631).

10 Se pueden obtener comercialmente anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de células cancerosas, por ejemplo, de compañías comerciales o producido mediante cualquier método conocido por un experto en la materia, tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. Pueden obtenerse anticuerpos inmuno-específicos que codifican la secuencia de nucleótidos de un antígeno de célula cancerosa, por ejemplo, de la base de datos GenBank database o de una base de datos del tipo de ésta, publicaciones de bibliografía, o por
15 clonación y secuenciación rutinarias.

En una realización específica, se pueden usar anticuerpos conocidos para el tratamiento o la prevención del cáncer. Se pueden obtener anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de célula cancerosa comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, técnicas de
20 expresión recombinante. Pueden obtenerse anticuerpos inmuno-específicos que codifican la secuencia de nucleótidos de un antígeno de célula cancerosa, por ejemplo, de la base de datos GenBank database o de una base de datos del tipo de ésta, publicaciones de bibliografía, o por clonación y secuenciación rutinarias.

Virtualmente, cualquier proteína diana puede ser el objetivo de un anticuerpo, incluyendo cualquier proteína diana
25 cuya expresión esté correlacionada con la expresión sobre células de un cáncer, trastorno proliferativo de células o tumor. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno asociado a tumor, tal como un polipéptido, proteína u otra molécula que se exprese específicamente sobre la superficie de uno o más tipo(s) particulares de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos antígenos asociados a tumores se expresan más abundantemente sobre la superficie de células cancerosas en comparación
30 sobre la superficie de células no cancerosas. La identificación de dichos antígenos superficiales celulares asociados a tumores ha proporcionado una sensibilización a la capacidad de hacer diana de manera específica en las células cancerosas para los tratamientos basados en anticuerpos mediante la destrucción.

Las proteínas diana adecuadas incluyen antígenos tumorales humanos reconocidos por los linfocitos T (Robbins y
35 Kawakami, 1996, Curr Opin. Immunol. 8:628-636), proteínas de linajes de melanocitos, incluyendo gp100, MART-1/MelanA, TRP-1 (gp75), tirosinasa; Antígenos ampliamente compartidos de tumores específicos, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-1, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p15; Antígenos mutados específicos de tumores, beta-catenina, MUM-1, CDK4; Antígenos no de melanoma para carcinoma de mama, ovario, cuello de útero y páncreas, HER-2/neu, virus del papiloma humano-E6, E7, MUC-1; antígenos de cáncer, tales como antígenos de pan-carcinoma KS 1/4 (Perez y Walker, 1990, J. Immunol. 142:3662-3667; Bumal, 1988, Hybridoma 7(4):407-415);
40 antígeno de carcinoma de ovario (CA125) (Yu *et al.*, 1991, Cancer Res. 51(2):468-475); fosfato ácido prostático (Tailor *et al.*, 1990, Nucl. Acids Res. 18(16):4928); antígeno específico de próstata (Henttu y Vihko, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160(2):903-910; Israeli *et al.*, 1993, Cancer Res. 53:227-230); antígeno p97 asociado a melanoma (Estin *et al.*, 1989, J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-446); antígeno gp75 de melanoma (Vijayasardahl *et al.*, 1990, J. Exp. Med. 171(4):1375-1380); antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al.*, 1987, Cancer 59:55-63; Mittelman *et al.*, 1990, J. Clin. Invest. 86:2136-2144); antígeno de membrana específico de próstata; antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al.*, 1994, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 13:294); antígeno de mucina epitelial polimórfico; antígeno de glóbulos grasos de leche humana; un antígeno asociado a tumor colorrectal, tal como CEA, TAG-72 (Yokata *et al.*, 1992, Cancer Res. 52:3402-3408), CO 17-1A (Ragnhammar *et al.*,
50 1993, Int. J. Cancer 53:751-758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.*, 1982, J. Clin. Immunol. 2:135), CTA-1 y LEA; antígeno de linfoma de Burkitt-38.13; CD19 (Ghetie *et al.*, 1994, Blood 83:1329-1336); antígeno de linfoma de linfocitos B humanos-CD20 (Reff *et al.*, 1994, Blood 83:435-445); CD33 (Sgouros *et al.*, 1993, J. Nucl. Med. 34:422-430); antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2 (Saleh *et al.*, 1993, J. Immunol. 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara *et al.*, 1993, Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380), gangliósido GM2 (Livingston *et al.*, 1994, J. Clin. Oncol. 12:1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon *et al.*, 1993, Cancer Res. 53:5244-5250); antígeno superficial celular de tipo trasplante específico de tumor (TSTA) tal como antígenos tumorales inducidos víricamente incluyendo virus de tumores de ADN de antígeno T y antígenos de envolturas de virus de tumores de ARN; alfa-fetoproteína de antígeno oncofetal tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom *et al.*,
60 1985, Cancer. Res. 45:2210-2188); antígeno de diferenciación tal como antígeno L6 de carcinoma de pulmón humano, L20 (Hellstrom *et al.*, 1986, Cancer Res. 46:3917-3923); antígenos de fibrosarcoma, antígeno Gp37 de linfocitos T de leucemia humana (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 1988, J. Immunol. 141:1398-1403); neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185HER2), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens *et al.*, 1992, Trends in Bio. Chem. Sci. 17:359); antígeno APO-1 de linfocitos humanos malignos (Bemhard *et al.*, 1989, Science 245:301-304);
65 antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, Nature 314:53-57) tal como el antígeno I encontrado en eritrocitos fetales, antígeno I de endodermo primario encontrado en eritrocitos adultos y embriones previos al implante, I(Ma)

encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18, M39 encontrado en epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D156-22 encontrado en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma colónico, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Ley encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E1 (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer de páncreas, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Lea) encontrado en Adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Leb), G49 encontrado en el receptor de EGF de células A431, MH2 (grupo sanguíneo ALeb/Ley) encontrado en adenocarcinoma colónico, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T5A7 encontrado en células mieloides, R24 encontrado en melanoma, 4,2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, y M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario, y SSEA-3 y SSEA-4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es útil para el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, aunque no de forma limitativa RITUXAN® (rituximab; Genentech) que es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra CD20 para el tratamiento de pacientes con linfoma no de Hodgkin; OVAREX (AltaRex Corporation, MA) que es un anticuerpo de murino para el tratamiento del cáncer de ovario; PANOREX (Glaxo Wellcome, NC) que es un anticuerpo IgG_{2a} de murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; CETUXIMAB ERBITUX (Imclone Systems Inc., NY) que es un anticuerpo quimérico dirigido contra EGFR IgG para el tratamiento de cánceres positivos para el factor de crecimiento epidérmico, tales como cáncer de cabeza y cuello; VITAXIN (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; CAMPATH I/H (Leukosite, MA) que es un anticuerpo IgG₁ humanizado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC); SMART M195 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo IgG humanizado dirigido contra CD33 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA); LYMPHOCIDE (Immunomedics, Inc., NJ) que es un anticuerpo IgG humanizado dirigido contra CD22 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; SMART ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra HLA-DR para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; Oncolym (Techniclone, Inc., CA) que es un anticuerpo de murino radiomarcado dirigido contra HLA-Dr10 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; ALLOMUNE (BioTransplant, CA) que es un mAb humanizado dirigido contra CD2 para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o del linfoma no de Hodgkin; AVASTIN (Genentech, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra VEGF para el tratamiento de los cánceres de pulmón y colorrectal; Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA) que es un anticuerpo dirigido contra CD22 para el tratamiento del linfoma no de Hodgkin; y CEAcide (Immunomedics, NJ) que es un anticuerpo humanizado dirigido contra CEA para el tratamiento del cáncer colorrectal.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo contra los siguientes antígenos (donde los cánceres ilustrativos se indican en paréntesis): CA125 (ovario), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), alfa fetoproteína (carcinomas), CA 242 (colorrectal), fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), antígeno de membrana específico de próstata (próstata), EphB2, TMEFF2, fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de crecimiento epidérmico (carcinomas), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), receptor anti-transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1-KLH (cáncer de mama), CEA (colorrectal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), antígeno específico de próstata (próstata), receptor de IL-2 (leucemia de linfocitos T y linfomas), CD20 (linfoma no de Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), gonadotropina coriónica humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma), y el producto del oncogeno Neu (carcinomas). Algunos anticuerpos específicos útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, mAb BR96 (Trail *et al.*, 1993, Science 261:212-215), BR64 (Trail *et al.*, 1997, Cancer Research 57:100-105), mAb contra el antígeno CD40, tales como el mAb S2C6 (Francisco *et al.*, 2000, Cancer Res. 60:3225-3231) u otros anticuerpos dirigidos contra CD40, tales como los divulgados en las publicaciones de patente de Estados Unidos números 2003-0211100 y 2002-0142358; mAb contra el antígeno CD70, tales como el mAb 1F6 y el mAb 2F2, y los mAb contra el antígeno CD30, tal como AC10 (Bowen *et al.*, 1993, J. Immunol. 151:5896-5906; Wahl *et al.*, 2002, Cancer Res. 62(13):3736-42) o MDX-0060 (publicación de patente de Estados Unidos n.º 2004-0006215). Se pueden usar otros anticuerpos internalizantes que se unen a antígenos asociados a tumores y se han revisado (Franke *et al.*, 2000, Cancer Biother. Radiopharm. 15:459 76; Murray, 2000, Semin. Oncol. 27:64 70; Breitling, F. y Dubel, S., Recombinant Antibodies, John Wiley, and Sons, Nueva York, 1998).

En otra realización, se usan anticuerpos conocidos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmunitaria. Se pueden obtener anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de una célula que es responsable de producir anticuerpos autoinmunitarios de cualquier organización (por ejemplo, un científico de una universidad o una compañía) o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, síntesis química o técnicas de expresión recombinante.

Los anticuerpos útiles que son inmuno-específicos para el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpo antinuclear; anticuerpo dirigido contra el ADNds; anticuerpo dirigido contra el ADNss; IgM de anticuerpo dirigido contra cardiolipina, IgG; IgM de anticuerpo dirigido contra fosfolípido, IgG; anticuerpo dirigido contra SM; anticuerpo dirigido contra mitocondrias; anticuerpo dirigido contra el tiroides; anticuerpo antimicrosomal; anticuerpo dirigido contra la tiroglobulina; anticuerpo dirigido contra SCL-70; anticuerpo dirigido contra Jo; anticuerpo dirigido contra U₁RNP; anticuerpo dirigido contra La/SSB; anticuerpo

dirigido contra SSA; anticuerpo dirigido contra SSB; anticuerpo dirigido contra células peritales; anticuerpo dirigido contra histonas; anticuerpo dirigido contra RNP; anticuerpo dirigido contra C-ANCA; anticuerpo dirigido contra P-ANCA; anticuerpo dirigido contra centrómero; anticuerpo antifibrilarina y anticuerpo dirigido contra GBM.

- 5 En determinadas realizaciones, los anticuerpos útiles pueden unirse a un receptor o un complejo receptor expresado en una célula diana. El receptor o el complejo receptor puede comprender un miembro de la superfamilia de los genes de las inmunoglobulinas, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de la citoquina, un receptor de la quimioquina, una proteína de histocompatibilidad mayor, una lectina, o una proteína control del complemento. Los ejemplos no limitantes de miembros adecuados de la superfamilia de las
- 10 inmunoglobulinas son CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1, e ICOS. Los ejemplos no limitantes de miembros adecuados de la superfamilia de receptores de TNF son CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, y APO-3. Los ejemplos no limitantes de integrinas adecuadas son CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103, y CD104. Los ejemplos no
- 15 limitantes de lectinas adecuadas son las lectinas del tipo C, lectina de tipo S, y lectina de tipo I.

En una realización, el ligando se une a un linfocito activado que se asocia con una enfermedad autoinmunitaria.

- 20 En otra realización, los ligandos inmuno-específicos útiles para un antígeno vírico o microbiano son anticuerpos monoclonales. Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno vírico" incluye, aunque no de forma limitativa, cualquier péptido vírico, proteína polipeptídica (por ejemplo, gp120 del VIH, VIH nef, glicoproteína F del VSR, neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, HTLV tax, glicoproteína del virus del herpes simple (por ejemplo, gB, gC, gD y gE) y el antígeno superficial de la hepatitis B) que es capaz de estimular una respuesta inmunitaria. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno microbiano" incluye,
- 25 aunque no de forma limitativa, cualquier péptido microbiano, polipéptido, proteína, sacárido, polisacárido, o molécula de lípido (por ejemplo, un polipéptido bacteriano, de hongos, protozoo patógeno o polipéptido de levadura incluyendo, *por ejemplo*, LPS y un polisacárido capsular 5/8) que es capaz de estimular una respuesta inmune.

- 30 Se pueden obtener anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno vírico o microbiano comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, *por ejemplo*, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. Se puede obtener la secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos que son inmuno-específicos de un antígeno vírico o microbiano, por ejemplo, de la base de datos GenBank database o de una base de datos del tipo de ésta, publicaciones de bibliografía, o por clonación y secuenciación rutinarias.

- 35 En una realización, los ligandos útiles son aquellos que son útiles para el tratamiento de una infección vírica o microbiana de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento. Los ejemplos de anticuerpos útiles para el tratamiento de una infección vírica o una infección microbiana incluyen, aunque no de forma limitativa, SYNAGIS (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el virus sincitial respiratorio (VSR) para el tratamiento de pacientes con infección por VSR; PRO542 (Progenics) que es un anticuerpo de fusión con CD4 útil para el tratamiento de la infección por VIH; OSTAVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo humano útil para el tratamiento del virus de la hepatitis B; PROTOVIR (Protein Design Labs, Inc., CA) que es un anticuerpo de IgG₁ humanizado útil para el tratamiento del citomegalovirus (CMV); y anticuerpos dirigidos contra LPS.
- 40

- 45 Otros anticuerpos útiles en el tratamiento de las enfermedades infecciosas incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos útiles contra los antígenos de cepas de bacterias patógenas (por ejemplo, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenas*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateneum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi*, y *Chlamydia spp.*); hongos patógenos (por ejemplo, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*); protozoos
- 50 (*Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, o *Plasmodium Malaria*); o Helmintos (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichinella spiralis*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, y anquilostomas).
- 55
- 60

- Otros anticuerpos útiles para el tratamiento de las enfermedades víricas incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos contra antígenos de virus patógenos, tales como por ejemplo: Poxviridae, Herpesviridae, Virus del Herpes Simple 1, Virus del Herpes Simple 2, Adenoviridae, Papovaviridae, Enteroviridae, Picornaviridae,
- 65

Parvoviridae, Reoviridae, Retroviridae, los virus de la gripe, los virus de la paragripe, paperas, sarampión, virus sincitial respiratorio, rubeola, Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis E, virus de la hepatitis no A/no B, Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae, y el virus de la inmunodeficiencia humana.

5

La unidad de fármaco

La unidad de fármaco puede ser cualquier fármaco citotóxico, citostático o inmunomodulador. D es una unidad de fármaco (resto) que tiene un átomo que puede formar un enlace con la unidad separadora cuando $y=1$ o 2 o con el resto de glucurónido cuando $y=0$. En algunas realizaciones, la unidad de fármaco D tiene un átomo de nitrógeno que puede formar un enlace con la unidad separadora. Tal como se usa en el presente documento, Las expresiones "unidad de fármaco" y "resto de fármaco" son sinónimas y se usan de forma indistinta.

10

Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, aglutinantes de la ranura menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, inhibidores de calmodulina, sensibilizantes de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, maitansinoides, nitrosoureas, platinos, compuestos formadores de poros, antimetabolitos de purina, puomicinas, sensibilizantes de la radiación, rapamicinas, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca, o similares.

15

20

Los agentes citotóxicos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramycin (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, caliqueamicina, derivados de caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citosina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorrubicina, dacarbazina, DM1, DM4, docetaxel, doxorubicina, etopósido, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, gramicidina D, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), maitansina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, palitoxina, plicamicina, procarbazona, rizoxina, estreptozotocina, tenipósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

25

30

En algunas realizaciones típicas, los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, aglutinantes de la ranura menor del ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas, un compuesto CBI; véase también la Patente de Estados Unidos n.º 6.130.237), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puomicinas, alcaloides de vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptoficinas, cemadotina, maitansinoides, discodermólido, eleuterobina, y mitoxantrona.

35

En algunas realizaciones, el fármaco es un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, aunque no de forma limitativa, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik) y alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de la bacatina, análogos de taxano, epotilones (por ejemplo, epotilones A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptoficinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermólido y eleuterobina.

40

En determinadas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide puede ser maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari *et al.*, 1992, Cancer Res. 52:127-131).

45

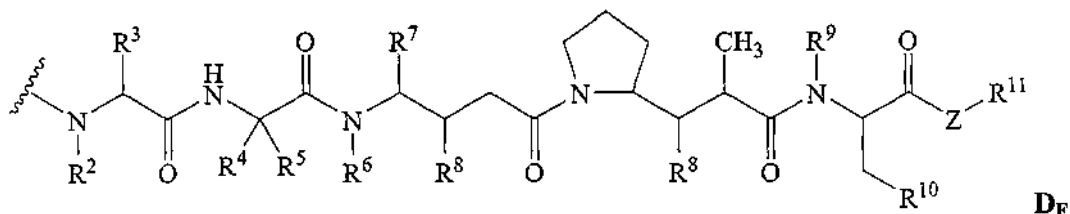
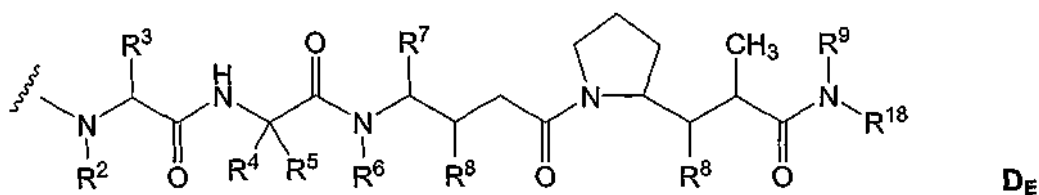
En algunas realizaciones, el fármaco es una auristatina, tal como auristatina E o uno de sus derivados. Por ejemplo, el derivado de auristatina E puede ser un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar auristatina E con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados de auristatina típicos incluyen AFP, MMAF, y MMAE. La síntesis y estructura de los derivados de auristatina se describen en las publicaciones de solicitudes de patentes de Estados Unidos números 2003-0083263, 2005-0238649 y 2005-0009751; la publicación de patente internacional n.º WO 04/010957, la publicación de patente internacional n.º WO 02/088172, y las patentes de Estados Unidos números 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

50

55

En algunas realizaciones, D es cualquier fórmula D_E o D_F :

60



5 en la que, independientemente en cada localización:

- R^2 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;
 R^3 se selecciona entre H, alquilo $-C_1-C_8$, carbociclo C_3-C_8 , arilo, X^1 -arilo, X^1 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo- C_3-C_8 y X^1 - (heterociclo C_3-C_8);
 10 R^4 se selecciona entre H, alquilo $-C_1-C_8$, carbociclo C_3-C_8 , arilo, X^1 -arilo, X^1 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo- C_3-C_8 y X^1 - (heterociclo C_3-C_8);
 R^5 se selecciona entre H y metilo;
 o R^4 y R^5 forman conjuntamente un anillo carbocíclico que tiene la fórmula $(CR^aR^b)_n$, en el que R^a and R^b se seleccionan de forma independiente de H, alquilo C_1-C_8 y carbociclo C_3-C_8 y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6;
 15 R^6 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;
 R^7 se selecciona entre H, alquilo $-C_1-C_8$, carbociclo C_3-C_8 , arilo, X^1 -arilo, X^1 -(carbociclo C_3-C_8), heterociclo- C_3-C_8 y X^1 -(heterociclo C_3-C_8);
 cada R^8 se selecciona de forma independiente entre H, OH, alquilo $-C_1-C_8$, carbociclo C_3-C_8 y $-O$ -(alquilo C_1-C_8);
 R^9 se selecciona entre H y alquilo C_1-C_8 ;
 20 R^{10} se selecciona entre arilo y heterociclo C_3-C_8 ;
 Z es O, S, NH, o NR^{12} , en la que R^{12} es alquilo C_1-C_8 ;
 R^{11} se selecciona entre H, alquilo $-C_1-C_{20}$, arilo, heterociclo C_3-C_8 , $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, y $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;
 m es un número entero que varía entre 1-1000;
 en el que R^{13} es alquilo C_2-C_8 ;
 R^{14} es H o -alquilo (C_1-C_8);
 25 cada incidencia de R^{15} es, de forma independiente, H, $COOH$, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, o $-(CH_2)_n-SO_3$ -alquilo C_1-C_8 ;
 cada incidencia de R^{16} es, de forma independiente, H, alquilo C_1-C_8 , o $-(CH_2)_n-COOH$;
 R^{18} se selecciona entre $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -arilo, $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(heterociclo C_3-C_8), y $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(carbociclo C_3-C_8);
 30 X^1 es alquileno C_1-C_{10} ; y
 n es un número entero comprendido entre 0 y 6.

35 En una realización, R^3 , R^4 y R^7 son, de forma independiente, isopropilo o sec-butilo y R^5 es H. En una realización ilustrativa, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es H, y R^7 es sec-butilo.

En otra realización, R^2 y R^6 son cada uno metilo, y R^9 es H.

40 En otra realización adicional, cada incidencia de R^8 es $-OCR_3$.

En una realización ilustrativa, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es H, R^7 es sec-butilo, cada incidencia de R^8 es $-OCH_3$, y R^9 es H.

45 En una realización, Z es $-O-$ o $-NH-$.

En una realización, R^{10} es arilo.

En una realización ilustrativa, R^{10} es fenilo.

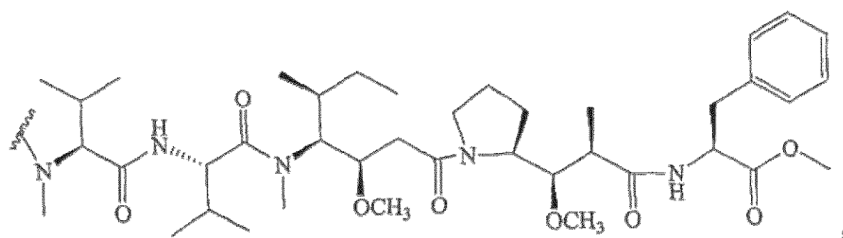
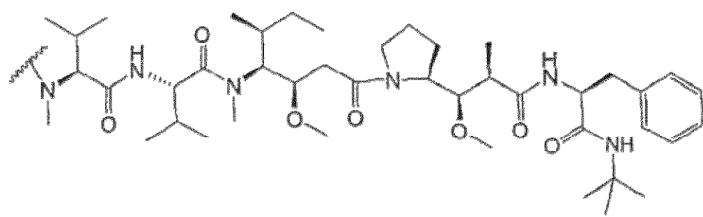
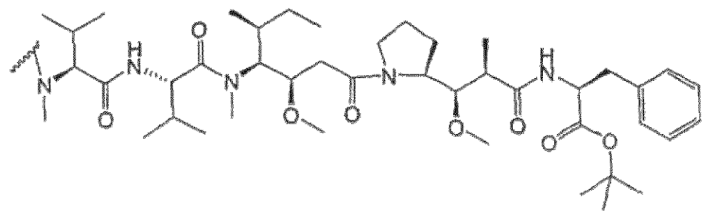
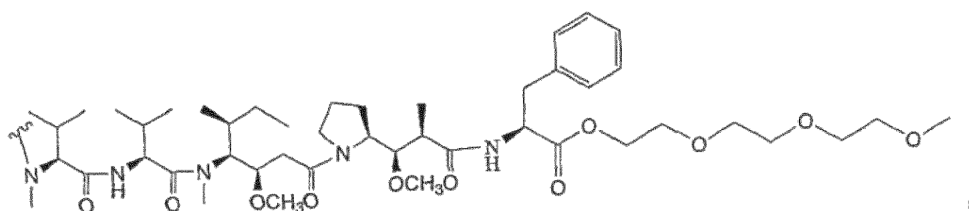
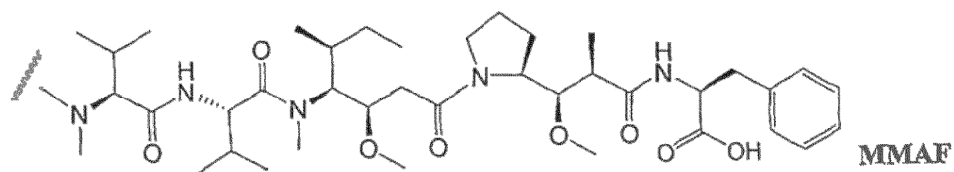
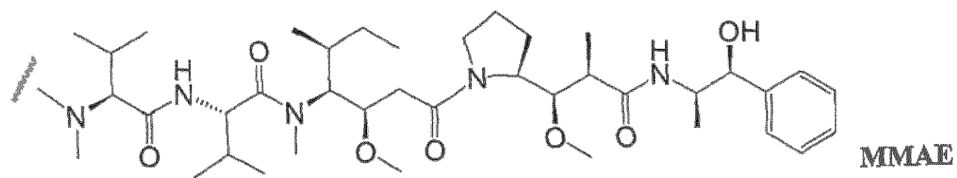
50 En una realización ilustrativa, cuando Z es $-O-$, R^{11} es H, metilo o t-butilo.

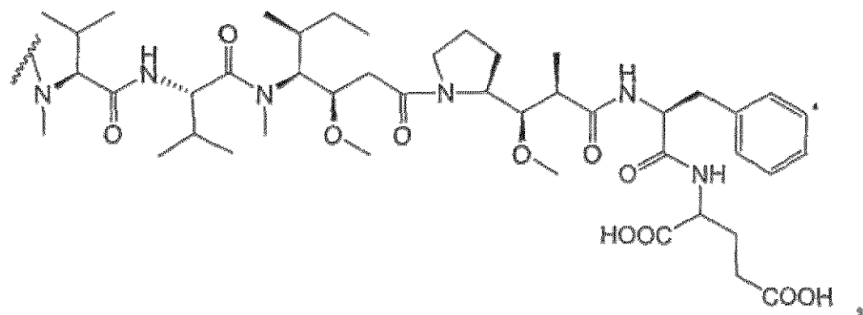
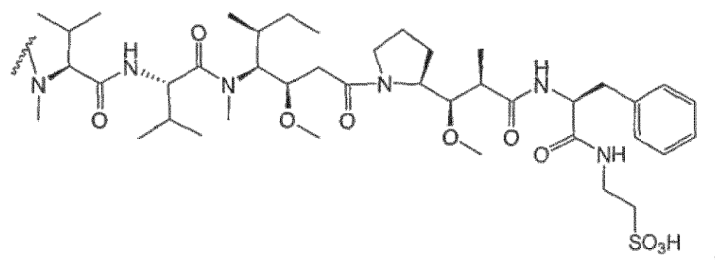
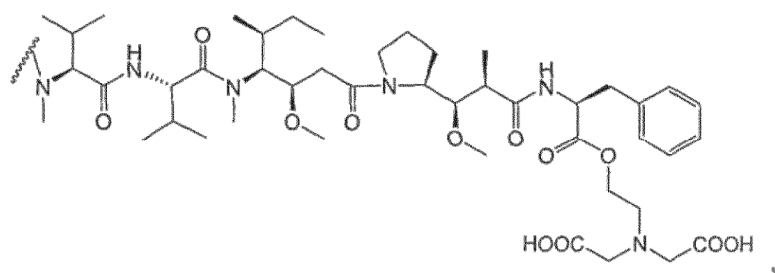
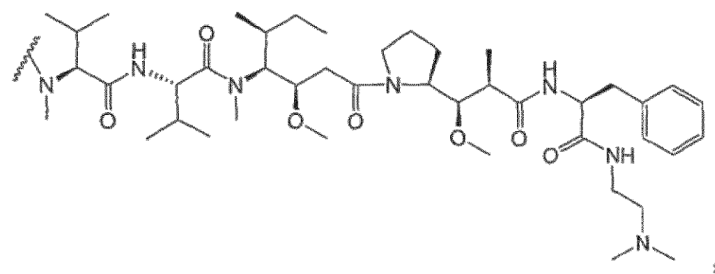
En una realización, cuando Z es $-NH$, R^{11} es $-CH(R^{15})_2$, en el que R^{15} es $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, y R^{16} es -alquilo C_1-C_8 o -

$(\text{CH}_2)_n\text{-COOH}$.

En otra realización, cuando Z es -NH, R^{11} es $-\text{CH}(\text{R}^{15})_2$, en el que R^{15} es $-(\text{CH}_2)_n\text{-SO}_3\text{H}$.

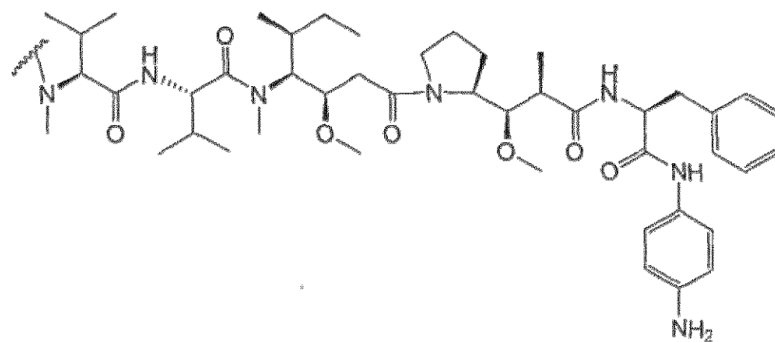
- 5 Las unidades de fármaco ilustrativas (-D) incluyen las unidades de fármaco que tienen las siguientes estructuras:





y

5

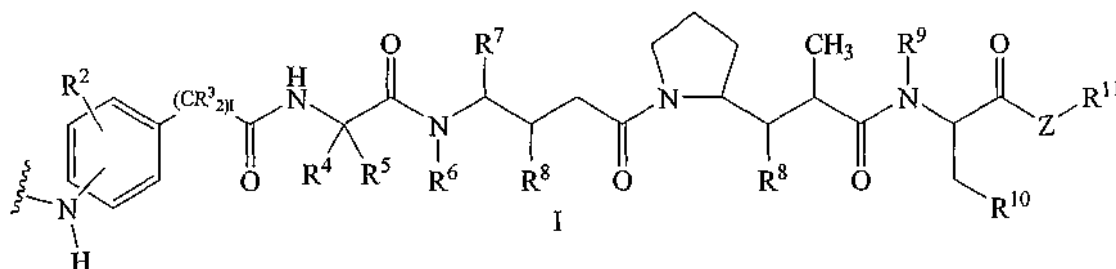


y una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

10 En un aspecto, los grupos hidrófilos, tales como, aunque no de forma limitativa, los ésteres de trietilenglicol (TEG),

como se muestra anteriormente, pueden unirse a la unidad de fármaco en R¹¹. Sin pretender quedar vinculado a teoría alguna, los grupos hidrófilos ayudan a la internalización y a la no aglomeración de la unidad de fármaco.

En otro aspecto, la unidad de fármaco es un derivado de ácido aminobenzoico de una auristatina de la siguiente fórmula:



en la que, independientemente en cada localización:

R² se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -halógeno, -NO₂, -COOH, y -C(O)OR¹¹; cada R³ se selecciona de forma independiente entre hidrógeno y alquilo-C₁-C₈;

I es un número entero que varía entre 0-10;

R⁴ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, -arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y X¹-(heterociclo C₃-C₈), y R⁵ se selecciona entre H y metilo; o R⁴ y R⁵ tienen conjuntamente la fórmula -(CR^aR^b)_n-, en la que cada R^a y R^b se seleccionan de forma independiente entre H, alquilo C₁-C₈ y -carbociclo C₃-C₈ y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de carbono al cual se unen;

R⁶ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R⁷ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y X¹-(heterociclo C₃-C₈);

cada R₈ se selecciona de forma independiente entre H, -OH, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, -O-alquil-(carbociclo C₁-C₈) y -O-(alquilo C₁-C₈);

R⁹ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

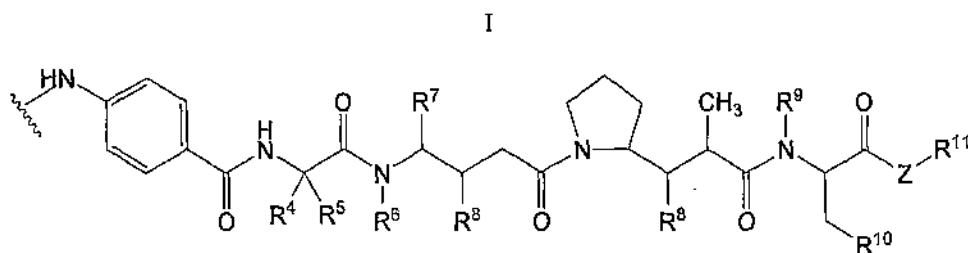
R¹⁰ se selecciona entre arilo y heterociclo-C₃-C₈;

Z es -O-, -S-, -NH-, o -NR¹²-, cuando R¹² es alquilo C₁-C₈ o arilo;

R¹¹ se selecciona entre H, alquilo -C₁-C₈, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(CH₂CH₂O)_r-H, -(CH₂CH₂O)_r-CH₃, y -(CH₂CH₂O)_rCH₂CH₂C(O)OH; en el que r es un número entero entre 1-10; y

X¹ es alquilenos C₁-C₁₀.

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco tiene la siguiente fórmula:



en la que, independientemente en cada localización:

R⁴ se selecciona entre hidrógeno, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, -arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo C₃-C₈ y X¹-(heterociclo C₃-C₈), y R⁵ se selecciona entre H y metilo; o R⁴ y R⁵ tienen conjuntamente la fórmula -(CR^aR^b)_n-, en la que cada R^a y R^b se seleccionan de forma independiente entre H, alquilo C₁-C₈ y -carbociclo C₃-C₈ y n se selecciona entre 2, 3, 4, 5 y 6, y forman un anillo con el átomo de carbono al cual se unen;

R⁶ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R⁷ se selecciona entre H, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y X¹-(heterociclo C₃-C₈);

cada R₈ se selecciona de forma independiente entre H, -OH, alquilo C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, -O-alquil-(carbociclo C₁-C₈) y -O-(alquilo C₁-C₈);

R⁹ se selecciona entre H y alquilo C₁-C₈;

R¹⁰ se selecciona entre arilo y heterociclo-C₃-C₈;

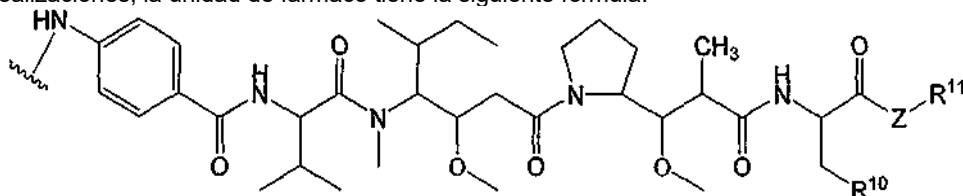
Z es -O-, -S-, -NH-, o -NR¹²- cuando R¹² es alquilo C₁-C₈ o arilo;

R¹¹ se selecciona entre H, alquilo -C₁-C₈, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(CH₂CH₂O)_r-H, -(CH₂CH₂O)_r-CH₃, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂CH₂C(O)OH; en el que r es un número entero entre 1-10; y

X¹ es alquileo C₁-C₁₀.

5

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco tiene la siguiente fórmula:



en la que, independientemente en cada localización:

10

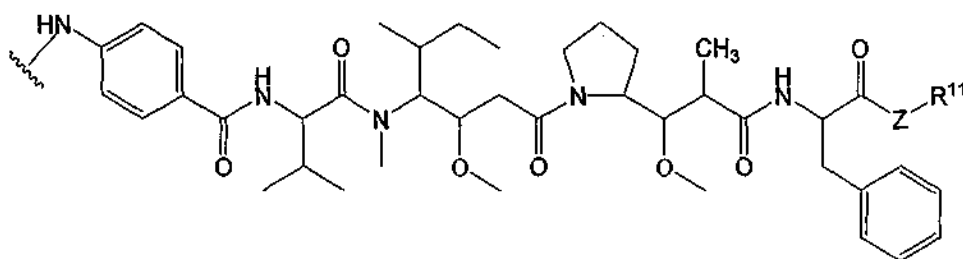
R¹⁰ se selecciona entre grupos arilo y heterociclo-C₃-C₈;

Z es -O-, -S-, -NH-, o -NR¹²- cuando R¹² es alquilo C₁-C₈ o arilo; y

R¹¹ se selecciona entre H, alquilo -C₁-C₈, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(CH₂CH₂O)_r-H, -(CH₂CH₂O)_r-CH₃, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂CH₂C(O)OH; donde r es un número entero que varía entre 1-10.

15

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco tiene la siguiente fórmula:



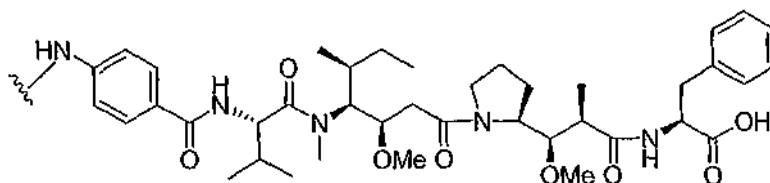
20 en la que:

Z es -O-, -S-, -NH-, o -NR¹²- cuando R¹² es alquilo C₁-C₈ o arilo; y

R¹¹ se selecciona entre H, alquilo -C₁-C₈, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(CH₂CH₂O)_r-H, -(CH₂CH₂O)_r-CH₃, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂CH₂C(O)OH; donde r es un número entero que varía entre 1-10.

25

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco tiene la siguiente fórmula:



30 En algunas realizaciones, la unidad de fármaco no es un radioisótopo. En algunas realizaciones, la unidad de fármaco no es radioactiva.

En algunas realizaciones, la unidad de fármaco es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ejemplo, azatioprina o micofenolato de mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavirina, azidotimidina, arabinósido de citosina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet, o trifluridina.

35

En otras realizaciones, la unidad de fármaco es tacrolimus, ciclosporina, FU506 o rapamicina. En realizaciones adicionales, el fármaco es aldesleuquina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, darbepoetina alfa, denileukin diftotox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, epoetina alfa, estramustina, exemestano, filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina (MYLOTARG), goserelina, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, Interferón alfa-2a, irinotecán, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza de nitrógeno, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina C, mitotano, fenpropionato de nandrolona, oprelvekina, oxaliplatino, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobromano, plicamicina, porfimer sódico, procarbazona, quinacrina, rasburicasa,

45

rituximab, sargramostim, estreptoocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, Tositumomab, trastuzumab (HERCEPTIN), tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina o zoledronato.

5 En algunas realizaciones, el resto de fármaco es un agente inmunomodulador. El agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, gangciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato de mofetilo o metotrexato. Como alternativa, el agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoide (por ejemplo, prednisona o dexametasona).

10 En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es un agente antiinflamatorio, tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contienen pirazol, derivados de oxicam y derivados de ácido nicotínico. Las clases de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, inhibidores de la ciclooxigenasa, inhibidores de la 5-lipoxigenasa, y antagonistas de los receptores del leucotrieno.

15 Los inhibidores de la ciclooxigenasa adecuados incluyen ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenaco, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, indometacina, ketoprofeno, nabumetona, sulindac, tenoxicam y tolmetina.

20 Los inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores rédox (por ejemplo, derivados de catecol butano, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopalen, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina), e inhibidores no de rédox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y sus derivados, metoxitetrahidropirano, ácidos boswélicos y derivados acetilados de ácidos boswélicos, y ácidos quinolinametoifenilacéticos sustituidos con radicales cicloalquilo), y precursores de inhibidores rédox.

25 Otros inhibidores de la lipoxigenasa incluyen antioxidantes (por ejemplo, fenoles, galato de propilo, flavonoides y/o sustratos que contienen flavonoides que se producen naturales, derivados hidroxilados de las flavonas, flavonol, dihidroquercetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de chalcona, 4,2',4'-trihidroxichalcona, ortoaminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranos, ebselen y especies que aumentan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (por ejemplo, ácidos hidroxámicos y sus derivados, N-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zileuton, ácido 5-hidroxiantranílico y ácidos 4-(omega-arilalquil)fenilalcanoicos), compuestos que contienen imidazol (por ejemplo, ketoconazol e itraconazol), fenotiazinas, y derivados de benzopirano.

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

45 Los antagonistas de los receptores de leucotrieno incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck and Co. MK-591, Merck and Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK&F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 y Teijin TEI-1338.

Síntesis de las unidades de ligando fármaco

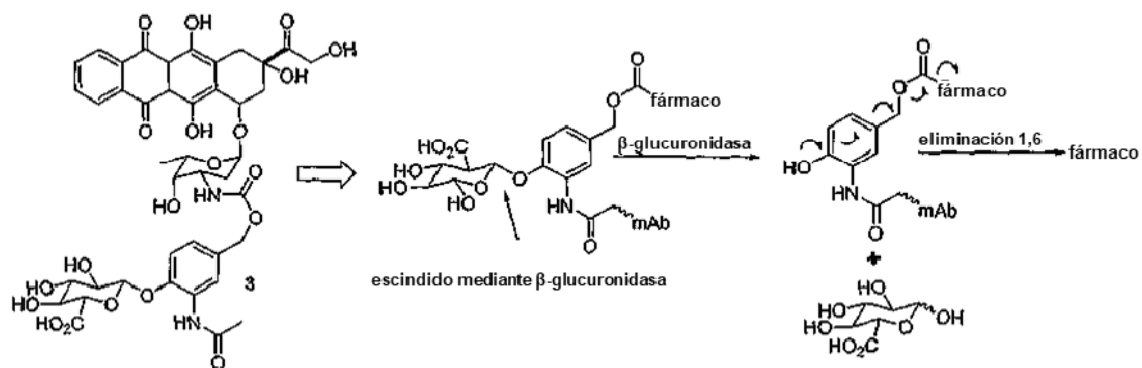
55 Se pueden sintetizar una unidad de glucurónido y un conjugado de enlazador-fármaco basado en glucurónido mediante cualquier técnica adecuada. La síntesis profármacos basados en glucurónidos se divulga en, por ejemplo, Desbene *et al.*, 1998, Anticancer Drug Des. 13:955-68.

60 Un conjugado de compuesto de ligando fármaco que comprende un conjugado de enlazador-fármaco basado en glucurónido puede sintetizarse mediante las técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, un conjugado de enlazador fármaco basado en glucurónido puede comprender una funcionalidad acetamida para la conjugación con una unidad de ligando. Con respecto al Esquema 1, se muestra un profármaco β -glucurónido de doxorubicina (3) en el Esquema 1. La amida puede estar modificada, mediante el precursor de amina, para poseer un grupo reactivo tal como una bromoacetamida o maleimida para la unión a un ligando, tal como un anticuerpo. Además, como se divulga en el Esquema 1, bajo la acción de la β -glucuronidasa, el sistema de fármaco-enlazador lábil a la β -

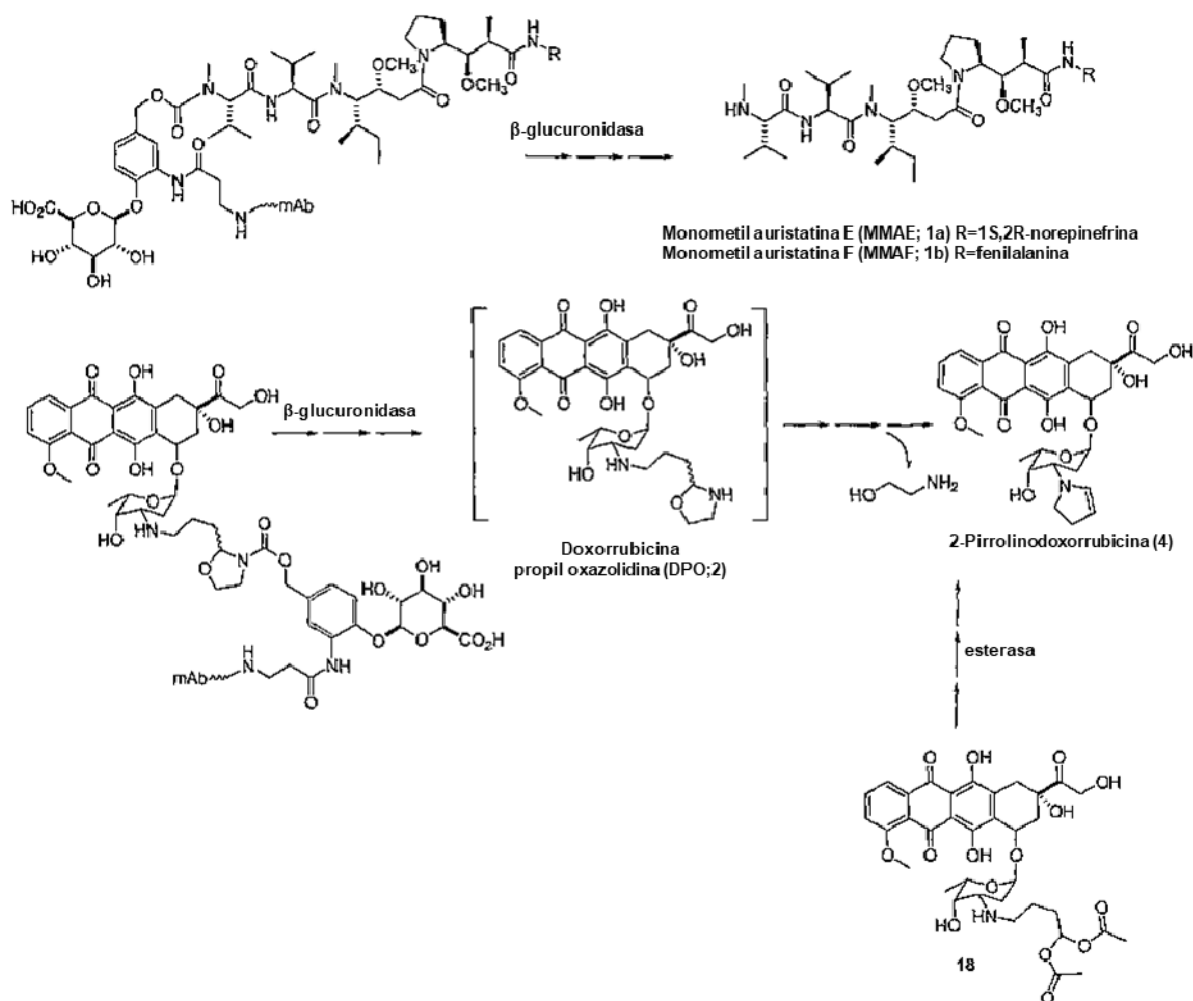
glucuronidasa daría como resultado la escisión del enlace glicosídico seguida por la eliminación de 1,6 y la pérdida del dióxido de carbono, para liberar el fármaco del conjugado ligando fármaco.

- 5 En otras realizaciones ilustrativas, El Esquema 2 divulga conjugados de anticuerpo fármaco ilustrativos de MMAE, y MMAF y otro potente derivado de doxorrubicina; doxorrubicina propil oxazolina (DPO; **2**) que es un precursor de 2-pirrolinodoxorrubicina (**4**) como se muestra en el Esquema 2. Además, se muestra en el Esquema 2 un profármaco β -glucurónico de MMAE.

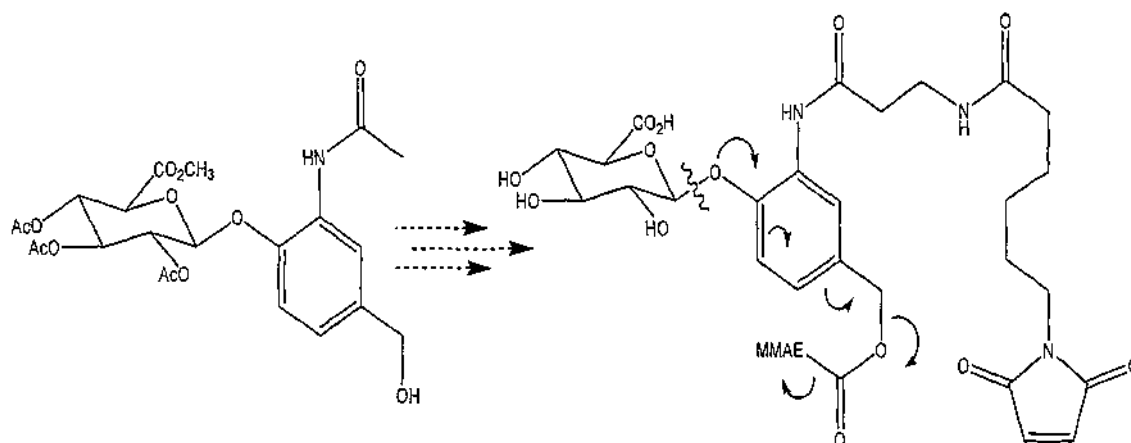
Esquema 1



Esquema 2

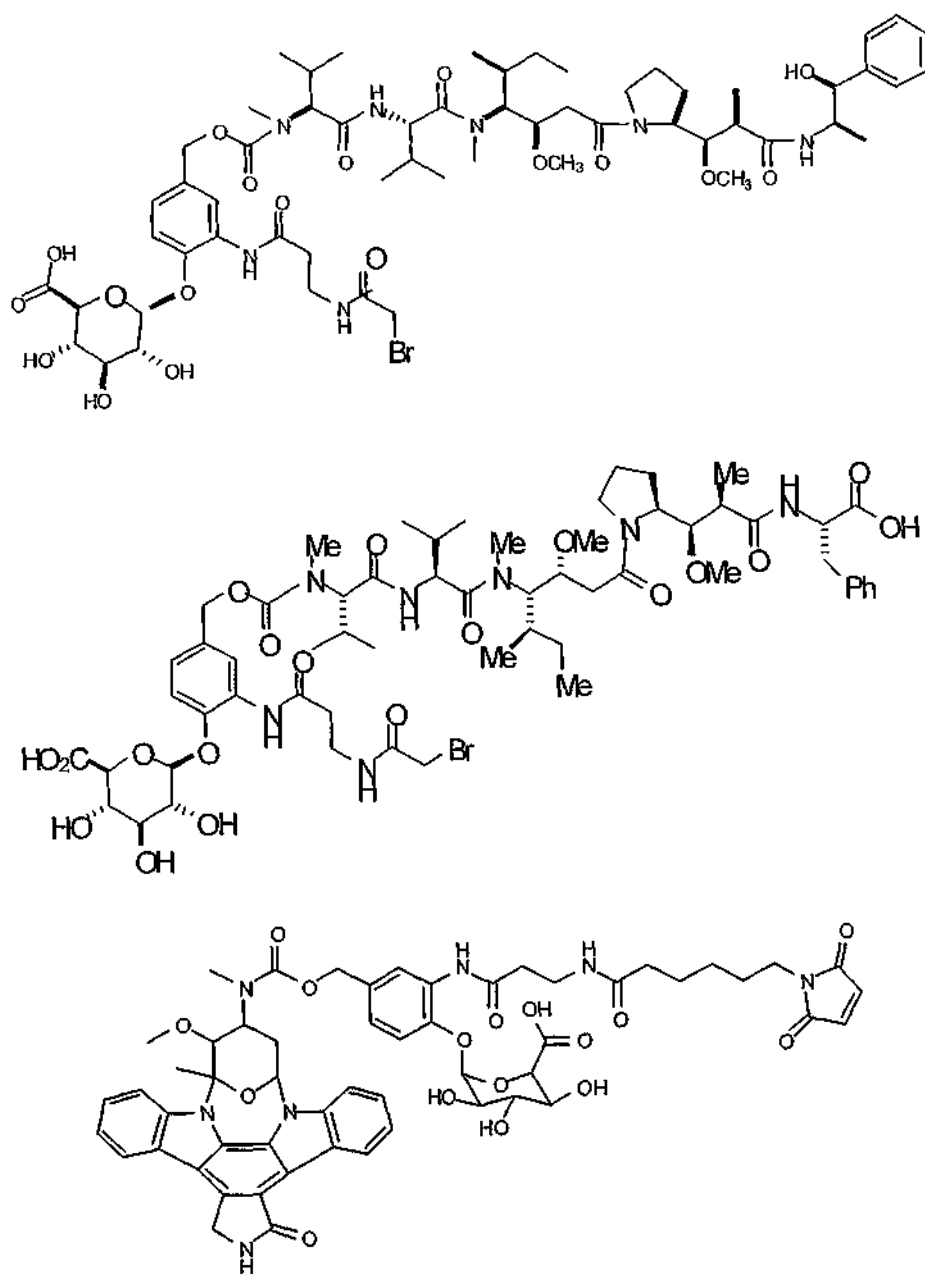


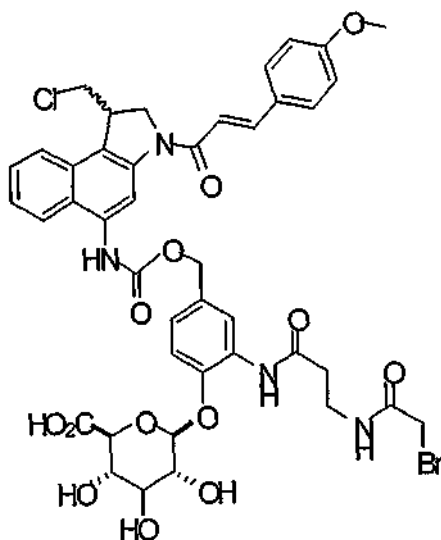
Esquema 2a



5

En otras realizaciones, el conjugado de enlazador fármaco basado en glucurónido puede ser, por ejemplo, bromoacetamidagluconido-MMAE; bromoacetamida-glucurónido-MMAF; glucurónido-estaurosporina; o un aglutinante de la ranura menor de glucurónido-amino CBI (SN26597), como se muestra en la siguiente fórmula.





COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

- 5 Las actuales composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en la forma de un sólido, líquido o gas (aerosol). Las rutas de administración típicas incluyen, sin limitación, oral, tópica, parenteral, sublingual, rectal, vaginal, ocular, intratumoral, e intranasal. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intraesternal o técnicas de infusión. En un aspecto, las composiciones se administran por
- 10 vía parenteral. En otro aspecto más, los compuestos se administran por vía intravenosa. En algunas realizaciones, un compuesto conjugado de ligando fármaco se administra en ausencia de una administración de una beta-glucuronidasa.

- 15 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de tal manera que permitan a un compuesto estar biodisponible tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una única unidad de dosificación, y un recipiente de un compuesto en forma de aerosol puede mantener una pluralidad de unidades de dosificación.

- 20 Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden no ser tóxicos en las cantidades usadas. Será evidente para una persona normalmente experta en la materia que la dosificación óptima del principio o principios activos en las composición farmacéutica dependerá de varios factores. Los factores relevantes incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, ser humano), la forma concreta del compuesto, la manera de administración, y la composición empleada.

- 25 El vehículo farmacéuticamente aceptable puede estar en forma de partículas, de forma que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimidos o polvo. El(Los) vehículo(s) puede ser líquido, siendo las composiciones, por ejemplo, un jarabe oral o un líquido inyectable. Además, el(los) vehículo(s) puede ser gaseoso o particulado, con el fin de proporcionar una composición en aerosol útil en, por ejemplo, administración inhalatoria.

- 30 Cuando se pretende para la administración oral, la composición está preferentemente en forma sólida o líquida, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel se incluyen en las formas consideradas en el presente documento ya sea como sólido o como líquido.

- 35 Como una composición sólida para la administración oral, la composición puede formularse en un polvo, gránulo, comprimido formado por compresión, píldora, cápsula, chicles, obleas o las formas similares. Dicha composición sólida contiene normalmente uno o más diluyentes inertes. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, un agente disgregante tal como ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; agente deslizantes tales
- 40 como dióxido de silicio coloidal; agente edulcorantes tales como sacarosa o sacarina, un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo o aroma de naranja, y un agente colorante.

- 45 Cuando la composición está en la forma de una cápsula, *por ejemplo*, una cápsula de gelatina, esta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol, ciclodextrina o un aceite graso.

La composición puede estar en la forma de o un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o

suspensión. El líquido puede ser útil para la administración oral o para la administración mediante inyección. Cuando se pretende para la administración oral, una composición puede comprender uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y un potenciador del aroma. En una composición para su administración mediante inyección se puede incluir uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir también uno o más de los siguientes: los diluyentes estériles tales como agua para inyección, suero salino, preferente suero salino fisiológico, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como monoglicéridos o diglicéridos sintéticos que pueden servir como medio disolvente o de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La composición parenteral se puede introducir en una ampolla, una jeringa desechable o un vial multidosis hecho de vidrio, plástico u otro material. El suero salino fisiológico es un adyuvante ilustrativo. Una composición inyectable es, preferentemente, estéril.

La cantidad de compuesto que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o dolencia concreto dependerá de la naturaleza del trastorno o dolencia, y se puede determinar mediante técnicas clínicas normalizadas. Además, se pueden utilizar de manera opcional ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que se empleará en las composiciones dependerá también de la ruta de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y deberá decidirse de acuerdo con el criterio del especialista a cargo del tratamiento y de las circunstancias del paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de tal manera que se obtenga una dosificación adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos aproximadamente un 0,01 % de un compuesto en peso de la composición. Cuando se pretende para la administración oral, esta cantidad puede variarse para variar desde aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 80 % en peso de la composición. En un aspecto, las composiciones orales pueden comprender de aproximadamente 4 % a aproximadamente 50 % del compuesto en peso de la composición. En otro aspecto más, las presentes composiciones se preparan de tal manera que una unidad de dosificación parenteral contenga de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2 % en peso del compuesto.

Para la administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de un compuesto por kg de peso corporal del animal. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un compuesto por kg de peso corporal del animal. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de un compuesto.

En general, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 2000 mg/kg de peso corporal del animal. En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del animal. En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg del peso corporal del animal. En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del animal. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del animal. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal.

El compuesto o las composiciones pueden administrarse mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. Se conocen varios sistemas de administración, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, cápsulas, etc., y se puede usar para administrar un compuesto. En determinadas realizaciones, se administra más de un compuesto o composición a un paciente.

En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar uno o más compuestos o composiciones localmente en el área en necesidad de tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante una cirugía; aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía; mediante inyección; mediante un catéter; mediante un supositorio; o mediante un implante, siendo el implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un cáncer, tumor o tejido neoplásico o preneoplásico. En otra realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de una manifestación de una enfermedad autoinmune.

En determinadas realizaciones, puede ser deseable introducir uno o más compuestos o composiciones en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal. La inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya.

5 Se puede emplear también la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante, o mediante perfusión en un tensioactivo pulmonar de fluorocarbono o sintético.

10 En otra realización más, el compuesto o composiciones pueden administrarse en un sistema de liberación controlada, tal como, aunque no de forma limitativa, una bomba o bien se pueden utilizar diferentes materiales poliméricos. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada próximo a la diana del compuesto o composiciones, *por ejemplo*, el cerebro, requiriendo de esta manera solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, anteriormente citado, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Se pueden utilizar otros sistemas de liberación controlada descritos en la revisión de Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el cual se administra un compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los portadores pueden ser suero salino, goma de acacia, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea o similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. En una realización, cuando se administran a un paciente, el compuesto o composiciones y los vehículos farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un vehículo ilustrativo cuando los compuestos se administran por vía intravenosa. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes, tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoesterato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación continua, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizaciones, suspensiones, o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

En una realización, los compuestos se formulan de acuerdo con los procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a animales, especialmente seres humanos. Normalmente, los portadores o vehículos para administración intravenosa son soluciones acuosas estériles tamponadas. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaína para disminuir el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran tanto por separado o se mezclan conjuntamente en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o sobrecillo que indica la cantidad de principio activo. Cuando el compuesto se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con un frasco para infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o suero salino. Cuando el compuesto se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o suero salino para que los componentes se mezclen antes de la administración.

Las composiciones para la administración oral pueden estar en la forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener opcionalmente uno o más agentes, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartame o sacarina; agentes aromatizantes tales como menta piperita, aceite de gaulteria o cereza; agentes colorantes; y agentes conservantes, para proporcionar una preparación farmacéutica agradable al paladar. Además, cuando están en forma de comprimido o píldora, las composiciones pueden revestirse para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal proporcionando por tanto una acción sostenida durante un periodo prolongado de tiempo. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto impulsor osmóticamente activo también son adecuadas para compuestos de la invención administrados por vía oral. En estas últimas plataformas, el fluido del entorno que rodea la cápsula se absorbe por el compuesto impulsor, que se hincha para desplazar el agente o composición de agente a través de una apertura. Estas plataformas de suministro pueden proporcionar un perfil de liberación de orden prácticamente cero en oposición a los perfiles enriquecidos de las formulaciones de liberación inmediata. Se puede usar también un material de retraso en el tiempo tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol.

Se pueden pretender las composiciones para la administración tópica, en cuyo caso, el vehículo puede estar en la forma de una solución, emulsiones, pomada o base de gel. si se pretenden para la administración transdérmica, la composición puede estar en la forma de un parche transdérmico o un dispositivo de iontoforesis. Las formulaciones tópicas pueden comprender una concentración de un compuesto de entre aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 50 % p/v (peso por unidad de volumen de la composición), en otro aspecto, de 0,1 % a 10 % p/v.

Se puede pretender la composición para la administración rectal, en la forma, *por ejemplo*, de un supositorio que se funde en el recto y libera el compuesto.

La composición puede incluir varios materiales que modifican la forma fisiológica de una forma farmacéutica sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que constituyen una envoltura de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales forman la envoltura de revestimiento son normalmente inertes, y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, shellac, y otros agentes de revestimiento entéricos. Como alternativa, los principios activos se pueden incluir en una cápsula de gelatina.

Las composiciones pueden consistir en unidades de dosificación gaseosas, *por ejemplo*, pueden estar en la forma de un aerosol. El término aerosol se utiliza para denotar varios sistemas que varían desde aquellos de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envases presurizados. La administración puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que dispense los principios activos.

Tanto si están en forma sólida, líquida o gaseosa, las presentes composiciones pueden incluir un agente farmacológico utilizado en el tratamiento del cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa.

USOS TERAPÉUTICOS DE LOS CONJUGADOS

Los conjugados son útiles para tratar el cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad infecciosa u otra enfermedad en un paciente. En algunas realizaciones, los conjugados se administran solos. En otras realizaciones, los conjugados se administran simultáneamente con otro agente terapéutico. En algunas realizaciones, los conjugados se administran simultáneamente con las sustancias quimioterapéuticas tratantes habituales.

TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Los conjugados son útiles para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa, produciendo la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para tratar el cáncer en un paciente. Los compuestos se pueden usar de acuerdo con ello en varios escenarios para el tratamiento de cánceres animales. Algunos tipos de cánceres particulares ilustrativos se pueden tratar con compuestos incluyen, aunque no de forma limitativa, los descritos en la Tabla 1.

TABLA 1

Tumores sólidos, incluyendo, aunque no de forma limitativa:

fibrosarcoma
mixosarcoma
liposarcoma
condrosarcoma
sarcoma osteogénico
cordoma
angiosarcoma
endoteliosarcoma
linfangiosarcoma
linfangioendoteliosarcoma
sinovioma
mesotelioma
tumor de Ewing
leiomiosarcoma
rabdomiosarcoma
cáncer de colon
cáncer de recto
cáncer colorrectal
cáncer de riñón
cáncer de páncreas
cáncer de hueso
cáncer de mama
cáncer de ovario

(continuación)

cáncer de próstata
carcinoma del pene
cáncer de esófago
cáncer gástrico
cáncer gastrointestinal
cáncer de estómago
cáncer peritoneal
carcinoma hepático
cáncer hepatocelular
cáncer de hígado
cáncer oral
cáncer nasal
cáncer de garganta
carcinoma escamocelular (por ejemplo, epitelial)
carcinoma de células basales
adenocarcinoma
carcinoma de las glándulas sudoríparas
carcinoma de las glándulas sebáceas
carcinoma papilar
adenocarcinomas papilares
cistadenocarcinoma
carcinoma medular
carcinoma broncogénico
carcinoma de células renales
hepatoma
carcinoma del conducto biliar
coriocarcinoma
seminoma
carcinoma embrionario
tumor de Wilms
cáncer de cuello de útero
cáncer de útero
carcinoma de endometrio o de útero
cáncer de vulva
cáncer de testículos
carcinoma de vejiga
cáncer de pulmón, incluyendo carcinoma de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso de pulmón
carcinoma epitelial
glioma
glioblastoma
glioblastoma multiforme
astrocitoma
meduloblastoma
craneofaringioma
ependimoma
pinealoma
hemangioblastoma
neuroma acústico
oligodendroglioma
meningioma
cáncer de piel
melanoma
neuroblastoma
retinoblastoma
carcinoma de las glándulas salivales
cáncer de tiroides
cáncer de cabeza
cáncer de cuello
cáncer de ano
cánceres transmitidos por la sangre, incluyendo, aunque no de forma limitativa:
leucemia linfoblástica aguda "LLA"
leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B

(continuación)

leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T
leucemia mielobástica aguda "LMA"
leucemia promielocítica aguda "LPA"
leucemia monoblastica aguda
leucemia eritroleucémica aguda
leucemia megacarioblastica aguda
leucemia mielomonocítica aguda
leucemia no linfocítica aguda
leucemia aguda no diferenciada
leucemia mielocítica crónica "LMC"
leucemia linfocítica crónica "LLC"
leucemia de células pilosas
mieloma múltiple
leucemias aguda y crónica:
leucemias linfoblástica
mielógena
linfocítica
mielocítica
Linfomas:
enfermedad de Hodgkin
linfoma no de Hodgkin
mieloma múltiple
macroglobulinemia de Waldenstrom
enfermedad de la cadena pesada
Policitemia vera

Los conjugados proporcionan direccionamiento al tumor o al cáncer específico de la conjugación, reduciendo de esta manera la toxicidad general de estos compuestos. El enlazador estabiliza los conjugados en sangre, además es escindible por enzimas en el interior de la célula (por ejemplo, enzimas lisosómicas), liberando el (los) fármaco(s).

5

TRATAMIENTO MULTIMODAL PARA EL CÁNCER

Los cánceres, incluyendo, aunque no de forma limitativa, un tumor, metástasis, u otra enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado, pueden tratarse o prevenirse mediante la administración de un conjugado de acuerdo con la presente divulgación.

10

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar o prevenir el cáncer, incluyendo administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado y un agente quimioterapéutico. En una realización, el agente quimioterapéutico es uno para el que no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer sea refractario. En otra realización, el agente quimioterapéutico es uno para el que se ha descubierto que, como tratamiento contra el cáncer, genera resistencia. Los conjugados pueden administrarse a un paciente que ha experimentado también cirugía como tratamiento para el cáncer.

15

En una realización, el método de tratamiento adicional es la radioterapia.

20

En una realización específica, el conjugado se administra concurrentemente con el agente quimioterapéutico o con radioterapia. En otra realización específica, el agente quimioterapéutico o la radioterapia se administra antes o posteriormente a la administración de un conjugado. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico o la radioterapia se administra al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, algunos meses (por ejemplo, hasta tres meses), antes o posteriormente a la administración de un conjugado.

25

Se puede administrar un agente quimioterapéutico durante una serie de sesiones. Se puede administrar uno cualquiera o una combinación de los siguientes agentes quimioterapéuticos (véase posteriormente). Con respecto a la radiación, se puede usar cualquier protocolo de radioterapia dependiendo del cáncer que se va a tratar. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, se puede administrar radiación de rayos x; en particular, Se pueden usar megatensiones de alta energía (radiación de más de 1 MeV de energía) para los tumores profundos, y se pueden usar haces de electrones y ortotensiones de radiación de rayos X para los cánceres de piel. se pueden administrar también radioisótopos que emiten rayos gamma, tales como isótopos radioactivos de radio, cobalto y otros elementos.

35

Además, se proporcionan métodos de tratamiento del cáncer con un conjugado como una alternativa a la quimioterapia o la radioterapia donde la terapia o la radioterapia han demostrado o pueden demostrar ser demasiado tóxicas, *por ejemplo*, da como resultado efectos secundarios inaceptables o insoportables, para el sujeto que se está tratando. El animal que se está tratando puede, opcionalmente, tratarse con otro tratamiento contra el cáncer como la cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo de qué tratamiento se considera aceptable o soportable.

40

Se pueden utilizar también los conjugados de una manera *in vitro* o *ex vivo*, tal como en el tratamiento de determinados cánceres, incluyendo, pero sin limitación, leucemias y linfomas, implicando dicho tratamiento trasplantes de citoblastos autólogos. Esto puede implicar un procedimiento multietapa en el que citoblastos hematopoyéticos autólogos del animal se recogen y limpian de todas las células cancerosas, a continuación se erradica la población de células de médula ósea restante del animal mediante la administración de una dosis elevada de un conjugado con o sin radioterapia de dosis elevadas acompañante y el injerto de citoblastos se infunde posteriormente en el animal. A continuación, se proporciona tratamiento de soporte mientras se restaura la función de la médula ósea y se recupera el animal.

TRATAMIENTO MULTIFÁRMACOS PARA EL CÁNCER

Se divulgan métodos para tratar el cáncer incluyen administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado y otro agente terapéutico que es un agente anticanceroso.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN® ciclofosfamida; alquil sulfonatos tales como busulfán, improsulfano, piposulfan y treosulfan; dacarbazina; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; TLK 286 (TELCYTA™); acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); betalapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina incluyendo el análogo sintético de topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina; briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; bisfosfonatos, tales como clodronato; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma11 y caliqueamicina omegal1 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994)) y antraciclinas tales como annamicina, AD 32, alcarrubicina, daunorrubicina, dextrazoxano, DX-52-1, epirubicina, GPX-100, idarrubicina, KR5500, menogaril, dinemicina, incluyendo dinemicina A, una esperamicina, cromóforos de neocarzinostatina y cromóforos del antibiótico enediina de la cromoproteína relacionada, aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas (por ejemplo, bleomicina A2, bleomicina B2 y peplomicina), cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (que incluye morfolinodoxorrubicina, cianomorfolinodoxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, doxorubicina liposómica, y desoxidoxorrubicina), esorrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, tiazofurina, ribavirina, EICAR, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, y zorrubicina; análogos del ácido fólico tales como denopterina, pteropterina, y trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, y tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, y floxuridina; andrógenos tales como calazurona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostana, y testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, y trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido folínico (leucovorina); aceglatona; agentes antineoplásicos antifolato tales como ALIMTA®, LY231514 pemetrexed, inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como metotrexato y trimetrexato, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo (5-FU) y sus profármacos tales como UFT, S-1 y capecitabina, e inhibidores de la timidilato sintasa e inhibidores de la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa tales como raltitrexed (TOMUDEXRM, TDX); inhibidores de la dihidropirimidina deshidrogenasa tal como eniluracilo; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; deferroxamina; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidracida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; citosina arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides y taxanos, *por ejemplo*, TAXOL® paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ exento de Cremofor, formulación de nanopartículas de paclitaxel diseñadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE® doxetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (GEMZAR®); 6-tioguanina; mercaptopurina; platino; análogos de platino o análogos basados en platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); epipodofilinas tales como etopósido (VP-16), tenipósido, tepotecan, 9-aminocamptoteguina, camptotecina y crisnatol; ifosfamida; mitoxantrona; alcaloides de la vinca tales como vincristina (ONCOVIN®), vindesina, alcaloides de la vinca, y vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales

farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona, y FOLFOX, una abreviatura para un régimen de tratamiento con oxiplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

- 5 En algunas realizaciones, el agente anticanceroso es metotrexato, taxol, L-asparaginasa, mercaptopurina, tioguanina, hidroxiurea, citarabina, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosoureas, cisplatino, carboplatino, mitomicina, dacarbazina, procarbazona, topotecán, mostazas de nitrógeno, citoxano, etopósido, 5-fluorouracilo, BCNU, irinotecán, camptotecinas, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, plicamicina,
- 10 mitoxantrona, asparaginasa, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, o docetaxel.

En algunas realizaciones, el agente anticanceroso incluye, aunque no de forma limitativa, un fármaco relacionado en la Tabla 2.

15

TABLA 2

Agentes alquilantes	
mostazas de nitrógeno:	ciclofosfamida ifosfamida trofosfamida clorambucilo melfalán
Nitrosoureas:	carmustina (BCNU) lomustina (CCNU)
Alquilsulfonatos	busulfán treosulfano
Triazenos:	dacarbazina
Compuestos que contienen platino:	cisplatino carboplatino
Alcaloides vegetales	
Alcaloides de vinca:	vincristina vinblastina vindesina vinorelbina
Taxoides:	paclitaxel docetaxol
Inhibidores de la topoisomerasa del ADN	
Epipodofilinas:	etopósido tenipósido topotecán 9-aminocamptotecina camptotecina crisnatol
Mitomicinas:	mitomicina C
Antimetabolitos	
antifolatos:	
Inhibidores de DHFR:	metotrexato trimetrexato
Inhibidores de la IMP deshidrogenasa:	ácido micofenólico tiazofurina ribavirina EICAR
Inhibidores de la ribonucleótido reductasa:	hidroxiurea deferoxamina

(continuación)

Agentes alquilantes	
Análogos de pirimidina:	
Análogos de uracilo	5-fluorouracilo
	floxuridina doxifluridina ratitrexed
Análogos de citosina	citarabina (ara C) citosina arabinósido fludarabina
Análogos de purina:	mercaptopurina tioguanina
Tratamientos hormonales:	
Antagonistas de receptores:	
Antiestrógenos	tamoxifeno raloxifeno megestrol
Agonistas de LHRH:	goserelina acetato de leuprólido
Antiandrógenos:	flutamida bicalutamida
Retinoides/Deltoides	
Análogos de la vitamina D3:	EB 1089 CB 1093
	KH 1060
Tratamientos fotodinámicos:	vertoporfina(BPD-MA) ftalocianina fotosensibilizador Pc4 demetoxi-hipocrelina A (2BA-2-DMHA)
Citoquinas:	interferón- α Interferón- γ factor de necrosis tumoral
Otros:	Gemcitabina Velcade Revamid Talamid
Inhibidores de la isoprenilación:	lovastatina
Neurotoxinas dopaminérgicas:	ion de 1-metil-4-fenilpiridinio
Inhibidores del ciclo celular:	estaurosporina
Actinomicinas:	Actinomicina D
	dactinomicina
Bleomicinas:	bleomicina A2 bleomicina B2 peplomicina

(continuación)

Agentes alquilantes	
Antraciclinas:	daunorrubicina doxorubicina (adriamicina) idarrubicina epirubicina pirarubicina zorrubicina mitoxantrona
Inhibidores de MDR:	verapamilo
Inhibidores de la Ca ²⁺ ATPasa:	tapsigargina

TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

5 Los conjugados son útiles para destruir o inhibir la replicación de una célula que produce una enfermedad autoinmunitaria o para tratar una enfermedad autoinmunitaria. Los conjugados se pueden usar de acuerdo con ello en varios escenarios para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en un paciente.

10 Los tipos concretos de enfermedades autoinmunitarias que se pueden tratar con los conjugados incluyen, aunque no de forma limitativa, trastornos relacionados con linfocitos Th2 (*por ejemplo*, dermatitis atópica, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica, y enfermedad de injerto frente a hospedador); trastornos relacionados con linfocitos Th1 (*por ejemplo*, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, y tuberculosis); trastornos relacionados con linfocitos B activados (*por ejemplo*, lupus sistémico eritematoso, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide, y diabetes de tipo I); y los descritos en la Tabla 3.

15

TABLA 3

Hepatitis crónica activa
Enfermedad de Addison
Alveolitis alérgica
Reacción alérgica
Rinitis alérgica
Síndrome de Alport
Anafilaxia
Espondilitis anquilosante
Síndrome antifosfolípidos
Artritis
Ascariasis
Aspergilosis
Alergia atópica
Dermatitis atópica
Rinitis atópica
Enfermedad de Behcet
Pulmón de Bird-Fancier
Asma bronquial
Síndrome de Caplan
Cardiomiopatía
Enfermedad celíaca
Enfermedad de Chagas
Glomerulonefritis crónica
Síndrome de Cogan
Enfermedad por crioaglutininas
Infección por rubeola congénita
Síndrome CREST
Enfermedad de Crohn
Crioglobulinemia
Síndrome de Cushing
Dermatomiositis
Lupus discoide
Síndrome de Dressler
Síndrome de Eaton-Lambert

(continuación)

Infección por Ecovirus
Encefalomiелitis
Oftalmopatía endocrina
Infección por el virus Epstein-Barr
Náuseas equinas
Eritematosis
Síndrome de Evan
Síndrome de Felty
Fibromialgia
Ciclitis de Fuch
Atrofia gástrica
Alergia gastrointestinal
Arteritis de células gigantes
Glomerulonefritis
Síndrome de Goodpasture
Enfermedad de injerto frente a hospedador
Enfermedad de Grave
Enfermedad de Guillain-Barre
Tiroiditis de Hashimoto
Anemia hemolítica
Púrpura de Henoch-Schonlein
Atrofia idiopática de las glándulas suprarrenales
Fibrosis pulmonar idiopática
Nefropatía de IgA
Enfermedad inflamatoria del intestino
Diabetes mellitus insulín dependiente
Artritis juvenil
Diabetes mellitus juvenil
Síndrome de Lambert-Eaton
Laminitis
Liquen plano
Hepatitis lupoide
Lupus
Linfopenia
Enfermedad de Meniere
Enfermedad del tejido conectivo mixto
Esclerosis múltiple
Miastenia grave
Anemia perniciosa
Síndromes poliglandulares
Demencia presenil
Agammaglobulinemia primaria
Cirrosis biliar primaria
Psoriasis
Artritis psoriática
Fenómeno de Raynaud
Aborto recurrente
Síndrome de Reiter
Fiebre reumática
Artritis reumatoide
Síndrome de Sampter
Esquistosomiasis
Síndrome de Schmidt
Escleroderma
Síndrome de Shulman
Síndrome de Sjorgen
Síndrome de Stiff-Man
Oftalmia simpática
Lupus sistémico eritematoso
Arteritis de Takayasu
Arteritis temporal
Tiroiditis
Trombocitopenia
Tirotoxicosis

(continuación)

Necrolisis epidérmica tóxica
Resistencia a la insulina de tipo B
Diabetes mellitus Tipo 1
Colitis ulcerosa
Uveitis
vitíligo
Macroglobulinemia de Waldenstrom
Granulomatosis de Wegener

TRATAMIENTO MULTIFÁRMACO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

- 5 Se divulgan también los métodos para tratar una enfermedad autoinmunitaria, incluyendo administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un conjugado y otro agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. En una realización, el agente de la enfermedad autoinmunitaria incluye, aunque no de forma limitativa, los agentes relacionados en la Tabla 4.

Tabla 4

ciclosporina
ciclosporina A
micofenolato de mofetilo
sirolimus
tacrolimus
enanercept
prednisona
azatioprina
metotrexato ciclofosfamida
prednisona
ácido aminocaproico
cloroquina
hidroxicloroquina
hidrocortisona
dexametasona
clorambucilo
DHEA
danazol
bromocriptina
meloxicam
infiximab

- 10 Los conjugados son útiles para destruir o inhibir la multiplicación de una célula que produce una enfermedad infecciosa o para tratar una enfermedad infecciosa.

- 15 En una realización, los conjugados destruyen o inhiben la multiplicación de células que producen una enfermedad infecciosa concreta.

Los tipos concretos de enfermedades infecciosas que se pueden tratar con los conjugados incluyen, aunque no de forma limitativa, los descritos en la Tabla 5.

- 20 TABLA 5

Enfermedades bacterianas:

Difteria
Tosferina
Bacteremia oculta
Infección del tracto urinario
Gastroenteritis
Celulitis
Epiglotitis
Traqueítis
Hipertrofia de adenoides
Absceso retrofaríngeo
Impétigo
Ectima
Neumonía

(continuación)

Enfermedades bacterianas:

- Endocarditis
- Artritis séptica
- Pneumocócica
- Peritonitis
- Bacteremia
- Meningitis
- Meningitis purulenta aguda
- Uretritis
- Cervicitis
- Proctitis
- Faringitis
- Salpingitis
- Epididimitis
- Gonorrrea
- Sífilis
- Listeriosis
- Ántrax
- Nocardiosis
- Salmonella
- Fiebre tifoidea
- Disentería
- Conjuntivitis
- Sinusitis
- Brucelosis
- Tularemia
- Cólera
- Peste bubónica
- Tétanos
- Enteritis necrosante
- Actinomicosis
- Infecciones anaerobias mixtas
- Sífilis
- Fiebre recurrente
- Leptospirosis
- Enfermedad de Lyme
- Fiebre por mordedura de rata
- Tuberculosis
- Linfoadenitis
- Lepra
- Clamidia
- Neumonía por clamidia
- Tracoma
- Conjuntivitis por inclusión

Enfermedades fúngicas sistémicas:

- Histoplasmosis
- Coccidioidomicosis
- Blastomicosis
- Esporotricosis
- Criptococosis
- Candidiasis sistémica
- Aspergilosis
- Mucormicosis
- Micetoma
- Cromomicosis

Enfermedades por rickettsia:

- Tifus
- Fiebre con manchas de las Montañas Rocosas
- Erliquiosis
- Rickettsiosis transmitida por la pulga oriental de la rata
- Viruela por Rickettsia
- Fiebre Q
- Bartonelosis

(continuación)

Enfermedades parasíticas:

- Malaria
- Babesiosis
- Enfermedad del sueño africana
- Enfermedad de Chagas
- Leishmaniasis
- Fiebre Dum-Dum
- Toxoplasmosis
- Meningoencefalitis
- Queratitis
- Entamebiasis
- Giardiasis
- Criptosporidiasis
- Isosporiasis
- Ciclosporiasis
- Microsporidiosis
- Ascariasis
- Tricuriasis
- Anquilostomiasis
- Estrongiloidiasis
- Larva Migrans ocular
- Triquinosis
- Dracunculiasis
- Filariasis linfática
- Loiasis
- Oncocercosis
- Dirofilariasis
- Esquistosomiasis
- Picadura de notonéctido
- paragonimiasis
- Clonorchiasis
- Fascioliasis
- Fasciolopsiasis
- Opistorquiasis
- Infección por cestodos
- Hidatiasis
- Enfermedad hidatídica alveolar

Enfermedades víricas:

- Sarampión
- Panencefalitis esclerosante subaguda
- Resfriado común
- Paperas
- Rubeola
- Roseola
- Eritema infeccioso
- Viruela aviar
- Infección por virus sincitial respiratorio
- Laringotraqueobronquitis
- Bronquiolitis
- Mononucleosis infecciosa
- Poliomelitis
- Herpangina
- Fiebre aftosa humana
- Enfermedad de Bomholm
- Herpes genital
- Verrugas genitales
- Meningitis aséptica
- Miocarditis
- Pericarditis
- Gastroenteritis
- Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)
- Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
- Síndrome de Reye

(continuación)

Enfermedades víricas:
 Síndrome de Kawasaki
 Gripe
 Bronquitis
 Neumonía atípica
 Síndrome paragripal
 Fiebre faringoconjuntival aguda
 Queratoconjuntivitis epidémica
 Virus del herpes simple 1 (VHS-1)
 Virus del herpes simple 2 (VHS-2)
 Herpes zoster
 Infección por citomegalovirus
 Rabia
 Leucoencefalopatía multifocal progresiva
 Kuru
 Insomnio familiar fatal
 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
 Enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker
 Paraparesis espástica tropical
 Encefalitis equina occidental
 Encefalitis de California
 Encefalitis de San Luis
 Fiebre amarilla
 Dengue
 Coriomeningitis linfocítica
 Fiebre de Lassa
 Fiebre hemorrágica
 Síndrome pulmonar por hantavirus
 Infecciones por el virus Marburg
 Infecciones por el virus del Ébola
 Viruela

TRATAMIENTO MULTIFÁRMACOS DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

- 5 Se divulgan los métodos para tratar una enfermedad infecciosa, incluyendo administrar a un paciente que lo necesita un conjugado y otro agente terapéutico que es un agente contra enfermedades infecciosas. En una realización, los agentes contra enfermedades infecciosas son, aunque no de forma limitativa, los agentes relacionados en la Tabla 6.

10

TABLA 6

Antibióticos de β -lactamas:

Penicilina G
 Penicilina V
 Cloxacilina
 Dicloxacilina
 Metilicina
 Nafcilina
 Oxacilina
 Ampicilina
 Amoxicilina
 Bacampicilina
 Azlocilina
 Carbenicilina
 Mezlocilina
 Piperacilina
 Ticarcilina

Aminoglicósidos:

Amikacina
 Gentamicina
 Kanamicina
 Neomicina
 Netilmicina
 Estreptomina
 Tobramicina

(continuación)

Macrólidos:

Azitromicina
Claritromicina
Eritromicina
Lincomicina
Clindamicina

Tetraciclinas:

Demeclociclina
Doxiciclina
Minociclina
Oxitetraciclina
Tetraciclina

Quinolonas:

Cinoxacina
Ácido nalidíxico

Fluoroquinolonas:

Ciprofloxacina
Enoxacina
Grepafloxacina
Levofloxacina
Lomefloxacina
Norfloxacina
Ofloxacina
Esparfloxacina
Trovafoxicina

Polipéptidos:

Bacitracina
Colistina
Polimixina B

Sulfonamidas:

Sulfisoxazol
Sulfametoxazol
Sulfadiazina
Sulfametizol
Sulfacetamida

Agentes antibacterianos diversos:

Trimetoprim
Sulfametazol
Cloranfenicol
Vancomicina
Metronidazol
Quinupristina
Dalfopristina
Rifampina
Espectinomicina
Nitrofurantoina

Agentes antivíricos:

Agentes antivíricos generales:

Idoxuradina
Vidarabina
Trifluridina
Aciclovir
Famciclovir
Penciclovir
Valaciclovir
Ganciclovir
Foscarnet
Ribavirina
Amantadina
Rimantadina
Cidofovir
Oligonucleótidos de sentido contrario
Inmunoglobulinas
Interferones

(continuación)

Fármacos para la infección por VIH:

Tenofovir
 Emtricitabina
 Zidovudina
 Didanosina
 Zalcitabina
 Estavudina
 Lamivudina
 Nevirapina
 Delavirdina
 Saquinavir
 Ritonavir
 Indinavir
 Nelfinavir

Ejemplos

- 5 La divulgación se describe con más detalle en los ejemplos siguientes. Las líneas de células descritas en los siguientes ejemplos se mantuvieron en cultivo de acuerdo con las condiciones especificadas por la American Type Culture Collection (ATCC) o Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania (DMSZ), a menos que se especifique otra cosa. Los reactivos de los cultivos celulares se obtuvieron de Invitrogen Corp., Carlsbad, CA a no ser que se especifique otra cosa.
- 10 A menos que se indique otra cosa, todos los disolventes anhidros se obtuvieron comercialmente y se almacenaron en frascos Sure-seal® con nitrógeno. Todos los demás reactivos y disolventes se adquirieron con la calidad más alta disponible y se utilizaron sin purificación adicional. Se registraron los espectros de RMN en un Instrumento Varian Mercury de 400 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se notificaron en partes por millón (ppm) haciendo referencia al tetrametilsilano a 0,00 y las constantes de acoplamiento (J) se notificaron en Hz. Los datos espectrales de masa de resolución baja se adquirieron en un espectrómetro de masas ZMD que tiene como interfaz un instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento HP Agilent 1100 para la CL-EM. Los productos se eluyeron en una columna Phenomenex Synergi de 2,0 x 150 mm, 4 μ , 80 Å MAX RP utilizando un gradiente lineal de fase móvil B (CH₃CN con HCO₂H al 0,05 % en A (solución acuosa HCO₂H al 0,05 %) a 0,4 ml/min. Salvo que se especifique de otra forma, los tiempos de retención notificados (t_R) son aquellos procedentes de la LC-S. Se obtuvieron los datos de alta resolución (masa exacta) en el University of Washington Medicinal Chemistry Mass Spectrometry Center en un Bruker APEXIII 47e [FT(1CR)]MS. Se llevó a cabo la HPLC analítica en un instrumento Waters 2695 utilizando una PDA Waters 2996 y el software Millenium.
- 25 Para la HPLC analítica, la fase estacionaria utilizada fue una columna Phenomenex Synergi 4,6 x 150 mm, 4 μ , 80 Å MAX RP. Se eluyeron los productos tanto en gradientes lineales ácidos (designados gradiente A) de fase móvil B (CH₃CN con HCO₂H al 0,05 %; 10 % a 95 % durante 8 min) en A (solución acuosa de TFA al 0,05 %) o gradientes lineales neutros (designados gradiente N) de fase móvil B (CH₃CN; 10 % a 90 % durante 10 min, a continuación se mantuvo a 90 % durante 5 min) en A (NH₄H₂PO₄ 5,0 mM) a un caudal de 1,0 ml/min. Se llevaron a cabo las purificaciones mediante HPLC preparativa en un instrumento Varian equipado con una columna C12 Phenomenex Synergy MAX-RP 4 μ de fase inversa, de 250 x 21,2 mm, eluyendo con TFA al 0,1 % en un gradiente de agua-acetonitrilo. Se llevó a cabo la cromatografía radial en un instrumento Chromatotron® (Harrison Research, Palo Alto, CA) sobre placas de gel de sílice en fase normal (Analtech, Newark, DE). Se llevó a cabo la cromatografía en placa fina preparativa sobre placas de gel de sílice Whatman de 20 x 20 cm, 500 μ , 60 Å. se llevaron a cabo otras purificaciones preparativas en fase normal mediante la cromatografía sobre gel de sílice ultrarrápida normalizada utilizando el gel de sílice de malla 230-400 de 60 Å Whatman Science como adsorbente.

Ejemplo 1 - Síntesis

- 40 **(2S,3S,4S,5R,6S)-metil-6-(2-(3-(((9H-fluoren-9il)metoxi)carbonilamino) propanamido)-4-(hidroximetil)fenoxi)-3,4,5-triacetoxi-tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (11):** A una solución de la anilina 5 (74 mg, 0,163 mmol) en diclorometano (6 ml) se añadió DIPEA (57 μ l, 0,33 mmol). se añadió el cloruro ácido 6 (65 mg, 0,20 mmol) y se agitó la mezcla durante 30 min. La mezcla se vertió en solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera y se secaron con sulfato de sodio. La filtración y la concentración proporcionaron un residuo que se purificó mediante cromatografía radial utilizando metanol al 5 % en diclorometano como fase móvil para dar 106 mg (87 %) de 11 como un sólido blanco: RMN ¹H(d_6 -DMSO) δ 1,98 (s, 3H), 1,99 (s, 6H), 2,52 (m, 2H) 3,27 (m, 2H), 3,32 (s, 3H), 4,20 (m, 1H), 4,26 (m, 1H), 4,39 (d, 2H, J = 6,3 Hz), 4,70 (d, 1H, J = 9,7 Hz), 5,04 (t, 1H, J = 9,6 Hz), 5,15 (m, 2H), 5,48 (t, 1H, J = 9,4 Hz), 5,54 (d, 1H, J = 7,6 Hz), 5,75 (s, 1H), 7,02 (c, 2H, J = 4,3 Hz) 7,30 (m, 2H), 7,39 (t, 4H, J = 7,72 Hz), 7,67 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 7,80 (s, 1H), 7,87 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 8,72 (s, 1H); CL-EM m/z (ES⁺), 749,04 (M+H)⁺.
- 50

(2S,3S,4S,5R,6S)-metil-6-(2-(3-(((9H-fluoren-9il)metooxi)carbonilamino)propanamido)-4-(((4-

mtrofenoxi)carboniloxi)metil)fenoxi)-3,4,5-triacetoxi-tetrahidro-2H-piran-2-carboxilato (7): A una mezcla de alcohol bencílico 11 (105 mg, 0,14 mmol) en DMF (4 ml) se añadió carbonato de bis *p*-nitrofenilo (85 mg, 0,28 mmol) y DIPEA (36 μ l, 0,21 mmol). La mezcla se agitó durante 16 h a una temperatura ambiente y se concentró a presión reducida hasta un residuo oleoso. Este material se disolvió en diclorometano y se aspiró directamente sobre una placa Chromatotron radial de 1 mm y se eluyó con acetato de etilo al 50 % en hexanos seguido por acetato de etilo para dar un 83 % (106 mg) de 7 como un sólido: RMN ^1H (d_6 -DMSO) δ 1,98 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 2,52 (m, 2H), 3,28 (m, 2H), 3,62 (s, 3H), 4,20 (m, 1H), 4,27 (m, 2H), 4,73 (d, 1H, J = 9,8 Hz), 5,05 (t, 1H, J = 9,6 Hz), 5,18 (t, 1H, J = 9,4 Hz), 5,21 (s, 2H), 5,49 (t, 1H, J = 10,2 Hz), 7,10 (d, 1H, J = 8,2 Hz), 7,22 (m, 1H), 7,30 (m, 2H), 7,39 (m, 4H, J = 7,0 Hz), 7,55 (d, 2H, J = 9,2 Hz), 7,67 (d, 2H, J = 5,2 Hz), 7,87 (d, 2H, J = 7,0 Hz), 7,97 (s, 1H), 8,29 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 8,83 (s, 1H); CL-EM m/z (ES^+), 914,03 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Monometil Auristatina E (MMAE): Se preparó MMAE (1a) en Albany Molecule Research, Inc (Albany, NY). Se ha descrito anteriormente la síntesis de MMAE (1a) (Doronina *et al.*, Nat Biotechnol 21:778-84 (2003)).

Monometil Auristatina F (MMAF): se prepararon los intermedios para la síntesis de MMAF (1b) en Albany Molecule Research, Inc (Albany, NY). Se ha descrito anteriormente la síntesis de MMAF (1b) (Doronina *et al.*, Bioconjug Chem. 17(1):114-124 (2006); y la publicación de patente de Estados Unidos 2005-0238649.

Carbonato de MMAF (8) A una mezcla de carbonato de *p*-nitrofenilo 7 (30 mg, 0,033 mmol) y monometil auristatina F (MMAF) (1b; 29 mg, 0,039 mmol) se añadió DMF (0,8 ml) y piridina (0,2 ml). (se ha descrito anteriormente la síntesis de MMAF (Doronina *et al.*, Bioconjug Chem. 17(1):114-124 (2006); y la publicación de patente de Estados Unidos 2005-0238649. se añadió DIPEA (7 μ l, 0,04 mmol) seguido por HOAt (1 mg, 7 μ mol). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión reducida y se cromatografió sobre una placa Chromatotron de 1 mm, eluyendo con metanol del 1 al 5 % en un gradiente de diclorometano que contenía ácido acético al 1 %. La banda UV final activa (254 nm) para eluir era el producto. Esto proporcionó el 44 % (22 mg) de 8 como un material sólido. El material se llevó adelante sin caracterización adicional.

Glucurónido amina de MMAF: A una mezcla del carbamato de MMAF (22 mg, 0,015 mmol) en metanol (1 ml) a 0 °C se añadió una solución de LiOH monohidratado (5,5 mg, 0,132 mmol) en agua (1 ml). La mezcla se agitó durante 15 min a 0 °C y la mezcla de reacción se neutralizó utilizando ácido acético (8 μ l) y se concentró a presión reducida: CL-EM m/z (ES^-), 1364,09 ($\text{M}-\text{H}$) $^+$, 9,78 min.

El material resultante se disolvió en DMF (0,8 ml) y se trató con piperidina (0,2 ml). La mezcla se agitó durante 5 min y se concentró a presión reducida. El material se capturó en agua y se purificó mediante HPLC preparativa para dar 12 mg (72 %) como un sólido blanco: RMN ^1H (CD_3OD) δ 0,52 (d), 0,59 (d), 0,75-1,1 (m), 1,1-1,35 (m), 1,32-1,67 (m), 1,70-2,10 (m), 2,15-2,50 (m), 2,83-3,05 (m), 3,11 (s), 3,15-3,42 (m), 3,45-3,68 (m), 3,85 (m), 3,95 (m), 4,00-4,18 (m), 4,19-4,30 (m), 4,50-4,97 (m), 5,00-5,20 (m), 7,09-7,29 (m), 7,65 (d), 7,75 (d), 7,82 (d), 7,88 (d), 8,18 (d), 8,25 (m), 8,35 (d), 8,40 (d), 8,59 (d); CL-EM m/z (ES^-), 1144,66 ($\text{M}-\text{H}$) $^+$.

Glucurónido maleimida de MMAE (9a): Se preparó el compuesto 9a de una manera idéntica a 9b (posteriormente) comenzando con MMAE (1a) y el compuesto 7. Se obtuvo el compuesto 9a como un sólido de color blanco: RMN ^1H (CD_3OD); δ 0,64-1,01 (m, 24H), 1,12 (t, J = 6,9 Hz, 3H), 1,16 (d, J = 6,5 Hz, 1H), 1,23 (m, 1H), 1,4 (m, 1H), 1,45-1,63 (m, 5H), 1,67-1,98 (m, 2H), 2,19 (m, 3H), 2,42-2,54 (m, 1H), 2,63 (m, 2H), 2,96 (m, 4H), 3,1 (s, 2H), 3,12-3,39 (m, 3H), 3,40-3,73 (m, 9H), 3,85-3,96 (m, 1H), 4,04 (m, 1H), 4,13-4,27 (m, 2H), 4,52 (m, 1H), 4,59-4,68 (m, 2H), 4,65-5,0 (m, 2H), 5,0-5,17 (m, 2H), 6,78 (s, 2H), 7,09 (m, 1H), 7,20 (m, 3H), 7,3 (m, 3H), 7,38 (d, J = 7,6 Hz, 3H), 7,75-8,01 (m, 2H), 8,26 (d, J = 9,0 Hz, 1H), 8,32 (m, 1H); CL-EM m/z (ES^+) 1323,01 ($\text{M}+\text{H}$), 6,88 min; HRMS m/z para $\text{C}_{66}\text{H}_{97}\text{NaO}_{20}\text{Na}_2$ ($\text{M}-\text{H}+2\text{Na}$) $^+$ calculado, 1367,6615; encontrado, 1367,6616.

Glucurónido maleimida de MMAF (9b): A una mezcla de la amina (12 mg, 0,011 mmol) en DMF (1 ml) se añadió MC-OSu (10; 5,2 mg) seguido por DIPEA (6 μ l). Después de 15 min, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se disolvió en una mezcla de agua y DMSO (1:1; 1 ml) y se purificó mediante HPLC preparativa. Esto proporcionó 9,4 mg (64 %) de 9b en forma de un sólido de color blanco: RMN ^1H (CD_3OD) δ 0,66-1,05 (m, 22H), 1,10-1,27 (m, 9H), 1,33-1,43 (m, 2H), 1,44-1,62 (m, 6H), 1,66-2,05 (m, 5H), 2,15-2,35 (m, 4H), 2,40-2,50 (m, 2H), 2,60-2,68 (m, 2H), 2,84-2,98 (m, 9H), 3,10 (s, 2H), 3,22 (s, 2H), 3,25-3,68 (m, 12H), 3,85 (dd, J = 8,6, 2,0 Hz), 3,93 (d, J = 10 Hz), 4,05 (m, 1H), 4,13 (m, 1H), 4,22 (c, J = 10 Hz), 4,48-4,58 (m, 1H), 4,63-4,75 (m, 2H), 4,81 (d, J = 7,8 Hz, 2H), 5,02-5,17 (m, 3H), 6,77 (s, 2H), 7,10 (m, 1H), 7,15-7,29 (m, 8H), 7,82-8,01 (m, 2H), 8,16 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,35 (m, 1H); CL-EM m/z (ES^+), 1337,03 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 8,50 min; HRMS m/z para $\text{C}_{66}\text{H}_{95}\text{NaO}_{21}\text{Na}_2$ ($\text{M}-\text{H}+2\text{Na}$) $^+$ calculado, 1381,6407; encontrado, 1381,6428.

4-(terc-butildifenilsililoxi)butan-1-ol: A una solución de 1,4-butanodiol se añadió hidruro de sodio 1,0 g de una dispersión al 60 % en aceite mineral). Esta mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 h, antes, se añadió TBDPSCI (5,0 ml, 18,2 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió en agua y se extrajo con éter (3 x 100 ml). El extracto combinado se lavó con agua y salmuera y se secó con sulfato de sodio. Los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera y se secaron con sulfato de sodio. La filtración y la concentración proporcionó un residuo oleoso, que se purificó mediante cromatografía radial sobre una placa de 4 mm eluyendo con acetato de hexilo al 25 % en hexanos, seguido por acetato de etilo al 50 %

en hexano. Esto proporcionó 3,36 g (56 %) del producto deseado como un aceite transparente. RMN ^1H (CDCl_3); δ 1,24 (s, 9H), 1,65 (m, 4H), 3,65 (m, 4H), 7,40 (m, 6H), 7,64 (d, 2H, $J = 1,5$ Hz).

4-(terc-butildifenilsililo)butanal: A una solución del 4-(terc-butildifenilsililo)butan-1-ol (0,5 g, 1,5 mmol) en diclorometano (20 ml) se añadió peryodinano de Dess-Martin (775 mg, 1,83 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se vertió en hexanos y el precipitado de color blanco resultante se eliminó mediante filtración. La solución se concentró en forma de una suspensión, que se disolvió en diclorometano (5 ml) y se vertió de nuevo en hexanos dando como resultado en la precipitación un sólido de color blanco. Los sólidos se eliminaron mediante filtración y la solución resultante se concentró. Esto proporcionó 475 mg (97 %) de un aceite transparente: RMN ^1H (CDCl_3); δ 1,04 (s, 9H), 1,89 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 3,69 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz), 7,38 (m, 6H), 7,63 (d, 4H, $J = 1,7$ Hz), 9,79 (t, 1H, $J = 1,8$ Hz).

2-(3-(terc-butildifenilsililo)propil)oxazolidina (12): Se añadió gota a gota una mezcla del 4-(terc-butildifenilsililo)butanal (235 mg, 0,72 mmol) en benceno (3 ml) a una solución de hidroxietilamina (44 μl , 0,72 mmol) en benceno (3 ml). Se añadieron tamices moleculares en polvo (4 Å, 600 mg) y se agitó la mezcla durante 1,5 h, antes de filtrarse a través de un filtro de jeringa Millipore de 20 μm y se concentraron. Esto proporcionó **12**, que se usó directa e inmediatamente en la síntesis de **13** (posteriormente): RMN ^1H (C_6D_6); δ 1,18 (s, 9H), 1,65-1,82 (m, 2H), 2,62 (m, 2H), 3,33 (dd, 3H, $J = 6,1, 7,5$ Hz), 3,69 (t, 3H, $J = 6,1$ Hz), 4,26 (t, 1H), 7,23 (dd, 6H, $J = 1,9, 3,1$ Hz), 7,79 (m, 4H).

2-(3-(terc-butildifenilsililo)propil)oxazolidina-3-carboxilato de 3-(3-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)propanamido)-4-((2S,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)-tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)bencilo (13): Al alcohol bencilico (50 mg, 0,067 mmol) en diclorometano (10 ml) se añadió piridina (63 μl , 0,8 mmol). La mezcla se enfrió a -78°C y se añadió difosgeno (16 μl , 0,134 mmol). La mezcla se agitó durante 1 h. Se añadió la oxazolidina **12** (formada a partir de 65 mg de 4-(terc-butildifenilsililo)butanal) como una solución de diclorometano (3 ml) gota a gota por la pared interior enfriada del matraz de reacción. La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente a -20°C durante varias horas. La mezcla de reacción se vertió en acetato de etilo y se lavó con una solución saturada acuosa de bicarbonato de sodio, agua y salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato sódico, se filtró y se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía radial eluyendo con diclorometano. La banda activa UV mayor (254 nm) se recogió y concentró para dar 54 mg (70 %) de **13**: RMN ^1H (d_6 -DMSO); δ 0,95 (s, 9H), 1,55 (m, 2H), 1,63 (m, 1H), 1,82 (m, 1H), 1,98 (m, 9H), 2,4-2,52 (m, 2H), 3,27 (m, 2H), 3,54-3,66 (m, 6H), 3,70 (q, 1H, $J = 10,0$ Hz), 3,98 (m, 1H), 4,20 (m, 1H), 4,26 (m, 3H), 4,70 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz), 4,90-5,10 (m, 4H), 5,16 (t, 1H, $J = 9,6$ Hz), 5,48 (t, 1H, $J = 9,4$ Hz), 5,57 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,0-7,15 (m, 3H), 7,29 (m, 2H), 7,36-7,45 (m, 8H), 7,57 (d, 4H, $J = 7,2$ Hz), 7,66 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz), 7,86 (d, 3H, $J = 7,6$ Hz), 8,75 (m, 1H); CL-EM m/z (ES^+), 1143,88 ($\text{M}+\text{H}^+$), 13,76 min.

2-(3-hidroxipropil)oxazolidina-3-carboxilato de 3-(3-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)propanamido)-4-((2S,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)-tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)bencilo: A una mezcla del silil éter **13** (52 mg, 0,042 mmol) en THF (2 ml) y piridina (2 ml) se añadió complejo de HF-piridina (400 μl). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h y se vertió en solución saturada acuosa de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Los extractos combinados se lavaron con agua y salmuera y se secaron con sulfato de sodio, antes de filtrarse y concentrarse. El aceite resultante se purificó mediante cromatografía radial sobre 1 placa eluyendo con metanol al 5 % en diclorometano para dar 36 mg (86 %) de un residuo sólido: RMN ^1H (CD_3OD); δ 1,55 (bs, 2H), 1,68 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,95 (s, 3H), 2,01 (m, 6H), 2,67 (oct, 2H, $J = 6,8$ Hz), 3,30 (m, 1H), 3,50 (m, 3H), 3,65 (m, 1H), 3,69 (m, 3H), 3,82 (q, 1H, $J = 8,0$ Hz), 4,01 (m, 1H), 4,23 (m, 1H, $J = 7,0$ Hz), 4,25-4,40 (m, 2H), 4,47 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz), 5,0-5,15 (m, 3H), 5,19 (t, 1H, $J = 9,8$ Hz), 5,28 (dd, 1H, $J = 6,0, 9,6$ Hz), 5,39 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 5,49 (m, 3H), 7,11 (m, 2H), 7,17-7,32 (m, 3H), 7,34 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz), 7,62 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz), 7,77 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz), 8,07 (s, 1H); CL-EM m/z (ES^+), 927,87 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 9,79 min.

2-(3-oxopropil)oxazolidina-3-carboxilato de 3-(3-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)propanamido)-4-((2S,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)-tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)bencilo (14): A una solución del alcohol (36 mg, 0,04 mmol) en diclorometano (3 ml) se añadió peryodinano de Dess-Martin (20 mg, 0,048 mmol). Después de 1 h, se añadió una cantidad adicional del reactivo de Dess-Martin (20 mg) y se agitó la mezcla de reacción durante 1 h más. La mezcla de reacción se aspiró sobre una placa Chromatotron radial de 1 mm y se eluyó con metanol al 5 % en diclorometano. Esto proporcionó un rendimiento cuantitativo (36 mg) del aldehído **14**: RMN ^1H (d_6 -DMSO); δ 1,89 (s, 3H), 1,91 (m, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,98 (s, 3H), 2,41 (m, 1H), 3,27 (m, 2H), 3,75 (m, 1H), 3,61 (s, 3H), 3,77 (q, 1H, $J = 7,8$ Hz), 3,95 (m, 1H), 4,15-4,30 (m, 3H), 4,71 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz), 4,97-5,13 (m, 4H), 5,16 (dd, 1H, $J = 7,8, 9,9$ Hz), 5,45 (t, 1H, $J = 9,6$ Hz), 5,58 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz), 7,05 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz), 7,12 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz), 7,29 (dd, 2H, $J = 5,3, 7,4$ Hz), 7,39 (t, 2H, $J = 7,4$ Hz), 7,67 (d, 2H, $J = 5,4$ Hz), 8,77 (s, 1H), 9,57 (s, 1H), 11,97 (s, 1H); CL-EM m/z (ES^+), 903,96 ($\text{M}+\text{H}^+$), 10,48 min.

2-(3-(3-hidroxi-2-metil-6-((3S)-3,5,12-trihidroxi-3-(2-hidroxiacetil)-10-metoxi-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahidrotetracen-1-iloxi)-tetrahydro-2H-piran-4-ilamino)propil)oxazolidina-3-carboxilato de 3-(3-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)propanamido)-4-((2S,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-triacetoxi-6-(metoxicarbonil)-tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)bencilo (16): Al aldehído **14** (36 mg, 0,04 mmol) en una mezcla de acetonitrilo y agua (2:1; 4,5 ml total) a 0°C se añadió doxorubicina-HCl (15) seguida de agitación hasta que todos los sólidos se hubieron disueltos. La

mezcla se trató con una solución de cianoborohidruro de sodio (solución 1,0 M en THF; 20 µl, 0,02 mmol)). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h y la mezcla se vertió sobre agua y se extrajo repetidamente con diclorometano (5 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua y salmuera y se concentraron a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en metanol al 5 % en diclorometano y se aspiró directamente en una placa radical Chromatotron de 1 mm y se eluyó con metanol al 20 % en disolvió en diclorometano. La primera banda principal se recogió para dar 23,6 mg (41 %) de **16**: RMN ¹H (d6-DMSO); δ 1,14 (d, 3H, J = 6,5 Hz), 1,36-1,60 (b, 2H), 1,62-1,78 (b, 2H), 1,97-1,99 (m, 9H), 2,14 (b, 3H), 2,95 (s, 3H), 3,18-3,32 (m, 2H), 3,52 (b, 1H), 3,60 (s, 3H), 3,75 (q, 1H, J = 6,8 Hz), 4,95 (s a, 1H), 3,96 (s, 3H), 4,09 (b, 1H), 4,17 (t, 1H, J = 6,5 Hz), 4,25 (d, 2H, J = 6,1 Hz), 4,54 (d, 2H, J = 6,3 Hz), 4,70 (d, 1H, J = 10,0 Hz), 4,86 (t, 1H, J = 5,9 Hz), 4,92-5,07 (m, 3H), 5,15 (t, 1H, J = 8,2 Hz), 5,25 (s a, 1H), 5,04 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 5,48 (t, 1H, J = 10,0 Hz), 5,55 (d, 1H, J = 8,0 Hz), 7,0-7,11 (m, 2H), 7,28 (m, 2H), 7,37 (t, 3H, J = 7,3 Hz), 7,65 (d, 3H, J = 7,0 Hz), 7,85 (d, 2H, J = 7,6 Hz), 8,75 (a, 1H); CL-EM *m/z* (ES⁻), 1428,9 [M-H]⁻, 7,9 min.

ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-aminopropanamido)-4-((2-(3-(3-hidroxi-2-metil-6-((3S)-3,5,12-trihidroxi-3-(2-hidroxiacetil)-10-metoxi-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahidrotetracen-1-iloxi)-tetrahidro-2H-piran-4-ilamino)propil)oxazolidina-3-carboniloxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxi-tetrahidro-2H-piran-2-carboxílico: A una mezcla a 0 °C de la doxorubicina oxazolidina **16** (30 mg, 0,021 mmol) en metanol (4 ml) se añadió una solución de monohidrato de LiOH (8,8 mg, 0,21 mmol) en agua (2 ml). La mezcla se agitó durante 35 min y se neutralizó con ácido acético (8 µl, 0,21 mmol) hasta un pH de aproximadamente 7. La mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo que se disolvió en DCM (4 ml) y se trató con piperidina (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 5 min, antes de concentrarse a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa para proporcionar 6,1 mg (27 %) de producto: CL-EM *m/z* (ES⁺), 1069,13 (M+H)⁺, 5,64 min.

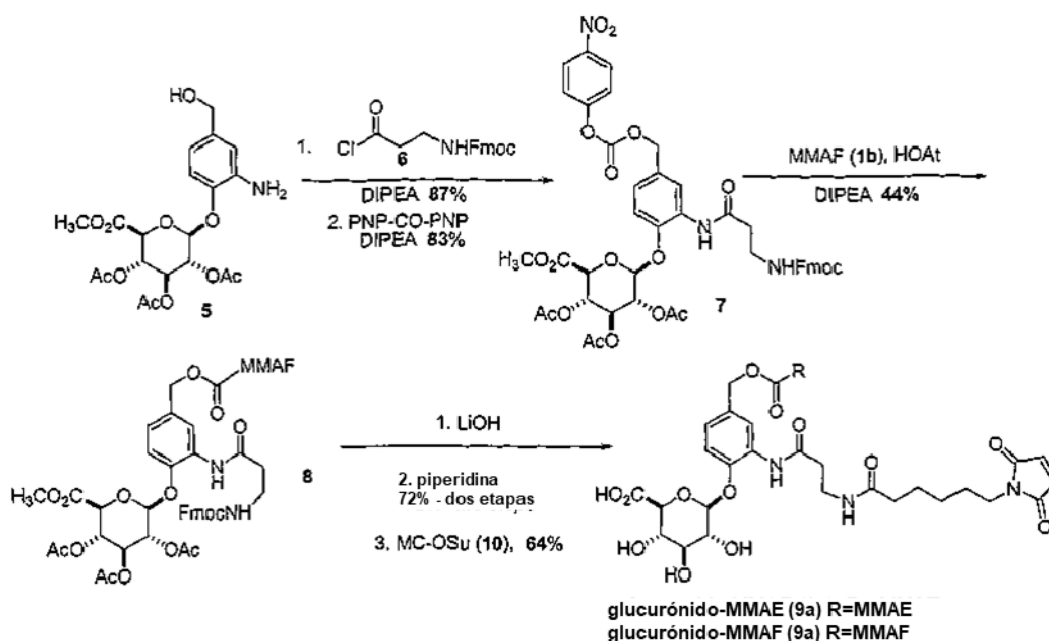
ácido (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-(3-(6-(2,5-dioxo-2H-pirrol-1(5H)-il)hexanamido)propanamido)-4-((2-(3-(3-hidroxi-2-metil-6-((3S)-3,5,12-trihidroxi-3-(2-hidroxiacetil)-10-metoxi-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahidrotetracen-1-iloxi)-tetrahidro-2H-piran-4-ilamino)propil)oxazolidina-3-carboniloxi)metil)fenoxi)-3,4,5-trihidroxi-tetrahidro-2H-piran-2-carboxílico (17): A una mezcla de la amina (**6**, 6,1 mg, 5,7 µmol) en DMF (0,2 ml) se añadió MC-OSu (**10**; 4 mg, 14 µmol) seguido por DIPEA (3 µl, 17 µmol). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y a continuación se disolvió en una mezcla de agua y DMSO (1:1,2 ml). La mezcla se purificó mediante HPLC preparativa en fase invertida para proporcionar 2,1 mg (26 %) de **17** en forma de un sólido rojo: RMN ¹H (CD₃OD); δ 1,1-1,25 (a, 2H), 1,29 (d, 3H, J = 6,6 Hz), 1,35-1,62 (a, 3H), 1,65-1,90 (b, 3H), 2,02-2,13 (m, 4H), 2,67 (s, 4H, impureza de N-hidroxi succinimida), 3,00-3,10 (m, 4H), 3,41-3,57 (m, 3H), 3,57-3,70 (m, 3H), 3,81 (m, 2H), 3,94 (d, 1H, J = 9,6 Hz), 4,02 (b, 1H), 4,05 (s, 3H), 4,29 (q, 1H, J = 7,0 Hz), 4,71 (s, 3H), 4,73 (m, 1H), 5,06 (m, 1H), 5,12 (b, 1H), 5,49 (s, 1H), 6,78 (s, 2H), 6,82-7,09 (b, 2H), 7,57 (d, 1H, J = 6,4 Hz), 7,84 (t, 1H, J = 7,4 Hz), 7,95 (ds, 1H, J = 7,4 Hz), 8,08 (s a, 1H); CL-EM *m/z* (ES⁻), 1260,24 [M-H]⁻, 6,49 min.

Ejemplo 2 - Síntesis de enlazadores basados en ácido β-glucurónico y conjugados de anticuerpo-fármaco

Enlazadores de fármacos que utilizan una unidad enlazadora basada en glucurónido con los agentes antimetabólicos monometil auristatina E (MMAE; **1a**) y monometil auristatina F (MMAF; **1b**) y doxorubicina propiloxazolina (DPO; **2**) se prepararon y se evaluaron.

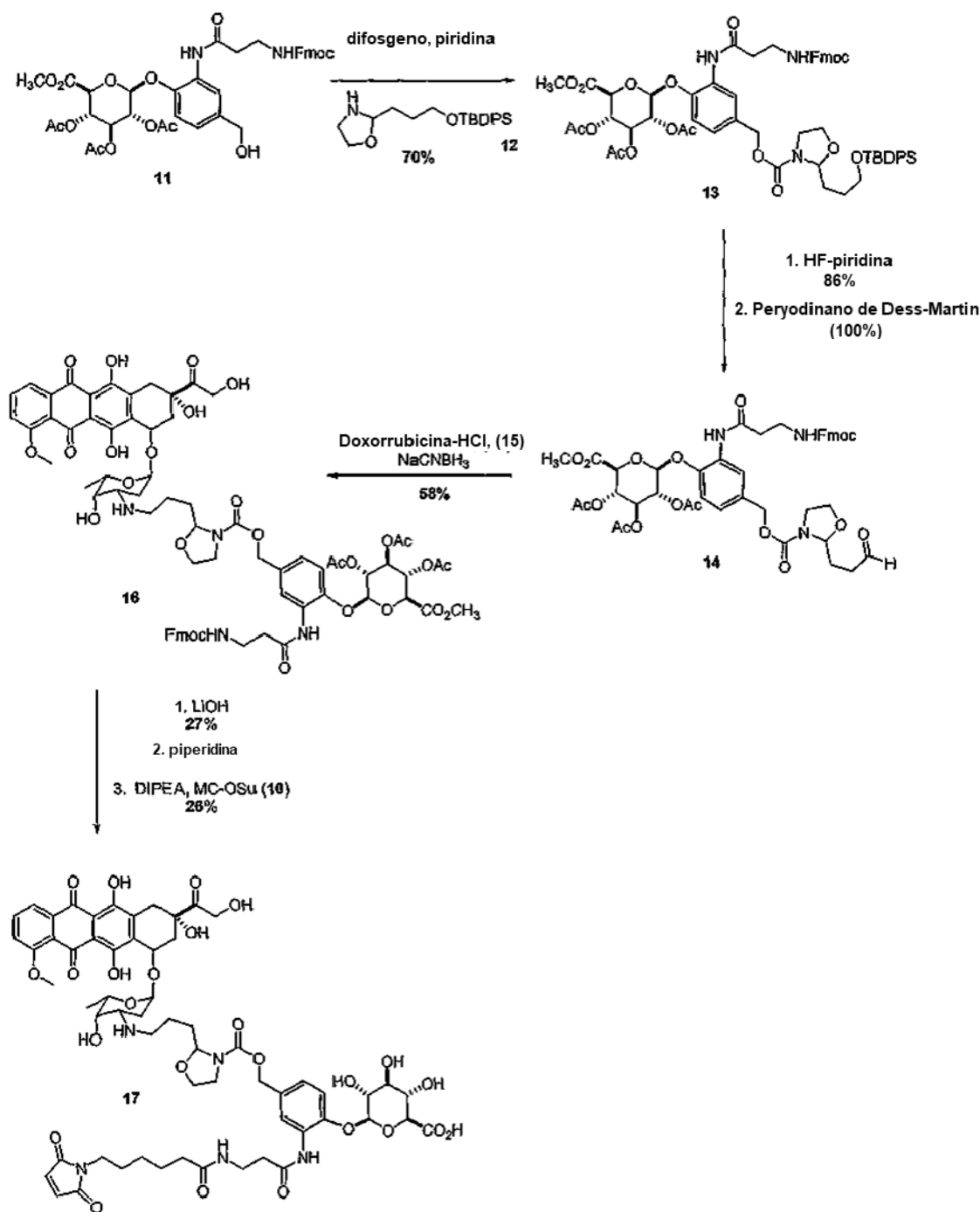
Preparación de un enlazador de fármaco de β-glucurónido: El punto de partida de la síntesis de un enlazador de fármaco de β-glucurónido con MMAF (**1b**) fue β-glucurónido **5** que tiene grupos anilina e hidroxi libres (Esquema 3, más adelante). Este compuesto se aciló con el cloruro de ácido **6**, y después se convirtió en el carbonato de p-nitrofenilo (PNP) **7**. La reacción con MMAF (**1b**) da como resultado el carbamato **8**. Esta molécula se convirtió en el enlazador de fármaco de glucurónido **9b** deseado saponificando en primer lugar los grupos protectores de acetato y éster de metilo con hidróxido de litio (Leenders *et al.*, 1999, Bioorg. Med. Chem. 7:1597-610), la eliminación de Fmoc con piperidina y la protección de la amina libre resultante con éster maleimidocaproil N-hidroxisuccinimidilo (MC-OSu; **10**). Una purificación final mediante HPLC preparativa proporcionó **9b**. El enlazador de fármaco de glucurónido-MMAE (**9a**) se preparó de una forma idéntica a partir de **5** y **1a**.

Esquema 3



La construcción de la unidad enlazadora basada en glucurónido con DPO (2) implicó una estrategia diferente (Esquema 4). El intermedio 11 se activó con difosgeno y a continuación se hizo reaccionar con oxazolina **12** (preparada en 3 etapas a partir de 1,4-butano diol) para dar el carbamato de oxazolina **13** deseado. La eliminación del grupo protector de sililo con fluoruro fue seguida de la oxidación para dar el aldehído **14**. Este compuesto se usó en una reacción de alquilación reductora con doxorrubicina-HCl (**15**) para dar el derivado de doxorrubicina **16**. Por último, los grupos protectores de β -glucurónido y el grupo Fmoc se eliminaron en una secuencia de 2 pasos con hidróxido de litio y piperidina, y la amina primaria resultante se protegió con **10** para dar el enlazador de β -glucurónido DPO **17** deseado.

Esquema 4



Preparación de ADC. Los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de los conjugados de enlazador-fármaco **9a** (con MMAE), **b** (con MMAF) t **17** (con doxorrubicina propiloxazolona (DPO)) se prepararon con los mAb quiméricos AC10 (IgG1 contra el antígeno CD30; (Wahl *et al.*, 2002, Cancer Res. 62:3736-42) y 1F6 (IgG1 contra el antígeno CD70; véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional WO 04/073656). Los anticuerpos se prepararon según un método anteriormente descrito (véase Doronina *et al.*, 2003, Nat. Biotechnol. 21:778-84).

Los mAb (>5 mg/ml) en suero salino tamponado con fosfato (PBS) que contenía borato de sodio 50 mM, pH 8,0, se trataron con ditiotretol (DTT) o clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (a 10 mM final) a 37 °C durante 30 min. Tras la filtración en gel (G-25, PBS que contenía DTPA 1 mM), la determinación de tiol usando 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) indicó que quedaban aproximadamente 8 tioles por mAb (4 tioles por mAb con TCEP). Al mAb reducido a 4 °C se añadió el derivado del fármaco maleimida (1,2 equiv./grupo SH) en DMSO enfriado en hielo (20 % v/v). Después de 1 h, las reacciones se inactivaron con exceso de cisteína, los conjugados se concentra mediante

ultrafiltración centrífuga, se filtraron en gel (G-25, PBS) y se filtraron a esterilidad. La relación molar de la sustitución del fármaco se determinó según los métodos anteriormente publicados (Hamblett *et al.*, 2004, Clin. Cancer Res. 10:7063-70; Sun *et al.*, 2005, Bioconjug. Chem. 16:1282-90). Se usó HPLC de exclusión molecular para determinar el monómero de cada conjugado, y la RP-HPLC determinó que quedaba menos del 0,5 % de fármaco sin conjugar inactivado con cisteína.

La carga de fármaco en los conjugados que contienen doxorubicina cAC10-17 y c1F6-17 se determinó midiendo la absorbancia 280 nm y 490 nm (absorbancia de la doxorubicina). Se ha descubierto que los ADC cAC10 t c1F6 tenían 6,8 y 8,3 fármacos/mAb, respectivamente. Debido a la baja absorbancia UV de los enlazadores de fármaco 9a y 9b, las relaciones de fármaco a mAb de los correspondientes ADC se determinaron mediante resolución cromatográfica de las cadenas ligera y pesada para cada nivel de carga de fármaco (0-1 fármacos para las cadenas ligeras; 0-3 fármacos para las cadenas pesadas) y se calculó la carga global de las áreas del pico para cada nivel de carga (Hamblett *et al.*, anteriormente; Sun *et al.*, supra). Se mostró que los niveles eran 3,7 y 4,5 para cAC10-9a y c1F6-9a, y 7,6 y 7.0 para los conjugados cAC10-9b y c1F6-9b, respectivamente. Los seis ADC eran principalmente monoméricos, observándose un 2 % o menos de agregados en los conjugados basados en cAC10 y un 7 % o menos de agregados para los conjugados basados en c1F6.

Resultados. El sistema enlazador de β -glucurónido descrito se puede incluir como parte de un conjugado fármaco-anticuerpo (ADC). Bajo la acción de β -glucuronidasa (por ejemplo, una β -glucuronidasa lisosómica), el fármaco-enlazador se hidroliza en el enlace glucosídico y experimenta una eliminación 1,6 con pérdida de dióxido de carbono para liberar el conjugado de fármaco al sistema enlazador (véase el Esquema 1, anteriormente). Tres ADC basados en este diseño de enlazador emplearon los fármacos antimetabólicos MMAE (1a) y MMAF (1b) y doxorubicina propil oxazolina (DPO; 2), que es un precursor lábil de la potentísima 2-pirrolinodoxorubicina (4), como se muestra en el Esquema 2 (más arriba). El compuesto 4 afecta la apoptosis mediante alquilación del ADN bicatenario DNA (33).

Ejemplo 3 - reactividad β -glucuronidasa de *E. coli*

La susceptibilidad de los enlazadores de β -glucurónido a la escisión enzimática se determinó por tratamiento del aducto de cisteína del compuesto 9b con β -glucuronidasa. Una β -glucuronidasa comercialmente disponible de *E. coli* (EC 3.2.1.31) sustituyó la enzima humana en este estudio. Esto permitió la confirmación de que el fármaco deseado, MMAF (1b), se liberaba y que se formaban intermedios estables durante el proceso.

Reactividad β -glucuronidasa. En agua (90 μ l) se introdujo cisteína (12,5 μ l de una solución 0,1 mM) y tampón borato pH 9 (12,5 μ l de una solución 30 mM). Esto fue seguido por la adición de **9b** (10 μ l de una solución 10 mM en DMSO). La inspección mediante HPLC después de 5 min reveló la conversión completa a cys-**9b**. A 440 ml de PBS se añadió la solución de cys-**9b** (50 μ l; 40 nmol) seguida por una solución de *E.coli* β -glucuronidasa (Sigma: E.C. 3.2.1.31 Tipo IX-A; 10 μ l de una solución 1 mg/ml en PBS; 3,6 μ g, 13 pmol) y la mezcla de reacción se incubó a 37 °C. Se tomaron alícuotas (50 μ l) a t = 0, 25, 60 y 90 min y se analizaron mediante CL. Los resultados se basaron en el área bajo la curva (ABC) del cys-**9b** restante en cada punto temporal como porcentaje de la ACB para la cys-**9b** a t = 0.

Resultados. El ensayo de la β -glucuronidasa se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Se usó un ensayo de HPLC para vigilar la pérdida de cys-**9b** (MMAF) a 37 °C. La actividad específica de la β -glucuronidasa de *E. coli* en cys-**9b** fue 0,13 μ mol/min/mg. En referencia a la Figura 1, la escisión de β -glucurónido de cys-9b dio como resultado una eliminación 1,6 rápida de MMAF (1b) que se identificó mediante CL-EM. No se pudieron detectar mediante CL-EM intermedios fenólicos que no contuvieran MMAF. Así la eliminación 1,6 parece ser rápida.

En un estudio similar con cys-17 (con doxorubicina propiloxazolina (DPO)), el tratamiento con β -glucuronidasa proporcionó la 2-pirrolinodoxorubicina (4) di, como se confirmó mediante CL-EM. Los controles indicaron que ambas cys-9b y cys-17 eran estables en ausencia de β -glucuronidasa. Estos dos estudios demostraron que el enlazador es un sustrato de una enzima β -glucuronidasa y que el fármaco se libera rápidamente cuando se produce la hidrólisis de β -glucurónido.

Ejemplo 4 - Estabilidad en plasma de rata del enlazador-fármaco cys-9b

Para determinar la estabilidad en plasma del enlazador de glucurónido, el reactivo, el doble enlace de la maleimida en 9b (con MMAF) se redujo con un exceso de DTT para dar dihidro-9b. Este material se añadió a plasma de rata y se incubó a 37 °C durante un periodo de 7 días. Se tomaron alícuotas en varios momentos temporales, y las proteínas del plasma se precipitaron, se centrifugaron y el sobrenadante se recuperó. Cada sobrenadante se analizó mediante CL-EM y el cromatograma con la corriente total de iones positivos (TIC+) se analizó para determinar las masas del compuesto precursor dihidro-9b y MMAF (1b) liberado. Después de 7 días, el TIC+ del dihidro-9b (incluido el aducto de hidrólisis de la succinimida con apertura de anillo) fue un 89 % de la muestra tomada inmediatamente después de inyectar el dihidro-9b en el plasma. Se pudo detectar fármaco 1b libre pero no se pudo cuantificar. Suponiendo una cinética de primer orden, la extrapolación de estos datos sugiere una semivida de 81 días para dihidro-9b. En un experimento paralelo, se determinó la estabilidad en plasma de rata del MMAF unido a Val-Cit-PABA con maleimida reducida, análogamente a dihidro-9b. Este fármaco-enlazador presentó una semivida de 6,25

días.

Este estudio demostró la estabilidad mejorada del sistema enlazador de β -glucurónido con respecto a los sistemas basados en disulfuro e hidrazona, para los que se notificaron semividas más cortas para la liberación del fármaco.

Ejemplo 5 - Evaluación in vitro de agentes citotóxicos y ADC

Los conjugados enlazador-fármaco y compuestos ADC **9a** (con MMAE), **9b** (MMAF) y **17** (con doxorubicina propiloxazolona (DPO) con los mAb AC10 (IgG1 contra el antígeno CD30) y 1F6 (IgG1 contra el antígeno CD70) se prepararon. Los ADC (c1F6-9a y cAC10-9a, c1F6-9b y cAC10-9b, y c1F6-17 y cAC10-17) se evaluaron para la actividad citotóxica en una línea de células CD30+ (Karpas 299) y dos líneas de carcinoma de células renales CD70+ (RCC), 786-O y Caki-1.

Tabla 7. Caracterización y actividad citotóxica in vitro de los fármacos libres y los ADC

Compuesto	Antígeno diana	Fármaco activo	Carga de fármaco	% Agregación	Caki-1 (CD70+, CD30-) CI_{50} fármaco nM	786-O (CD70+, CD30-) CI_{50} fármaco nM	Karpas 299 (CD30+,CD70-) CI_{50} fármaco nM
1a	-	-	-	-	0,11	0,19	0,09
1b	-	-	-	-	270	300	100
15	-	-	-	-	110	65	29
18	-	4	-	-	0,04	0,01	0,1
c1F6- 9a	CD70	1a	4,5	2	0,45	-	>30
cAC10- 9a	CD30	1a	3,7	2	-	-	0,06
c1F6- 9b	CD70	1b	7	7	0,08	0,2	-
cAC10- 9b	CD30	1b	7,6	<1	>50	>50	0,05
c1F6- 17	CD70	4	8,3	3,5	2,0	2,7	>55
cAC10- 17	CD30	4	6,8	<1	>45	>45	1,2

^aLas células se expusieron a los agentes de ensayo durante 96 h y se determinó la viabilidad usando el metabolismo de la rezasurina como medida de la actividad citotóxica. Los valores de CI_{50} se determinaron en comparación con las células no tratadas.

ADC. Los ADC se prepararon como se ha descrito anteriormente.

Inhibición del crecimiento in vitro. Las células se recogieron y se sembraron en placas de 96 pocillos de laterales negros a una densidad de 10.000 células/pocillo en 150 μ l de medio. Se añadieron diluciones en serie del ADC (50 μ l), y la incubación se realizó durante 92 h a 37 °C. Tras la adición de ADC, los cultivos se incubaron 96 h a 37 °C. Resazurina (0,25 mM, 50 μ l, Sigma, St. Louis, MO) en medio se añadió a lo anterior, y la incubación continuó durante 4 h. Las placas se leyeron en un lector de microplacas Fusion HT (Packard, Meriden, CT) usando una longitud de onda de excitación de 525 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Los datos de todos los ensayos se redujeron con GraphPad Prism Versión 4 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Las concentraciones CI_{50} se compararon con las celdas de control sin tratar y se determinaron usando un ajuste de curva de 4 parámetros.

Resultados. La evaluación in vitro de MMAE (**1a**) y **18** (el profármaco lábil a esterasa de 2-pirrolinodoxorrubicina (**4**)) reveló que estos compuestos eran muy citotóxicos (por debajo de 0,2 nM) para las líneas celulares Caki-1 y 786-O CD70+ y para la línea celular Karpas 299 CD30+ (Tabla 7). El Compuesto **18** demostró ser 300-6500 veces más citotóxico que la doxorubicina (**15**), lo que es coherente con los hallazgos anteriores para esta clase de derivados de doxorubicina (Farquhar *et al.*, 1998, J. Med. Chem. 41:965-72). A diferencia de **1a** y **18**, el ácido carboxílico libre MMAF (**1b**) fue significativamente menos activo sobre estas líneas celulares, con valores de CI_{50} en el intervalo de 100-200 nM (Doronina *et al.*, 2006, Bioconjug Chem. 17(1):114-124). La carga negativa asociada con el grupo carboxilato de **1b** lleva a una actividad citotóxica reducida, supuestamente debida a un bajo acceso intracelular.

La evaluación in vitro de los conjugados cAC10 y c1F6 de **9a** demostró que el enlazador proporcionaba el fármaco activo a las células diana con especificidad inmunológica (Figura 2). Una comparación de la actividad de los dos conjugados en la línea Karpas 299 CD30+ (Figura 2A) reveló que el conjugado cAC10-**9a** anti-CD30 titulado con un valor de la CI_{50} de 0,06 nM (contenido de fármaco), donde el conjugado c1F6-9a sin unión no tenía actividad citotóxica hasta 30 nM, la mayor concentración analizada. El conjugado c1F6-9a anti-CD70 fue bastante potente en la línea celular Caki-1 CD70+ (CI_{50} 0,45 nM) (Figura 2C).

Los ADC de **9b** administraron eficazmente **1b** a las células diana. Los conjugados de 9b mostraron especificidad inmunológica y fueron muy eficaces contra las líneas Caki-1 y 786-O CD70+ (Figuras 2B y 2C, respectivamente) con

valores de Cl_{50} de 0,08 y 0,20 nM, respectivamente. El correspondiente cAC10-9b no unido fue inactivo sobre estas líneas, representando niveles de especificidad de >250 veces. El conjugado cAC10-9b anti-CD30 fue muy eficaz contra la línea Karpas 299 CD30+ con un valor de la Cl_{50} de 50 pM. Los conjugados del fármaco doxorubicina-enlazador 17 proporcionaron el mismo perfil general con una destrucción eficaz de líneas celulares positivas para el antígeno y valores de especificidad >16 veces.

Ejemplo 6 - Evaluación in vivo de cAC10-9a y c1F6-9b.

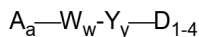
Para la evaluación in vivo, se seleccionaron dos ADC entre los derivados de auristatina 9a y 9b. Se determinó la máxima dosis tolerada (MTD) de cAC10-9a (4 fármacos/mAb) en ratones Balb/c hembra. cAC10-9a fue bien tolerado a 100 mg/kg, pero tóxico a 150 mg/kg. El conjugado c1F6-1b fue bien tolerado a 25 mg/kg, pero tóxico a la dosis de 50 mg/kg. Las MTD de los glucurónidos ADC por tanto parecen ser comparables a las de los correspondientes ADC unidos a péptido MMAE (Doronina *et al.*, 2003, Nat. Biotechnol. 21:778-84) y MMAF ((Doronina *et al.*, 2006, Bioconjug. Chem. 17(1):114-124) que se habían descritas anteriormente.

Se llevaron a cabo experimentos de tratamiento in vivo con cAC10-9a en ratones lampiños con tumores Karpas 299 ALCL subcutáneos. Los animales (5 por grupo) se trataron con una única dosis intravenosa de cAC10-9a a 0,5, 1,0 y 3 mg/kg (componente mAb) el día 14 después del implante tumoral, momento en que los tumores se estadificaron (media = 70 mm³) y crecieron rápidamente. La especificidad se determinó usando c1F6-9a como ADC de control sin unión que se inyectó en dosis de 3 mg/kg. Se obtuvieron curas para todos los animales tratados con cAC10-9a para cada nivel de los tres niveles de dosis (Figura 3A). Por el contrario, el ADF sin unión c1F6-9a no tuvo efecto antitumoral. Como la MTD de cAC10-9a es aproximadamente 100 mg/kg, el índice terapéutico fue >200 que es al menos tan notable como el del ADC MMAE basado en Val-Cit PABA anteriormente notificado (Doronina *et al.*, 2003, Nat. Biotechnol. 21:778-84).

Los efectos de c1F6-9b se determinaron en ratones con implantes de carcinoma de células renales 786-0 subcutáneo. Se obtuvieron niveles significativos de actividad antitumoral para los tres niveles de dosis (0,75, 1,5 y 3.0 mg/kg), de nuevo, sin ningún signo de toxicidad ni de eventos adversos (Figura 3B). Como para el ADC c1F6-9a, esto se consiguió para una pequeña fracción del MTD.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de conjugado de fármaco-enlazador que tiene la fórmula:



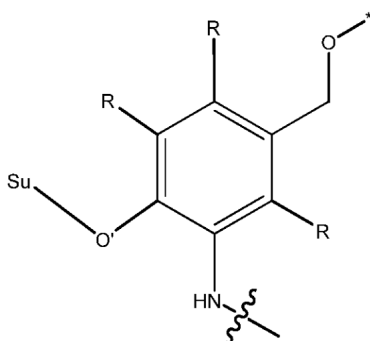
o una de sus sales o solvatos, en la que:

- $A_a-W_w-Y_y$ - es una unidad enlazadora (LU);

el subíndice a es 1 o 2;

A- es una unidad ensanchadora que tiene un resto maleimida capaz de formar un enlace covalente con un átomo de azufre de una unidad de ligando, en la que la unidad de ligando se selecciona del grupo que consiste en una proteína, un polipéptido y un péptido;

-W- es una unidad de glucurónido que tiene la fórmula:



Su es un resto de azúcar;

O'- representa un átomo de oxígeno de un enlace glucosídico que se puede escindir mediante una betaglucuronidasa;

cada R es, de forma independiente, hidrógeno, un halógeno, -CN o -NO₂;

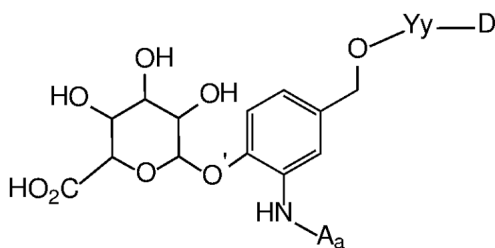
el subíndice w es 1,

Y- es una unidad separadora autoinmolable opcional,

el subíndice y es 0, 1 o 2; y

D es una unidad de fármaco; y

en donde la línea ondulada indica la unión covalente a la unidad ensanchadora y el asterisco indica enlace covalente a la unidad separadora autoinmolable opcional, si está presente, o a la unidad de fármaco si la unidad separadora autoinmolable opcional está ausente, en donde el compuesto de fármaco-enlazador tiene la fórmula

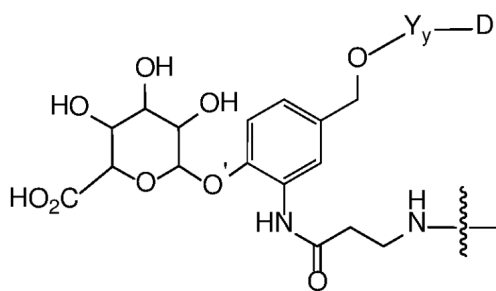


o una de sus sales o solvatos.

2. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de la reivindicación 1 o una de sus sales o solvatos, en el que la unidad de ligando con la que el grupo funcional de la unidad ensanchadora es capaz de formar un enlace covalente es un anticuerpo.

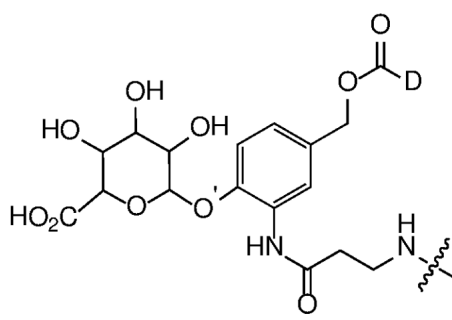
3. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de la reivindicación 2 o una de sus sales o solvatos, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, quimérico o humano o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno de un anticuerpo.

4. El compuesto de conjugado fármaco ligando de la reivindicación 1, que comprende la fórmula:



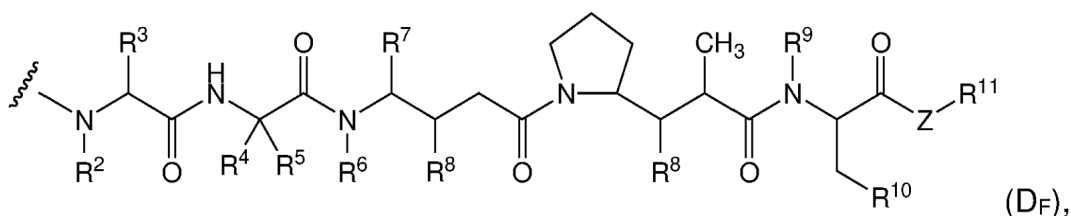
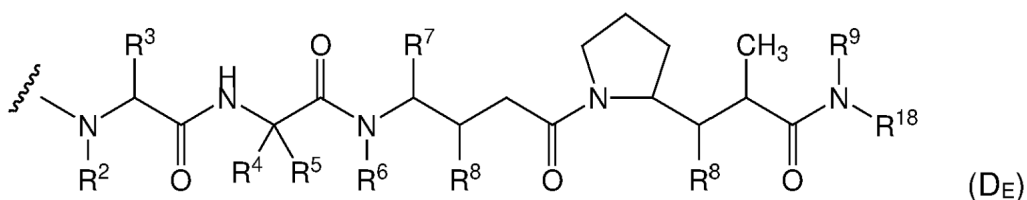
o una de sus sales o solvatos, en la que la línea ondulada indica la unión covalente a lo que queda de la unidad ensanchadora que es capaz de formar un enlace con una unidad de ligando, en donde la unidad de ligando es un anticuerpo.

5. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de la reivindicación 4 que comprende la fórmula:



o una de sus sales o solvatos, en la que la línea ondulada indica la unión covalente a lo que queda de la unidad ensanchadora que es capaz de formar un enlace con una unidad de ligando, en donde la unidad de ligando es un anticuerpo monoclonal.

6. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la unidad de fármaco tiene las Fórmulas D_E o D_F:



o una de sus sales o solvatos; y las líneas onduladas de D_F y D_E indican enlaces covalentes a la unidad enlazadora; en donde, independientemente en cada localización:

R² se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₈;

R³ se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo -C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y X¹-(heterociclo C₃-C₈);

R⁴ se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo -C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y X¹-(heterociclo C₃-C₈);

R⁵ se selecciona entre el grupo que consiste en H y metilo;

o R⁴ y R⁵ forman conjuntamente un anillo carbocíclico y que tiene la fórmula -(CR^aR^b)_n- en la que R^a y R^b se

seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₈ y carbociclo C₃-C₈ y n se selecciona entre el grupo que consiste en 2, 3, 4, 5 y 6;

R⁶ se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₈;

R⁷ se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo -C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈, arilo, X¹-arilo, X¹-(carbociclo C₃-C₈), heterociclo-C₃-C₈ y X¹-(heterociclo C₃-C₈);

cada R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, OH, alquilo -C₁-C₈, carbociclo C₃-C₈ y -O-(alquilo C₁-C₈);

R⁹ se selecciona entre el grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₈;

R¹⁰ se selecciona entre el grupo que consiste en arilo y heterociclo C₃-C₈;

Z es O, S, NH o NR¹², en donde R¹² es alquilo C₁-C₈;

R¹¹ se selecciona entre el grupo que consiste en H, alquilo -C₁-C₂₀, arilo, heterociclo C₃-C₈, -(R¹³O)_m-R¹⁴ y -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;

m es un número entero que varía entre 1-1000;

R¹³ es alquilo C₂-C₈;

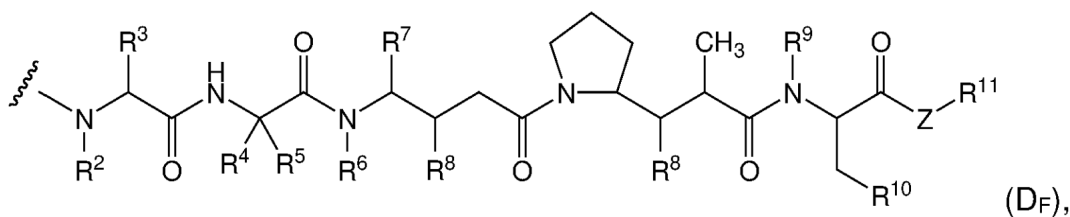
R¹⁴ es H o -alquilo (C₁-C₈);

en cada aparición R¹⁵ es, de forma independiente, H, COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H o -(CH₂)_n-SO₃-alquilo C₁-C₈;

en cada aparición R¹⁶ es, de forma independiente, H, alquilo C₁-C₈, o -(CH₂)_n-COOH;

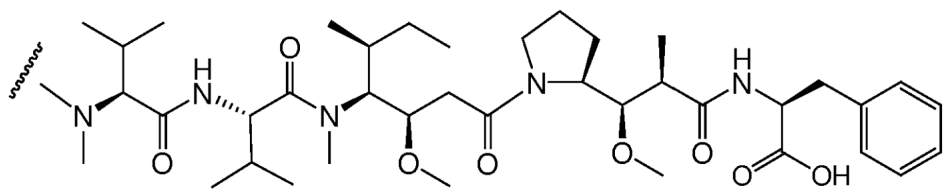
R¹⁸ se selecciona entre el grupo que consiste en -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-arilo, -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(heterociclo C₃-C₈), y -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(carbociclo C₃-C₈); y X¹- es alquilenos C₁-C₁₀; y n es un número entero comprendido entre 0 y 6.

7. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de la reivindicación 6 o una de sus sales o solvatos, en el que D tiene la Fórmula D_F:



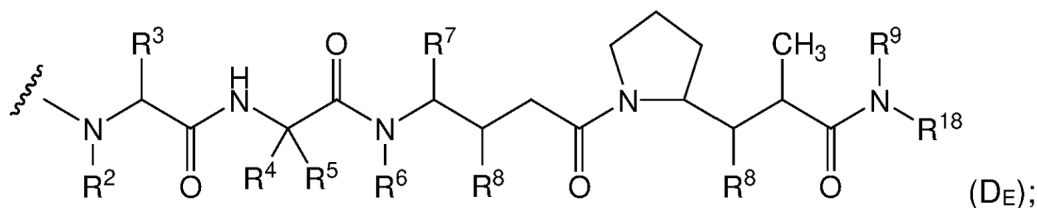
o una sal o solvato del mismo, en la que R²-R¹¹ mantiene sus significados anteriores y la línea ondulada de D_F indica un enlace covalente con la unidad enlazadora.

8. El compuesto de conjugado fármaco-enlazador de la reivindicación 6 o una de sus sales o solvatos, en el que D tiene la fórmula:



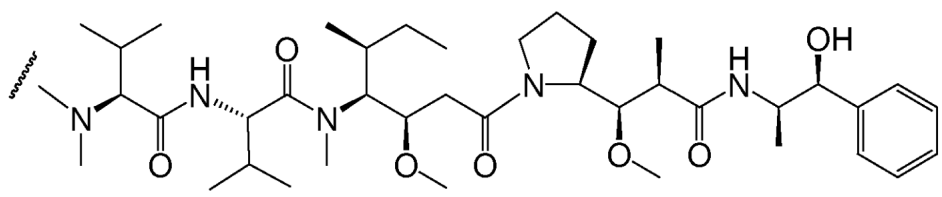
en la que la línea ondulada de D indica un enlace covalente con la unidad enlazadora.

9. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de la reivindicación 6 o una de sus sales o solvatos, en el que D tiene la Fórmula D_E:



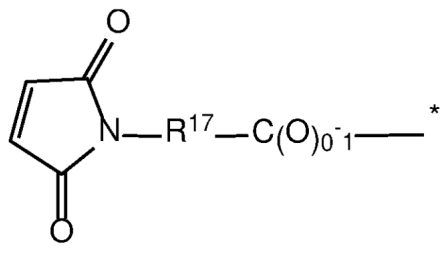
en la que R²-R¹¹ mantiene sus significados anteriores y la línea ondulada de D_E indica un enlace covalente con la unidad enlazadora.

10. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de la reivindicación 9, en el que D tiene la fórmula:



y la línea ondulada de D indica un enlace covalente con la unidad enlazadora.

- 5 11. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de la reivindicación 1 o una de sus sales o solvatos, en el que A tiene la fórmula



- 10 en la que R^{17} es alquileo C_1-C_{10} , -carbociclo C_3-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arileno-, -alquileo-arileno C_1-C_{10} , -arileno- C_1-C_{10} alquileo-, -alquileo C_1-C_{10} -(carbociclo C_3-C_8)-, -(carbociclo C_3-C_8)-alquileo C_1-C_{10} -, -heterociclo C_3-C_8 , -alquileo C_1-C_{10} -(heterociclo C_3-C_8)-, -(heterociclo C_3-C_8)-alquileo C_1-C_{10} -, $-(CH_2CH_2O)_r$, $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$; o $-(CH_2CH_2O)_r--CH_2CH_2-$ y el subíndice r es un número entero comprendido entre 1-10;

y en la que el asterisco indica la unión covalente a lo que queda de la unidad enlazadora.

- 15 12. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de la reivindicación 1 o una de sus sales o solvatos, en el que D es doxorubicina, caliqueamicina, estaurosporina, aglutinante de la ranura menor de amino CBI SN26597 o DM1.
- 20 13. El compuesto de conjugado de fármaco-enlazador de la reivindicación 1, en el que el subíndice y y el subíndice a son independientemente 1 o 2 o el subíndice y es 1 y el subíndice a es 1.

Figura 1

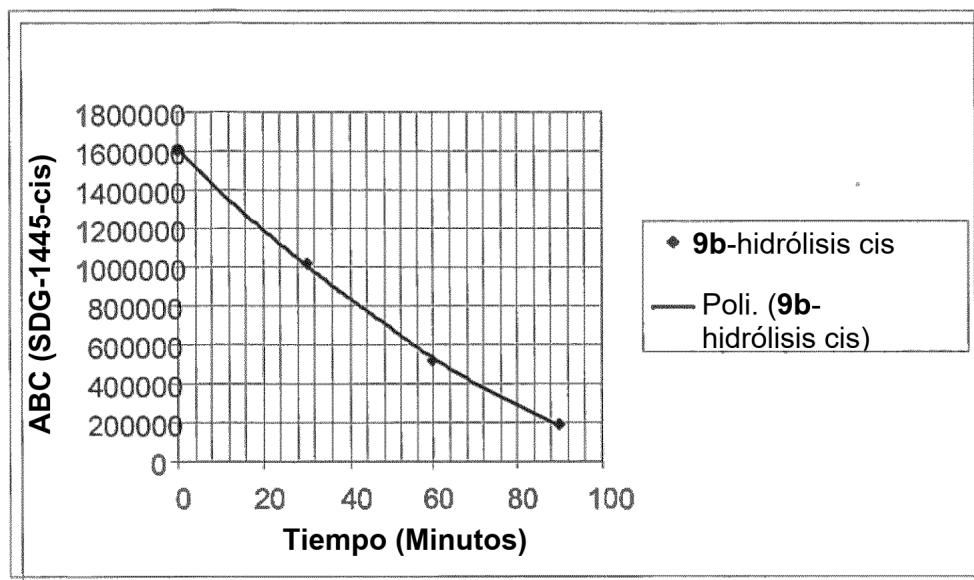


Figura 2

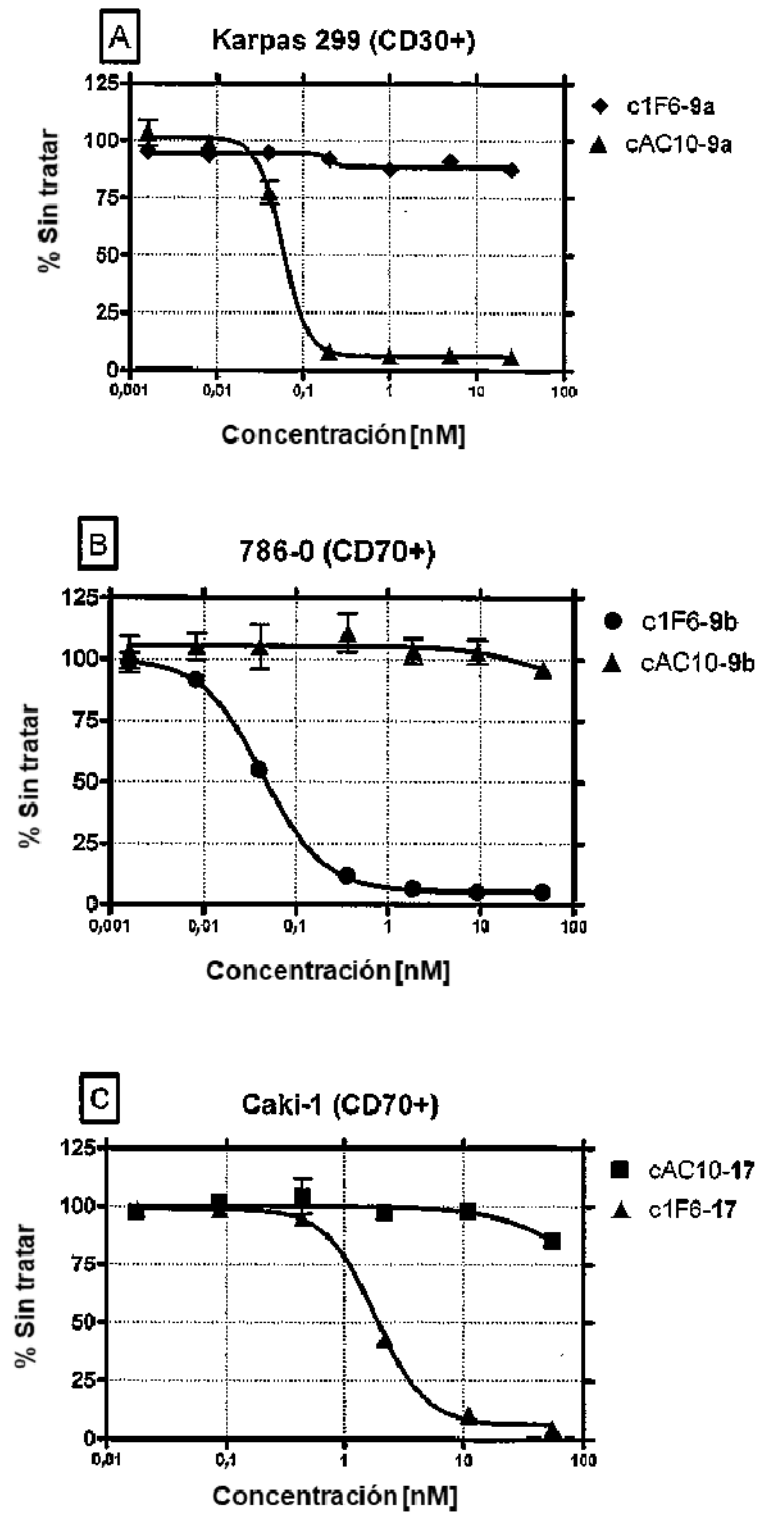


Figura 3.

