

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 916 873**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 31/522 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2015 PCT/CN2015/070379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15103989**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2015 E 15734849 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2022 EP 3092256**

54 Título: **Compuestos y composiciones para inmunoterapia**

30 Prioridad:

10.01.2014 CN 201410011324

10.01.2014 CN 201410011262

10.01.2014 CN 201410011362

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

06.07.2022

73 Titular/es:

**BIRDIE BIOPHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
Sertus Chambers, P.O. Box 2547, Cassia Court,
Camana Bay
Grand Cayman, KY**

72 Inventor/es:

LI, LIXIN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 916 873 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

Compuestos y composiciones para inmunoterapia

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de las Solicitudes de Patente Chinas con Núm. de Serie 201410011324.5, 201410011262.8, y 201410011362.0, todas presentadas el 10 de enero de 2014.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos para inmunoterapia dirigida, así como a composiciones que los comprenden. Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso de los compuestos en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Los anticuerpos terapéuticos se han utilizado en aplicaciones clínicas durante más de veinte años. Actualmente, existen quince fármacos de anticuerpos antitumorales en medicina clínica, incluidos Rituxan (1997), Herceptin (1998), Mylotarg (2000), Campath (2001), Zevalin (2002), Bexxer (2003), Avastin (2004), Erbitux (2004), Vectibix (2006); Arzerra (2009); Benlysta (2011); Yervoy (2011); Adcetris (2011); Perjeta (2012); y Kadcylla (2013). Estos anticuerpos se dirigen principalmente a cuatro moléculas: EGFR, Her2, CD20 y VEGF.

20 En general, los anticuerpos terapéuticos destruyen las células tumorales a través de tres mecanismos (Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. Nat Rev Cancer. (2012), 12 :278-87): (1) Acción directa de anticuerpos, es decir, actividad de bloqueo o agonística de la señalización de ligandos/receptores, inducción de apoptosis y suministro de fármacos o agentes citotóxicos. La actividad de activación del receptor de anticuerpos puede producir un efecto directo de destrucción de células tumorales. Por ejemplo, algunos anticuerpos pueden unirse a los receptores sobre la superficie de las células tumorales, activar el receptor y provocar la apoptosis (p. ej., en las mitocondrias). Los anticuerpos también pueden mediar la destrucción de células tumorales mediante la actividad antagonista del receptor. Por ejemplo, ciertos anticuerpos pueden unirse a los receptores de la superficie celular y bloquear la dimerización, la activación de la quinasa y la señalización aguas abajo, inhibiendo así la proliferación y promoviendo la apoptosis. La unión de anticuerpos a una enzima puede conducir a la neutralización, la anulación de la señal y la muerte celular. (2) A través de la destrucción de células mediada por el sistema inmunológico, los mecanismos incluyen la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la regulación de la función de las células T, etc. La destrucción de células tumorales mediada por el sistema inmunológico se puede completar a través de las siguientes vías: inducción de la fagocitosis, activación del complemento, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, células T genéticamente modificadas que se dirigen al tumor mediante un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), a través de la presentación cruzada antigénica mediada por anticuerpos a las células dendríticas para activar las células T, inhibición de los receptores inhibidores de células T, tales como el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4). De ellos, la porción Fc de la característica del anticuerpo es especialmente importante para el efecto de destrucción de células tumorales mediado por CDC y ADCC. (3) Efecto específico del anticuerpo sobre la vasculatura y la matriz del tumor, a través de la captura del antagonista del receptor vascular o del ligando para inducir la ablación de las células vasculares y del estroma, que incluye: inhibición de las células del estroma, suministro de toxinas a las células del estroma y suministro de toxinas a la vasculatura. (Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody Therapy of cancer. Nat Rev Cáncer. 2012, 12 (4): 278-87).

40 Los fármacos de anticuerpos monoclonales terapéuticos han avanzado en la investigación y el desarrollo de fármacos contra el cáncer. Sin embargo, aún se necesitan más estudios para resolver algunos problemas, tales como la inmunogenicidad de los anticuerpos, la tolerancia del uso a largo plazo de la diana tumoral y los efectos a largo plazo del bloqueo único simple de la vía de transducción de señales. En resumen, es difícil que una mayoría simple de anticuerpos logre una inhibición y destrucción eficientes a largo plazo de las células tumorales.

45 En 1964, la revista "Nature" presentó la nueva idea de la tecnología productos conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), que en los últimos años ha visto avances. El ADC conecta covalentemente el anticuerpo a un fármaco altamente tóxico (toxina) a través de un conector químico (conector). El anticuerpo reconoce la molécula de antígeno de la superficie de la célula cancerosa, la endocitosis del ADC la introduce al citoplasma y, en particular, las toxinas del entorno intracelular liberadas después de la hidrólisis del conector destruyen las células.

50 Seattle Genetics ha desarrollado el fármaco Brentuximab Vedotin (nombre comercial Adcetris) que ha sido aprobado por la FDA para su comercialización. Es monometil auristatina E (MMAE), un fármaco anticanceroso tóxico sintético, acoplado a un anticuerpo que se dirige a la molécula CD30 específica de las células de linfoma, con una eficacia mejorada para destruir las células tumorales.

55 Actualmente, existen más de docenas de tales fármacos ADC en pruebas clínicas. Entre ellos, Genentech e Immunogen desarrollaron conjuntamente trastuzumab acoplado a maitansinas como un fármaco denominado ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla), también conocido como T-DM1, para tratar el cáncer de mama. En febrero de 2013,

la FDA aprobó T-DM1 para el cáncer de mama metastásico positivo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2). La maitansina es una toxina de molécula pequeña que puede unirse a la tubulina y prevenir la formación de microtúbulos al formar un complejo dual no reductor - maleimida - propanodiol. Trastuzumab actúa sobre el cáncer de mama y el cáncer gástrico al dirigirse a Her2 humano. Fue aprobado para el cáncer positivo para Her2. Sin embargo, trastuzumab no puede promover la apoptosis de todas las células positivas para Her2. T-DM1 combina el trastuzumab selectivo que se dirige al receptor Her2 con el potente agente citotóxico maitansina para destruir las células tumorales. El anticuerpo T-DM1 se une a los receptores Her2, provocando la internalización celular de las maitansinas liberadas de los productos conjugados, lo que destruye las células tumorales. T-DM1 tiene mejor eficacia general y propiedades farmacocinéticas y baja toxicidad.

Los fármacos quimioterapéuticos tradicionales de molécula pequeña tienen una fuerte toxicidad y ventajas farmacocinéticas, pero en el proceso de tratamiento de tumores pueden afectar a otras dianas fisiológicas con efectos secundarios graves. Los productos conjugados de anticuerpo-fármaco combinan la función de direccionamiento y el fármaco de molécula pequeña con una farmacocinética particular. La estructura de los productos conjugados de anticuerpo-fármaco es el resultado de la unión de un anticuerpo monoclonal con función de direccionamiento a un compuesto con propiedades farmacológicas específicas. Esta técnica requiere que el anticuerpo terapéutico que tiene especificidad de unión a una diana, se acople a una molécula con efecto terapéutico u otras funciones tales como las citotoxinas. Muchos factores afectan al efecto de este tipo de anticuerpos, tales como la endocitosis del anticuerpo acoplado, la estabilidad del acoplamiento y la actividad de liberación y destrucción de las toxinas.

Las moléculas de toxina que se utilizan actualmente incluyen inhibidores de tubulina, análogos de auristatina, monometil auristatina E, monometil auristatina F y maitansina. La monometil auristatina E es un inhibidor de polímero de microtúbulos sintético que puede inhibir la agregación de microtúbulos, interferir en la mitosis de las células tumorales e inducir la apoptosis (Naumovski L y Junutula JR. Glembatumumab vedotin, a conjugate of an anti-glycoprotein non-metastatic melanoma protein B mAb and monomethyl auristatin E for treatment of melanoma and breast cancer. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 12 (2): 248-57. Franciso JA, Cervený CG et al. cAC10-vcMMAE, an anti-CD30 monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* 102 (4): 1458-65. La monometil auristatina F es un derivado de auristatina antimitótico con un resto de fenilalanina cargado en el extremo C terminal. En comparación con MMAE sin carga, minimiza el daño a la vía de señalización celular y minimiza la citotoxicidad. Una gran cantidad de pruebas con células CD30 encontraron que mAb-maleimidocaproil-valin-citrulin-p-aminobenciloxicarbonil-MMAF (mAb-L1-MMAF) tiene una toxicidad que es 2200 veces más fuerte que la de MMAF solo (Doronina SO et al., Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. *Bioconjug Chem*, 2006; 17 (1): págs. 114-24). La maitansina es un agente antimitótico que actúa como inhibidor de la polimerización de tubulina, interfiriendo así en la formación de microtúbulos en el núcleo celular. La maitansina también inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas, observándose el mayor efecto en la síntesis de ADN.

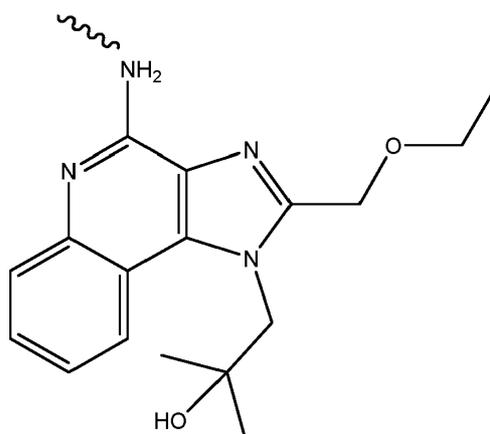
Los productos conjugados de anticuerpo-fármaco tienen un efecto anticanceroso directo e indirecto. El anticuerpo bloquea o activa la señalización del ligando/receptor, induce la apoptosis y, al mismo tiempo, puede presentar o suministrar la carga útil de fármaco directa o indirectamente (tal como un fármaco, toxina, ARN de interferencia pequeño o radioisótopo) a las células tumorales. El producto conjugado de anticuerpo y fármaco terapéutico utiliza características duales del anticuerpo y el fármaco acoplado; la primera es la función de unión que se une específicamente a la molécula diana, la segunda es la función de destrucción de células tumorales del propio anticuerpo y la tercera es el efecto particular del fármaco conjugado. Los productos conjugados de anticuerpo-fármaco actuales están limitados en la forma en la que destruyen las células tumorales directamente. Sin embargo, debido a los estrictos requisitos de las tecnologías de anticuerpos, moléculas conectora, moléculas de toxinas y conjugación, así como a la limitación de la introducción de toxinas en las moléculas del microambiente tumoral, aún existen algunas dificultades en los estudios clínicos reales.

Compendio de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (Ib):

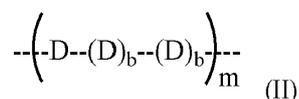


en donde TM es un radical de direccionamiento que comprende una inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno tumoral sobre una célula tumoral, en donde el antígeno tumoral es ErbB2 (Her2) o EGFR, L es un conector y AM es un radical de activación que es 4-amino-2-(etoximetil)-a,a-di-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolino-1-etanol (Resiquimod) representado por la estructura:

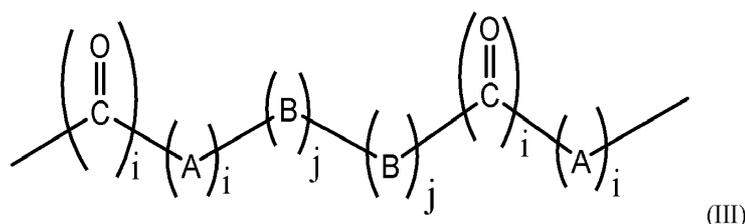


en donde es el punto que se debe conectar al conector L, para su uso en el tratamiento del cáncer.

En algunas realizaciones, L es un conector representado por la siguiente estructura de fórmula (II):



- 5 m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, cada b es independientemente 0 o 1, y D está representado independientemente por la estructura de fórmula (III):



en donde cada i independientemente es 0 o 1;

cada j es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

- 10 cada A es independientemente S, O o N-R_a, en donde R_a es hidrógeno, alquilo, alqueno o alcoxi;

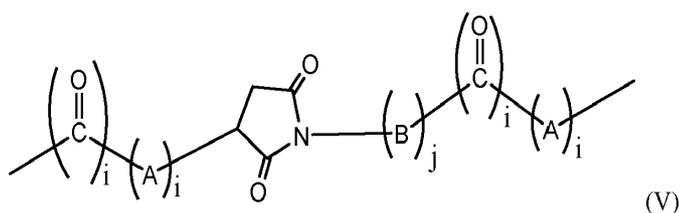
cada B es independientemente alquilo, alqueno, --O-alquilo--, --alquil-O--, --S-alquilo--, --alquil-S--, arilo, heteroarilo, heterociclilo o péptido, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo,

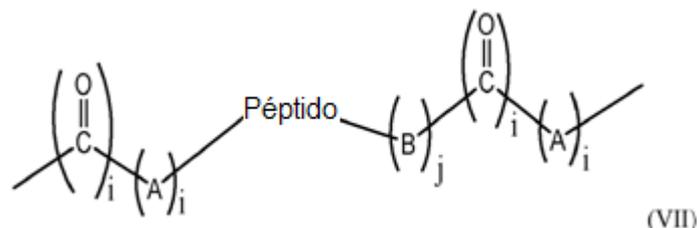
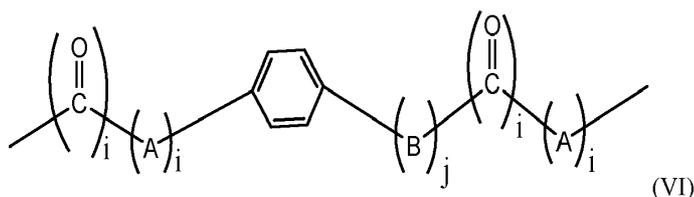
- 15 --alquil-arilo, --alquil-heteroarilo, --alquil-heterociclilo, --O-R₄, --O-alquil-R₄, --C(O)-R₄, --C(O)-O-R₄, --S-R₄, --S(O)₂-R₄, --NHR₄, --NH-alquilo-R₄, halógeno, --CN, --NO₂, y --SH, en donde R₄ es alquilo, alqueno, --alquil-hidroxilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o haloalquilo.

En algunas realizaciones, la inmunoglobulina se une a una célula tumoral de forma específica o de forma preferible en comparación con una célula no tumoral. La célula tumoral puede ser de un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, un mieloma o un cáncer del sistema nervioso central.

- 20 En algunas realizaciones, la inmunoglobulina comprende un anticuerpo. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina comprende Herceptin (trastuzumab), Erbitux (cetuximab), Vectibix (Panitumumab), Perjeta (Pertuzumab) o mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, D en el radical conector ("L") se selecciona entre las estructuras de fórmula (V)-(VII)





A, B, i y j se definen más arriba.

5 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se proporciona en el presente documento, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento del cáncer.

10 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional es un agente anticanceroso seleccionado entre un antimetabolito, un inhibidor de la topoisomerasa I y II, un agente alquilante, un inhibidor de microtúbulos, un agente antiandrógeno, un modulador GNRh, y mezclas de los mismos.

15 En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona entre cáncer de estómago, colon, recto, hígado, páncreas, pulmón, mama, cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, testículo, vejiga, riñón, cerebro/sistema nervioso central, cabeza y cuello, garganta, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, melanoma, cáncer de piel no melanoma, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, sarcoma de Ewing, cáncer de pulmón de células pequeñas, coriocarcinoma, rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, leucemia de células pilosas, boca/faringe, esófago, laringe, cáncer de riñón o linfoma.

Breve descripción de los dibujos

20 Las características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención con referencia a la siguiente descripción detallada que establece realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y a los dibujos adjuntos en los que:

25 La **Figura 1** representa las características del compuesto conjugado. La unión de los productos conjugados Trastuzumab MC-vc-resiquimod y Trastuzumab-resiquimod a células L que expresan Her2 se compara con Trastuzumab no conjugado (como referencia), IgG humana de control y anticuerpo IgG1 humano irrelevante, según lo determinado por análisis FACS.

30 La **Figura 2** representa el análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) in vitro de Trastuzumab, productos conjugados de Trastuzumab MC-vc-ligando del receptor tipo Toll (TLRL) y Trastuzumab MC-ligando del receptor tipo Toll (TLRL). Se añadieron PBMC (células efectoras) con células SKBR3 (células diana) a placas de 96 pocillos (razón de dianas/efectores 1/60) durante 17 h que contenían IgG1 humana de control, trastuzumab o productos conjugados Trastuzumab MC-vc-TLRL y Trastuzumab MC-TLRL a diferentes concentraciones. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. El análisis se basó en la determinación negativa de la población de SKBR3. Las células muertas se tiñeron con LDH.

35 La **Figura 3A** representa los porcentajes de DC antes y después del enriquecimiento. Los números en los dos gráficos superiores representan los porcentajes de DC (HLA-DR+Lin-) del total de células antes y después del agotamiento del linaje. Los números en los gráficos inferiores representan porcentajes de mDC (CD11C+CD123-) y pDC (CD123+CD11C-) del total de DC antes y después del agotamiento del linaje. Las **Figuras 3B a 3D** representan el análisis de la producción de citocinas por DC humanas purificadas. Las DC humanas purificadas se sembraron en una placa de 96 pocillos y se cultivaron con diferentes concentraciones de TLRL alogénicas sin tratar (medio) o tratadas, o Trastuzumab MC-vc-TLRL y Trastuzumab MC-TLRL directamente durante 20-22 h en una incubadora a 37°C. En un experimento separado, se administraron Cetuximab MC-vc-TLRL y Cetuximab MC-TLRL a una concentración creciente para tratar DC humanas. Se recogió el sobrenadante y se analizaron por ELISA IFN-α, IL-6, IL-12(p70) y TNF-α humanos. Los datos se proporcionan como la media ± DT de cultivos por triplicado y son representativos de experimentos independientes de dos de tres donantes sanos.

Las **Figuras 4A-4C** representan la eficacia terapéutica de Trastuzumab MC-vc-TLRL y Trastuzumab MC-TLRL en el modelo de tumor gástrico PDX. Se trataron ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c nu/nu hembra de 6-8 semanas de edad que portaban tumor gástrico subcutáneo obtenido del paciente por vía intravenosa con 10 mg/kg de Trastuzumab MC-vc-TLRL, Trastuzumab MC-TLRL o Trastuzumab no conjugado o solución salina (12 ratones por grupo). El tratamiento se realizó semanalmente durante un período de 45 días. La terapia se inició cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 170 mm³. **Figura 4A:** Los datos representan volúmenes tumorales medios (media ± DT). Las curvas de crecimiento tumoral se detuvieron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 2000 mm³.

Figura 4B: Variaciones del peso corporal de los ratones durante y después de la terapia. No se observó pérdida de peso detectable. **Figura 4C:** Curvas de supervivencia de los grupos de tratamiento y control; prolongación sustancial para los ratones que recibieron Trastuzumab MC-vc-TLRL, o Trastuzumab no conjugado.

Las **Figuras 5A-5B** representan la eficacia terapéutica de Cetuximab MC-vc-TLRL en un modelo carente de sistema inmunitario/cáncer de pulmón humano H1650. Se trataron ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c nu/nu hembra de 6-8 semanas de edad que portaban células subcutáneas de cáncer de pulmón H1650 por vía intravenosa con 10 mg/kg de Cetuximab MC-vc-TLRL, o Cetuximab no conjugado o solución salina (12 ratones por grupo). El tratamiento se realizó semanalmente durante un período de 45 días. La terapia se inició cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 170 mm³. Los datos representan volúmenes tumorales medios (media ± DT). Las curvas de crecimiento tumoral se detuvieron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 2000 mm³. **Figura 5A:** Eficacia terapéutica de Cetuximab MC-vc-TLRL en modelo de cáncer de pulmón humano. **Figura 5B:** Variaciones del peso corporal de los ratones durante y después de la terapia. No se observó pérdida de peso detectable.

Descripción detallada de la invención

Varios aspectos de la invención se describen a continuación con referencia a aplicaciones ejemplares para ilustración. Debe entenderse que se exponen numerosos detalles, relaciones y métodos específicos para proporcionar una comprensión completa de la invención. Sin embargo, un experto normal en la técnica pertinente reconocerá fácilmente que la invención se puede poner en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros métodos. La presente invención no está limitada por el orden ilustrado de actos o eventos, ya que algunos actos pueden ocurrir en diferentes órdenes y/o al mismo tiempo que otros actos o eventos.

Además, no se requieren todos los actos o eventos ilustrados para implementar una metodología de acuerdo con la presente invención.

La terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitante de la invención. Como se emplean en el presente documento, se pretende que las formas singulares "un", "uno", "una", y "el" y "la" incluyan también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida en que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de los mismos, se utilicen en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, se pretende que tales términos sean inclusivos de una manera similar al término "que comprende".

El término "aproximadamente" o "de manera aproximada" significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medida. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación típica, según la práctica de la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un rango de hasta 20%, preferiblemente hasta 10%, más preferiblemente hasta 5% y aún más preferiblemente hasta 1% de un valor dado. Alternativamente, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces, un valor. Cuando se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se debe suponer que el término "aproximadamente" significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular.

Definiciones y abreviaturas

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan técnicas convencionales para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Las técnicas y procedimientos generalmente se realizan de acuerdo con métodos convencionales en la técnica y varias referencias generales, que se proporcionan a lo largo de este documento. La nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica y orgánicos sintéticos descritos a continuación son bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se utilizan mecanismos convencionales, o modificaciones de los mismos, para síntesis químicas y análisis químicos.

El término "alquilo", solo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, o cíclico, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, mono o poliinsaturado y puede incluir radicales di- y multivalentes, que tienen el número de

átomos de carbono designado (es decir C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero sin limitarse a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero sin limitarse a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo y los homólogos e isómeros superiores. También se pretende que el término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, incluya los derivados de alquilo definidos con más detalle a continuación, tales como "heteroalquilo". Los grupos alquilo, que se limitan a grupos hidrocarbonados, se denominan "homoalquilo".

El término "alquilenno" solo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un alcano, como se ilustra, pero no se limita, a -CH₂CH₂CH₂CH₂-, e incluye adicionalmente los grupos descritos a continuación como "heteroalquilenno". Típicamente, un grupo alquilo (o alquilenno) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, prefiriéndose en la presente invención aquellos grupos que tengan 10 átomos de carbono o menos. Un "alquilo inferior" o "alquilenno inferior" es un grupo alquilo o alquilenno de cadena más corta, que generalmente tiene ocho átomos de carbono o menos.

Los términos "alcoxi", "alquilamino" y "alquilitio" (o tioalcoxi) se usan en su sentido convencional y se refieren a los grupos alquilo anclados al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

El término "heteroalquilo", solo o combinado con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarbonado estable de cadena lineal o ramificada, o cíclico, o combinaciones de los mismos, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente y el heteroátomo de nitrógeno puede cuaternizarse opcionalmente. El heteroátomo o los heteroátomos O, N y S y Si pueden colocarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está anclado al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, y -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Pueden ser consecutivos hasta dos heteroátomos, tal como por ejemplo -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. De manera similar, el término "heteroalquilenno" solo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de heteroalquilo, como se ilustra, pero no se limita a, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para los grupos heteroalquilenno, los heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos extremos de la cadena (p. ej., alquilenoxi, alquilenndioxi, alquilenamino, alquilenndiamino y similares). Aún más, para los grupos conectores alquilenno y heteroalquilenno, la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo conector no implica ninguna orientación del grupo conector. Por ejemplo, la fórmula -C(O)₂R' representa tanto -C(O)₂R' como -R'C(O)₂-.

En general, un "sustituyente acilo" también se selecciona del grupo expuesto anteriormente. Como se emplea en el presente documento, el término "sustituyente acilo" se refiere a grupos anclados y que cumplen la valencia de un carbono carbonílico que está anclado directa o indirectamente al núcleo policíclico de los compuestos de la presente invención.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", solos o combinados con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Además, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está anclado al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero sin limitarse a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo y similares.

Los términos "halo" o "halógeno", solos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Además, se pretende que términos tales como "haloalquilo" incluyan monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, se pretende que el término "haloalquilo C₁-C₄" incluya, pero sin limitarse a, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo y similares.

Como se emplea en el presente documento, el término "haloalquilo" se refiere a un alquilo como se define en el presente documento, que está sustituido con uno o más grupos halo como se define en el presente documento. Preferiblemente, el haloalquilo puede ser monohaloalquilo, dihaloalquilo o polihaloalquilo, incluido el perhaloalquilo. Un monohaloalquilo puede tener un yodo, bromo, cloro o flúor dentro del grupo alquilo. Los grupos dihaloalquilo y polihaloalquilo pueden tener dos o más átomos halo iguales o una combinación de diferentes grupos halo dentro del alquilo. Preferiblemente, el polihaloalquilo contiene hasta 12, 10 u 8 o 6 o 4 o 3 o 2 grupos halo. Los ejemplos no limitantes de haloalquilo incluyen fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo, difluoroclorometilo, diclorofluorometilo, difluoroetilo, difluoropropilo, dicloroetilo y dicloropropilo. Un perhaloalquilo se refiere a un alquilo que tiene todos los átomos de hidrógeno reemplazados por átomos de halo.

Como se emplea en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un sistema anular monocíclico o bicíclico o policíclico fusionado de 5-14 miembros, que tiene de 1 a 8 heteroátomos seleccionados entre N, O, S o Se. Preferiblemente, el heteroarilo es un sistema anular de 5 a 10 miembros. Los grupos heteroarilo típicos incluyen 2- o 3-tienilo, 2- o 3-furilo, 2- o 3-pirrolilo, 2-, 4- o 5-imidazolilo, 3-, 4- o 5-pirazolilo, 2-, 4- o 5-tiazolilo, 3-, 4- o 5-isotiazolilo,

2-, 4- o 5-oxazolilo, 3-, 4- o 5-isoxazolilo, 3- o 5-1,2, 4-triazolilo, 4- o 5-1,2, 3-triazolilo, tetrazolilo, 2-, 3- o 4-piridilo, 3- o 4-piridazinilo, 3-, 4- o 5-pirazinilo, 2-pirazinilo, 2-, 4- o 5-pirimidinilo.

5 El término "heteroarilo" también se refiere a un grupo en el que un anillo heteroaromático está fusionado con uno o más anillos arilo, cicloalifáticos o heterocicloalquilo, donde el radical o punto de anclaje está en el anillo heteroaromático. Los ejemplos no limitantes incluyen, pero sin limitarse a, 1, 2, 3, 5, 6, 7 u 8 indolizínico, 1, 3, 4, 5, 6 o 7-isoindolilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, o 7-indolilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, o 7-indazolilo, 2-, 4-, 5-, 6-, 7-, o 8-purinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8-, o 9-quinolizínico, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-quinolilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-isoquinolilo, 1-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-ftalazinilo, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-naftiridinilo, 2-, 3-, 5-, 6-, 7- u 8-quinazolinilo, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, o 8-cinolinilo, 2-, 4-, 6-, o 7-pteridinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, u 8-4aH carbazolilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, u 8-carbazolilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, o 9-carbolinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-fenantridinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-acridinilo, 1-, 2-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-perimidinilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 8-, 9- o 10-fenatrolinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8- o 9-fenazinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-,

15 8-, 9- o 10-fenotiazinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-fenoxazinilo, o 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-benzisoquinolinilo, 2-, 3-, 4- o 5-tieno[2,3-b]furanilo, 2-, 3-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10- u 11-7H-pirazino[2,3-c]carbazolilo, 2-, 3-, 5-, 6- o 7-2H-furo[3,2-b]-piranilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 7- u 8-5H-pirido[2,3-d]-o-oxazinilo, 1-, 3- o 5-1H-pirazo[4,3-d]-oxazolilo, 2-, 4- o 5-4H-imidazo[4,5-d]tiazolilo, 3-, 5-, u 8-pirazino[2,3-d]piridazinilo, 2-, 3-, 5-, o 6-imidazo[2,1-b]tiazolilo, 1-, 3-, 6-, 7-, 8-, o 9-furo[3,4-c]cinolinilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 8-, 9-, 10 o 11-4H-pirido[2,3-c]carbazolilo, 2-, 3-, 6- o 7-imidazo[1,2-b][1,2,4]triazinilo, 7-benzo[b]tienilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoxazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzimidazolilo, 2-, 4-, 4-, 5-, 6-, 6- o 7-benzotiazolilo, 1-, 2-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-benzoxapínico, 2-, 4-, 5-, 6-, 7-, u 8-benzoxazinilo, 1-, 2-, 3-, 5-, 6-, 7-, 8-,

20 9-, 10-, u 11-1H-pirrol[1,2-b][2]benzazapínico. Los grupos heteroarilo fusionados típicos incluyen, pero sin limitarse a, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-quinolinilo, 1-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, u 8-isoquinolinilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, o 7-indolilo, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, o 7-benzo[b]tienilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzoxazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzimidazolilo, 2-, 4-, 5-, 6- o 7-benzotiazolilo.

25 Como se emplea en el presente documento, el término "heterociclilo" o "heterociclo" se refiere a un grupo cíclico aromático o no aromático, totalmente saturado o insaturado, opcionalmente sustituido, p. ej., que es un sistema anular monocíclico de 4 a 7 miembros, bicíclico de 7 a 12 miembros o tricíclico de 10 a 15 miembros, que tiene al menos un heteroátomo en al menos un anillo que contiene un átomo de carbono. Cada anillo del grupo heterocíclico que contiene un heteroátomo puede tener 1, 2 o 3 heteroátomos seleccionados entre átomos de nitrógeno, átomos de oxígeno y átomos de azufre, donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre también pueden oxidarse opcionalmente. El grupo heterocíclico puede estar anclado a un heteroátomo o a un átomo de carbono.

30 Los grupos heterocíclicos monocíclicos ilustrativos incluyen pirrolidinilo, pirrolilo, pirazolilo, oxetanilo, pirazolinilo, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, triazolilo, oxazolilo, oxazolidinilo, isoxazolinilo, isoxazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, isotiazolidinilo, furilo, tetrahidrofurilo, tienilo, oxadiazolilo, piperidilino, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolodinilo, 2-oxoazepínico, azepínico, 4-piperidonilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, tetrahidropiranilo, morfolinilo, tiamorfolinilo, tiamorfolinilo sulfóxido, tiamorfolinilo sulfona, 1,3-dioxolano y tetrahydro-1,1-dioxotienilo, 1,1,4-trioxo-1,2,5-tiadiazolidin-2-ilo y similares.

35 Los grupos de heterocíclicos bicíclicos ilustrativos incluyen indolilo, dihidroindolilo, benzotiazolilo, benzoxazinilo, benzoxazolilo, benzotienilo, benzotiazinilo, quinuclidinilo, quinolinilo, tetrahydroquinolinilo, decahydroquinolinilo, isoquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroisoquinolinilo, benzimidazolilo, benzopiranilo, indolizínico, benzofurilo, cromonilo, cumarinilo, benzopiranilo, cinolinilo, quinoxalinilo, indazolilo, pirrolopiridilo, furopiridinilo (tal como furo[2,3-c]piridinilo, furo[3,2-b]piridinilo] o furo[2,3-b]piridinilo), dihidroisoindolilo, 1,3-dioxo-1,3-dihidroisoindol-2-ilo, dihydroquinazolinilo (tal como 3,4-dihidro-4-oxo-quinazolinilo), ftalazinilo y similares.

40 Los grupos heterocíclicos tricíclicos ilustrativos incluyen carbazolilo, dibenzoazepínico, ditienoazepínico, benzindolilo, fenantrolinilo, acridinilo, fenantridinilo, fenoxazinilo, fenotiazinilo, xantenilo, carbolinilo y similares.

El término "heterociclilo" se refiere adicionalmente a grupos heterocíclicos como se definen en el presente documento con 1, 2 o 3 sustituyentes seleccionados de los grupos que consisten en los siguientes:

- 45 (a) alquilo;
- (b) hidroxilo (o hidroxilo protegido);
- (c) halo;
- (d) oxo, es decir, =O;
- (e) amino, alquilamino o dialquilamino;
- 50 (f) alcoxi;
- (g) cicloalquilo;
- (h) carboxilo;

- (i) heterocicloxi, en donde heterocicloxi indica un grupo heterocíclico unido a través de un puente de oxígeno;
- (j) alquil-O-C(O)--;
- (k) mercapto;
- 5 (l) nitro;
- (m) ciano;
- (n) sulfamoílo o sulfonamido;
- (o) arilo;
- (p) alquil-C(O)-O--;
- 10 (q) aril-C(O)-O--;
- (r) aril-S--;
- (s) ariloxi;
- (t) alquil-S--;
- (u) formilo, es decir, HC(O)--;
- 15 (v) carbamoilo;
- (w) aril-alquilo--; y
- (x) arilo sustituido con alquilo, cicloalquilo, alcoxi, hidroxilo, amino, alquil-C(O)-NH--, alquilamino, dialquilamino o halógeno.

20 Como se emplea en el presente documento, el término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado que tiene de 2 a 20 átomos de carbono y que contiene al menos un doble enlace. Los grupos alqueno tienen preferiblemente de 2 a 8 átomos de carbono.

25 El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente hidrocarbonado aromático, poliinsaturado, que puede ser un solo anillo o anillos múltiples (preferiblemente de 1 a 3 anillos), que están fusionados entre sí o conectados covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados y los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo se puede anclar al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-benzimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas anulares de arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables que se describen a continuación.

35 Para abreviar, el término "arilo" cuando se emplea combinado con otros términos (p. ej., ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye anillos de arilo y heteroarilo como se define anteriormente. Por tanto, se pretende que el término "arilalquilo" incluya aquellos radicales en los que un grupo arilo está anclado a un grupo alquilo (p. ej., bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares), incluidos los grupos alquilo en los que un átomo de carbono (p. ej., un grupo metileno) ha sido reemplazado por, por ejemplo, un átomo de oxígeno (p. ej., fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares).

40 Cada uno de los términos anteriores (p. ej., "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo") incluyen formas tanto sustituidas como no sustituidas del radical indicado. Los sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

45 Los sustituyentes de los radicales alquilo y heteroalquilo (incluidos los grupos a menudo denominados alqueno, alqueno, heteroalqueno, heteroalqueno, alqueno, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno y heterocicloalqueno) se denominan generalmente "sustituyentes alquilo" y "sustituyentes heteroalquilo" respectivamente, y pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados entre, pero sin limitarse a: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR'R"', -NR"C(O)₂R', -NR-C(NR'R"R"')=NR"', -NR-C(NR'R")=NR"', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R", -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número que varía de cero a (2m'+1), donde m' es el número total de átomos

de carbono en tal radical. R', R'', R''' y R'''' se refieren cada uno de forma preferible independientemente a hidrógeno, grupos heteroalquilo sustituidos o no sustituidos, arilo sustituidos o no sustituidos, p. ej., arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo, alcoxi o tioalcoxi sustituidos o no sustituidos, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' están anclados al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, se pretende que -NR'R'' incluya, pero sin limitarse a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de los sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que se pretende que el término "alquilo" incluya grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de los grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (p. ej., -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (p. ej., -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares).

Al igual que los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes arilo y los sustituyentes heteroarilo se denominan generalmente "sustituyentes arilo" y "sustituyentes heteroarilo", respectivamente, y varían y se seleccionan, por ejemplo, entre: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R',

-C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR''-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NR''-C(NR''R''')=NR'', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoroalcoxi C₁-C₄ y fluoroalquilo C₁-C₄, en un número que varía de cero al número total de valencias abiertas en el sistema anular aromáticos; y donde R', R'', R''' y R'''' se seleccionan preferiblemente independientemente entre hidrógeno, alquilo y heteroalquilo C₁-C₈, arilo y heteroarilo no sustituidos, (arilo no sustituido)-alquilo C₁-C₄ y (aril no sustituido)oxi-alquilo C₁-C₄. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como cada grupo R', R'', R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos.

Dos de los sustituyentes arilo en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de fórmula -T-C(O)-(CRR')_q-U-, en donde T y U son independientemente -NR-,

-O-, -CRR'- o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo se pueden reemplazar opcionalmente por un sustituyente de fórmula -A-(CH₂)_r-B-, en donde A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede reemplazar opcionalmente por un enlace doble. Alternativamente, dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo de arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente por un sustituyente de fórmula -(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-, donde s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'-. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' se seleccionan preferiblemente de forma independiente entre hidrógeno o alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido.

Como se emplea en el presente documento, el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S), fósforo (P) y silicio (Si).

Como se emplea en el presente documento, el término "ariloxi" se refiere tanto a un grupo -O-arilo como a un -O-heteroarilo, en donde arilo y heteroarilo se definen en el presente documento.

Como se emplea en el presente documento, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los compuestos de esta invención y que no son indeseables biológicamente o de otro modo. En muchos casos, los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a estos (p. ej., fenol o ácido hidroxámico). Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden formar con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Los ácidos inorgánicos de los que se pueden obtener sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Los ácidos orgánicos de los que se pueden obtener sales incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables se pueden formar con bases inorgánicas y orgánicas. Las bases inorgánicas de las que se pueden obtener las sales incluyen, por ejemplo, sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares; particularmente preferidas son las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las bases orgánicas de las que se pueden obtener las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas, resinas de intercambio iónico alcalinas y similares, específicamente tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir de un compuesto original, un radical alcalino o ácido, mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, bicarbonato o similares de Na, Ca, Mg o K), o haciendo reaccionar las formas de base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Estas reacciones típicamente se llevan a cabo en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de ambos. En general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo, cuando sea posible. Se pueden encontrar listas de sales adecuadas adicionales, p. ej., en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985).

Como se emplea en el presente documento, el término "portador/excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (p. ej., agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardadores de la absorción, sales, fármacos, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como sería conocido por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990, pág. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Como se emplea en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal. Preferiblemente, el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere, por ejemplo, a primates (p. ej., seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, pájaros y similares. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Compuestos y Composiciones

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto como se define en la reivindicación 1 que tiene la estructura de Fórmula (Ib):



donde TM es un radical de direccionamiento, Ln es un conector, y AM es un radical de activación.

Por "radical de activación" en el presente documento se entiende una molécula o agente que es capaz de estimular o potenciar el sistema inmunitario o las células tumorales del organismo. En general, el radical de activación puede actuar, directa o indirectamente, sobre receptores tipo Toll, receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos, receptores tipo RIG-I, receptores de lectina tipo c o Sensores de ADN citosólico, o una combinación de los mismos. El radical de activación según la invención, Resiquimod, actúa sobre los receptores tipo Toll.

El radical de activación puede activar células inmunitarias humanas, incluidas, pero sin limitarse a, células dendríticas, macrófagos, monocitos, células supresoras de origen mieloide, células NK, células B, células T o células tumorales, o una combinación de las mismas.

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígenos más poderosas. Las células dendríticas juegan un papel esencial para el inicio de las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. Las células dendríticas también juegan un papel clave en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmunológica.

Por "células dendríticas" (DC) se entiende en el presente documento una población celular heterogénea que incluye dos subtipos principales: a saber, DC mieloides (mDC) y DC plasmocitoides (pDC) (Steinman et al., 1979, J. Exp. Med., 149, 1-16). Estos dos subconjuntos de DC en sangre se diferenciaron originalmente por su expresión de CD11c (receptor del complemento de integrina) y CD123 (IL-3R α). Cada una de las poblaciones de pDC y mDC constituye entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,6% de la población de PBMC en seres humanos.

Por "pDC" en el presente documento se entiende células dendríticas plasmocitoides y representan un subtipo de células dendríticas que se encuentran en la sangre y en los órganos linfoides periféricos. Estas células expresan los marcadores de superficie CD123, BDCA-2(CD303) y BDCA-4(CD304) y HLA-DR, pero no expresan CD11c, CD14, CD3, CD20 o CD56, lo que las distingue de las células dendríticas convencionales, monocitos, células T, células B y células NK. Como componentes del sistema inmunitario innato, estas células expresan los receptores tipo Toll 7 y 9 intracelulares, que permiten la detección de ácidos nucleicos virales y bacterianos, tales como los motivos de ARNs o ADN CpG. Tras la estimulación y activación posterior, estas células producen grandes cantidades de interferón Tipo I (principalmente IFN- α e IFN- β) e interferón Tipo III (p. ej., IFN- λ), que son compuestos antivirales pleiotrópicos críticos que median una amplia gama de efectos. Al generar una gran cantidad de interferón tipo I, citocinas y quimiocinas, las células dendríticas plasmocitoides están ampliamente involucradas en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas del organismo. Pueden regular las células NK, las células T, las células B y otras células involucradas en la intensidad, la duración y el modo de respuesta de la respuesta inmunitaria, por lo que desempeñan una función muy importante en tumores, infecciones y enfermedades autoinmunitarias. (Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. Annu Rev Immunol. 2005; 23:275-306. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nat Rev Immunol. agosto de 2008; 8 (8) :594-606).

Por "mDC" en el presente documento se entiende células dendríticas mieloides y representan un subtipo de células dendríticas circulantes que se encuentran en la sangre y en los órganos linfoides periféricos. Estas células expresan los marcadores de superficie CD11c, CD1a, HLA-DR y BDCA-1 (CD1c) o BDCA-3 (CD141). No expresan BDCA-2 o CD123, lo que las distingue de las pDC. Las mDC tampoco expresan CD3, CD20 o CD56. Como componentes del sistema inmunitario innato, las mDC expresan receptores tipo Toll (TLR), incluidos TLR2, 3, 4, 5, 6 y 8, que permiten la detección de componentes bacterianos y virales. Tras la estimulación y la activación posterior, estas células son las células presentadoras de antígeno más potentes para activar las células T CD4 así como CD8 específicas de antígeno. Además, las mDC tienen la capacidad de producir grandes cantidades de IL-12 e IL23, lo cual es fundamental para la

inducción de inmunidad mediada por células Th1 o Th17.

El estudio encontró que muchos tumores sólidos tales como el cáncer de mama y el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de ovario tienen invasión de pDC (Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:7466-7474. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* 2003; 63:6478-6487. Zou WP, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001; 7:1339-1346) y los factores secretados por las células tumorales inhiben la maduración de las DC. (Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF et al. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3:483-490. Bell D, Chomar P, Broyles D et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located peritumoral areas. *J Exp Med* 1999; 190:1417-1425. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34 (+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92:4778-4791). Estas células DC inmaduras no desempeñaron ningún papel en la promoción de la inmunidad antitumoral. Por el contrario, las DC dentro del microambiente tumoral promueven el crecimiento tumoral al inhibir la inmunidad antitumoral y promover la angiogénesis. Existe evidencia de que el agonista del receptor 7 tipo Toll Imiquimod y los fármacos CpG agonistas del receptor 9 tipo Toll pueden estimular las pDC dentro del microambiente tumoral para inhibir el desarrollo tumoral. (Dummer R, Urosevic M, Kempf W et al. Imiquimod in basal cell carcinoma: how does it work? *Br J Dermatol* 2003; 149:57-58. Miller RL, Gerster JF, Owens ML et al. Imiquimod applied topically: a novel immune response modifier and new class of drug. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21:1-14. Hofmann MA, Kors C, Audring H et al. Phase 1 evaluation of intratumorally injected TLR9-agonist PF-3512676 in patients with basal cell carcinoma or metastatic melanoma. *J Immunother* 2008; 31:520-527).

Las células asesinas naturales (NK) son un tipo de linfocito citotóxico que constituye un componente importante del sistema inmunitario. Las células NK son un subconjunto de linfocitos de sangre periférica definidos por la expresión de CD56 o CD16 y la ausencia del receptor de células T (CD3). Reconocen y destruyen las líneas celulares transformadas sin cebar de una manera no restringida al MHC. Las células NK juegan un papel importante en el rechazo de tumores y células infectadas por virus. El proceso mediante el cual una célula NK reconoce una célula diana y suministra una señal suficiente para desencadenar la lisis de la diana está determinado por una serie de receptores inhibidores y activadores sobre la superficie celular. La discriminación de NK del yo frente al yo alterado implica el reconocimiento del receptor inhibidor de moléculas del MHC-I y ligandos que no son del MHC como CD48 y Clr-1b. El reconocimiento por NK de células infectadas o dañadas (yo alterado) se coordina a través de ligandos inducidos por estrés (p. ej., MICA, MICB, Rae1, H60, Mult1) o ligandos codificados por virus (p. ej., m157, hemaglutinina) reconocidos por varios receptores activadores, incluidos NKG2D, Ly49H y NKp46/Ncr1.

Las células NK representan la célula linfocito predominante en la sangre periférica durante muchos meses después del trasplante de células madre autólogo o alogénico y tienen un papel principal en la inmunidad a los patógenos durante este período. Reittie et al (1989) *Blood* 73: 1351-1358; Lowdell et al (1998) *Bone Marrow Transplant* 21: 679-686). El papel de las células NK en el injerto, la enfermedad de injerto contra anfitrión, la actividad antileucémica y la infección posterior al trasplante es revisado Lowdell (2003) en *Transfusion Medicine* 13:399-404.

Las células NK humanas median la lisis de las células tumorales y las células infectadas por virus a través de la citotoxicidad natural y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Las células NK humanas están controladas por señales citolíticas positivas y negativas. Las señales negativas (inhibidoras) son transducidas por los receptores que contienen el dominio de lectina C CD94/NKG2A y por algunos receptores similares a inmunoglobulina de células asesinas (KIR). La regulación de la lisis de NK por señales inhibidoras se conoce como la hipótesis del "yo perdido" en la que los alelos HLA de clase I específicos expresados sobre la superficie de la célula diana se ligan a receptores inhibidores sobre las células NK. La regulación por disminución de las moléculas de HLA sobre las células tumorales y algunas células infectadas por virus (p. ej., CMV) reducen esta inhibición por debajo de un umbral objetivo y las células diana pueden volverse susceptibles a la lisis mediada por células NK si las células diana también portan moléculas cebadoras de NK y activadoras. Los agonistas de TLR7, TLR8 o TLR9 pueden activar tanto las CDm como las pDC para producir IFN de tipo I y expresar moléculas coestimuladoras tales como el ligando GITR, que posteriormente activan las células NK para producir IFN-g y promueven de manera potente la función de destrucción de células NK.

Los receptores inhibidores se dividen en dos grupos, los de la superfamilia de Ig llamados Receptores similares a Inmunoglobulinas de Células Asesinas (KIR) y los de la familia de las lectinas, NKG2, que forman dímeros con CD94 en la superficie celular. Los KIR tienen una estructura extracelular de 2 o 3 dominios y se unen a HLA-A, -B o -C. Los complejos NKG2/CD94 se ligan a HLA-E.

Los KIR inhibidores tienen hasta 4 dominios intracelulares que contienen ITIM y los mejor caracterizados son KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, que se sabe que se unen a moléculas de HLA-C. KIR2DL2 y KIR2DL3 se unen a los alelos de HLA-C del grupo 1, mientras que KIR2DL1 se une a los alelos del grupo 2. Ciertas células de leucemia/linfoma expresan los alelos de HLA-C del grupo 1 y 2 y se sabe que son resistentes a la lisis celular mediada por NK.

Con respecto a las señales de activación positivas, se cree que la ADCC está mediada por CD16 y se han identificado varios receptores desencadenantes responsables de la citotoxicidad natural, incluidos CD2, CD38, CD69, NKRP-1, CD40, B7-2, NK-TR, NKp46, NKp30 y NKp44. Además, varias moléculas de KIR con colas intracitoplásmicas cortas también son estimuladoras. Se sabe que estos KIR (KIR2DS1, KIR2DS2 y KIR2DS4) se unen a HLA-C; siendo sus dominios extracelulares idénticos a sus KIR inhibidores relacionados. Los KIR activadores carecen de los ITIM y, en cambio, se asocian con DAP12 que conduce a la activación de las células NK. El mecanismo de control de la expresión de KIR inhibidores versus activadores sigue siendo desconocido.

Varios informes han descrito la expresión de TLR en cáncer o en líneas celulares de cáncer de ratón o humano. Por ejemplo, TLR1 a TLR6 son expresadas por líneas celulares tumorales de ratón de colon, pulmón, próstata y melanoma. (Huang B, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res.* 2005;65(12):5009-5014.), TLR3 es expresado en células de cáncer de mama humano (Salaun B, Coste I, Rissoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol.* 2006;176(8):4894-4901), las células de hepatocarcinoma y carcinoma gástrico expresan TLR2 y TLR4 (Huang B, et al. Listeria monocytogenes promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res.* 2007;67(9):4346-4352), y TLR9 (Droemann D, et al. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res.* 2005;6:1) y TLR4 (He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol.* 2007;44(11):2850-2859) son expresados. TLR7 y TLR8 se encuentran en células tumorales de cáncer de pulmón humano (Cherfils-Vicini J, Platonova S, Gillard M, Laurans L, Validire P, Caliandro R, Magdeleinat P, Mami-Chouaib F, Dieu-Nosjean MC, Fridman WH, Damotte D, Sautès-Fridman C, Cremer I. *J. Clin Invest.* 2010;120(4): 1285-1297).

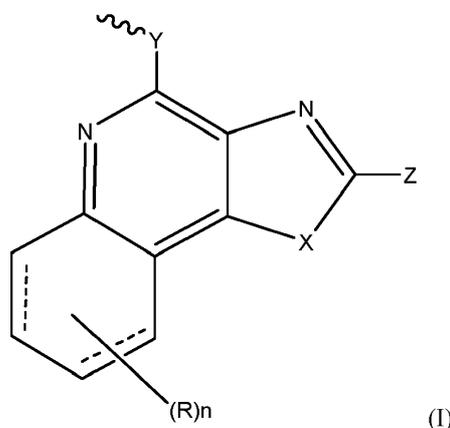
Los TLR son una familia de proteínas que detectan un producto microbiano y/o inician una respuesta inmunitaria adaptativa. Los TLR activan una célula dendrítica (DC). Los TLR son moléculas conservadas que atraviesan la membrana y contienen un ectodominio de repeticiones ricas en leucina, un dominio transmembrana y un dominio TIR (Toll/receptor de interleucina) intracelular. Los TLR reconocen distintas estructuras en los microbios, a menudo denominados "PAMP" (patrones moleculares asociados a patógenos). La unión del ligando a los TLR invoca una cascada de vías de señalización intracelular que inducen la producción de factores implicados en la inflamación y la inmunidad.

En algunas realizaciones, el radical de activación es un agonista de TLR7 y/o TLR8. TLR7 y TLR8 están filogenética y estructuralmente relacionados. TLR7 es expresado selectivamente por pDC y células B humanas. TLR8 es expresado predominantemente en mDC, monocitos, macrófagos y células supresoras mieloides. Los agonistas específicos de TLR7 activan las DC plasmocitoides (pDC) para producir grandes cantidades de IFN tipo 1 y expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras que promueven la activación de células T, células NK, células B y mDC. Los agonistas específicos de TLR8 activan las DC mieloides, monocitos, macrófagos o células supresoras de origen mieloides para producir grandes cantidades de IFN tipo 1, IL-12 e IL-23, y expresan altos niveles de MHC clase I, MHC clase II y moléculas coestimuladoras que promueven la activación de células T CD4 y CD8+ específicas de antígeno.

También se divulga un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (Ib):



en donde TM es un radical de direccionamiento, L es un conector, AM es un radical de activación que está representado por la estructura de fórmula (I):



en donde la línea punteada representa enlace o ausencia de enlace,



es el punto que se va a conectar al conector;

X es S o -NR₁, R₁ es -W₀-W₁-W₂-W₃-W₄,

W₀ es un enlace, alquilo, alqueno, alquino, alcoxi o -alquil-S-alquilo--,

W₁ es un enlace, --O--, o -NR₂--, en donde R₂ es hidrógeno, alquilo o alqueno,

5 W₂ es un enlace, --O--, --C(O)--, --C(S)--, o -S(O)₂--,

W₃ es un enlace, --NR₃--, en donde R₃ es hidrógeno, alquilo o alqueno,

10 W₄ es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, cicloalquilo, arilo, ariloxi, heteroarilo o heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, --NH₂, nitro, --alquil-hidroxilo, --alquil-arilo, --alquil-heteroarilo, --alquil-heterociclilo, --O-R₄, --O-alquilo-R₄, --alquil-O-R₄, --C(O)-R₄, --alquil-C(O)-R₄, --alquil-C(O)-O-R₄, --C(O)-O-R₄, --S-R₄, --S(O)₂-R₄, --NH-S(O)₂-R₄, --alquil-S-R₄, --alquil-S(O)₂-R₄, --NHR₄, --NR₄R₄, --NH-alquil-R₄, halógeno, --CN, --NO₂, y -SH, en donde R₄ es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alquil-hidroxilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o haloalquilo;

15 Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, alcoxi, arilo, haloalquilo, heteroarilo, heterociclilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alqueno, alquino, arilo, heteroarilo, heterociclilo, halógeno, ciano, nitro, --N(R₅)₂, --alcoxi-alquilo, --alcoxi-alqueno, --C(O)-alquilo, --C(O)-O-alquilo, --O-C(O)-alquilo, --C(O)-N(R₅)₂, arilo, heteroarilo, --CO-arilo y -CO-heteroarilo, en donde cada R₅ es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, alquil-arilo o alquil-heteroarilo;

20 R es hidrógeno, alquilo, alcoxi, haloalquilo, halógeno, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, --NH₂, nitro, --alquil-hidroxilo,

25 --alquil-arilo, --alquil-heteroarilo, --alquil-heterociclilo, --O-R₄, --O-alquilo-R₄, --alquil-O-R₄, --C(O)-R₄, --C(O)-NH-R₄, --C(O)-NR₄R₄, --alquil-C(O)-R₄, --alquil-C(O)-O-R₄, --C(O)-O-R₄, --O-C(O)-R₄, --S-R₄, --C(O)-S-R₄, --S-C(O)-R₄, --S(O)₂-R₄, --NH-S(O)₂-R₄, --alquil-S-R₄, --alquil-S(O)₂-R₄, --NHR₄, --NR₄R₄, --NH-alquil-R₄, halógeno, -CN y -SH, en donde R₄ es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alcoxi, alquil-hidroxilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o haloalquilo;

n es 0, 1, 2, 3 o 4;

30 Y es -NR₆R₇, -CR₆R₇R₈, o -alquil-NH₂, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alqueno, alquino,

-NH₂, halógeno, --N(R₅)₂, --alcoxi-alquilo, --alcoxi-alqueno, --C(O)-alquilo, --C(O)-O-alquilo, --C(O)-N(R₅)₂, arilo, heteroarilo, --CO-arilo y -CO-heteroarilo,

35 en donde R₆, R₇ y R₈ son independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, alquilo, arilo, --alquil-hidroxilo, --alquil-C(O)-O-R₉, --alquil-C(O)-R₉, o -alquil-O-C(O)-R₉, en donde cada R₉ es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, --alquil-arilo o alquil-heteroarilo, en donde R₉ es hidrógeno, alquilo, alqueno, halógeno o haloalquilo;

X y Z tomados juntos pueden formar opcionalmente un anillo de (5-9) miembros;

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

X de fórmula (I) puede ser S.

40 X de fórmula (I) puede ser -NR₁, R₁ es alquilo, --alquil-W₄, --alquil-O-W₄, --alquil-NH-C(O)-W₄, --alcoxi-NH-C(O)-W₄, --alquil-NH-C(O)-NH-W₄, --alcoxi-NH-C(O)-NH-W₄, --alquil-S(O)₂-W₄, o -alquil-NH-C(S)-W₄, en donde W₄ se define más arriba.

45 Z de fórmula (I) puede ser hidrógeno, alquilo, alcoxi, arilo, heteroarilo, haloalquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, ciano, --alcoxi-alquilo, nitro y -N(R₅)₂, en donde cada R₅ es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, --alquil-arilo o alquil-heteroarilo.

Y de fórmula (I) puede ser -NH₂, --alquil-NH₂, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo, alcoxi, alqueno y alquino.

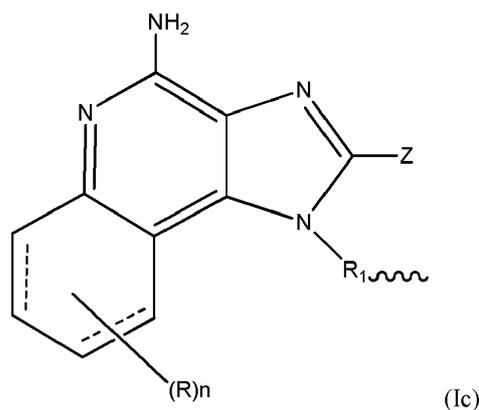
n de fórmula (I) puede ser 1 o 2.

5 R de fórmula (I) puede ser arilo o heteroarilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, -alquil-hidroxilo, -O-R₄, --O-alquil-R₄, --alquil-O-R₄, --C(O)-R₄, --C(O)-NH-R₄, --C(O)-NR₄R₄, --alquil-C(O)-R₄, --alquil-C(O)-O-R₄, --C(O)-O-R₄, --O-C(O)-R₄, --S-R₄, --C(O)-S-R₄, --S-C(O)-R₄, --S(O)₂-R₄, --NH-S(O)₂-R₄, --alquil-S-R₄, --alquil-S(O)₂-R₄, --NHR₄, --NR₄R₄, --NH-alquil-R₄, halógeno, -CN y -SH, en donde R₄ es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, alcoxi, -alquil-hidroxilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o haloalquilo.

También se divulga un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (Ib):

TM-L-AM (Ib),

10 en donde TM es un radical de direccionamiento, L es un conector, AM es un radical de activación que está representado por la estructura de fórmula (Ic):



donde la línea punteada representa enlace o ausencia de enlace,



es el punto que se va a conectar al conector;

15 R₁ es -W₀-W₁-W₂-W₃-W₄,

W₀ es un enlace, alquil, alqueno, alquinilo, alcoxi o -alquil-S-alquilo--,

W₁ es un enlace, --O--, o -NR₂--, en donde R₂ es hidrógeno, alquilo o alqueno,

W₂ es un enlace, --O--, --C(O)--, --C(S)--, o -S(O)₂--,

W₃ es un enlace, --NR₃--, en donde R₃ es hidrógeno, alquilo o alqueno,

20 W₄ es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquinilo, alcoxi, cicloalquilo, arilo, ariloxi, heteroarilo o heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alqueno, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, --NH₂, nitro, --alquil-hidroxilo, --alquil-arilo, --alquil-heteroarilo, --alquil-heterociclilo, --O-R₄, --O-alquil-R₄, --alquil-O-R₄, --C(O)-R₄, --alquil-C(O)-R₄, --alquil-C(O)-O-R₄, --C(O)-O-R₄, --S-R₄, --S(O)₂-R₄, --NH-S(O)₂-R₄, --alquil-S-R₄, --alquil-S(O)₂-R₄, --NHR₄, --NR₄R₄, --NH-alquil-R₄, halógeno, --CN, --NO₂, y -SH, en donde R₄ es independientemente hidrógeno, alquilo, alqueno, -alquil-hidroxilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o haloalquilo;

25 Z es hidrógeno, alquilo, alqueno, alquinilo, alcoxi, arilo, haloalquilo, heteroarilo, heterociclilo, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alqueno, alquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, halógeno, ciano, nitro, --N(R₅)₂, --alcoxi-alquilo, --alcoxi-alqueno, --C(O)-alquilo, --C(O)-O-alquilo, --O-C(O)-alquilo, --C(O)-N(R₅)₂, arilo, heteroarilo, --CO-arilo y -CO-heteroarilo, en donde cada R₅ es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, -alquil-arilo o -alquil-heteroarilo;

30 R es hidrógeno, alquilo, alcoxi, haloalquilo, halógeno, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alqueno, alquinilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, --NH₂, nitro, --alquil-hidroxilo,

35 --alquil-arilo, --alquil-heteroarilo, --alquil-heterociclilo, --O-R₄, --O-alquil-R₄, --alquil-O-R₄, --C(O)-R₄, --C(O)-NH-R₄, --C(O)-NR₄R₄, --alquil-C(O)-R₄, --alquil-C(O)-O-R₄, --C(O)-O-R₄, --O-C(O)-R₄, --S-R₄, --C(O)-S-R₄,

--S-C(O)-R₄, --S(O)₂-R₄, --NH-S(O)₂-R₄, --alquil-S-R₄, --alquil-S(O)₂-R₄, --NHR₄, --NR₄R₄, --NH-alquil-R₄, halógeno, -CN y -SH, en donde R₄ es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alcoxi, -alquil-hidroxilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o haloalquilo;

n es 0, 1, 2, 3 o 4;

5 Y es -NR₆R₇, -CR₆R₇R₈, o -alquil-NH₂, cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alquenilo, alquinilo,

-NH₂, halógeno, --N(R₅)₂, --alcoxi-alquilo, --alcoxi-alquenilo, --C(O)-alquilo, --C(O)-O-alquilo, --C(O)-N(R₅)₂, arilo, heteroarilo, --CO-arilo y -CO-heteroarilo,

10 en donde R₆, R₇ y R₈ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, alquiltio, ariltio, --alquil-hidroxilo, --alquil-C(O)-O-R₉, --alquil-C(O)-R₉, o -alquil-O-C(O)-R₉, en donde cada R₅ es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, --alquil-arilo o -alquil-heteroarilo, en donde R₉ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, halógeno o haloalquilo;

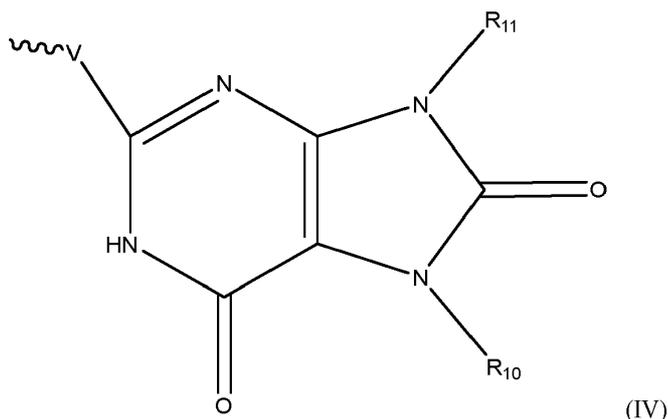
X y Z tomados juntos pueden formar opcionalmente un anillo de (5-9) miembros;

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

15 También se divulga un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (Ib):

TM-L-AM (Ib),

en donde TM es un radical de direccionamiento, L es un conector, AM es un radical de activación que está representado por la estructura de fórmula (IV):



20 en donde



es el punto que se va a conectar al conector;

en donde V es -NR₆R₇, en donde cada uno de R₆ y R₇ es independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, alcoxi, alquilamino, dialquilamino, alquiltio, ariltio, --alquil-hidroxilo, --alquil-C(O)-O-R₉, --alquil-C(O)-R₉, o

25 -alquil-O-C(O)-R₉, en donde R₉ es hidrógeno, alquilo, alquenilo, halógeno o haloalquilo;

R₁₀ y R₁₁ son independientemente hidrógeno, alquilo, alquenilo, arilo, haloalquilo, heteroarilo, heterociclilo o cicloalquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alquenilo, alquinilo, halógeno, -N(R₅)₂, --alcoxi-alquilo,

30 --alcoxi-alquenilo, --C(O)-alquilo, --C(O)-O-alquilo, --C(O)-N(R₅)₂, arilo, heteroarilo, --CO-arilo y -CO-heteroarilo, en donde cada R₅ es independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, -alquil-arilo o -alquil-heteroarilo;

TM y L se definen más arriba y más abajo,

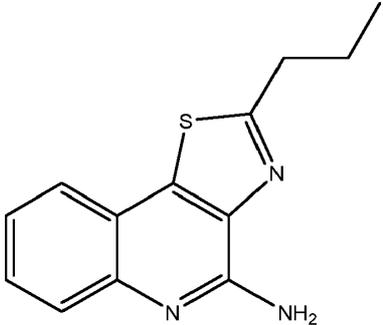
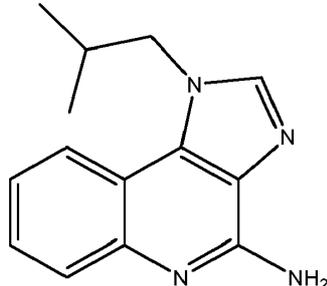
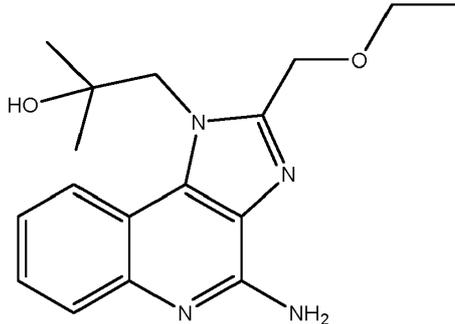
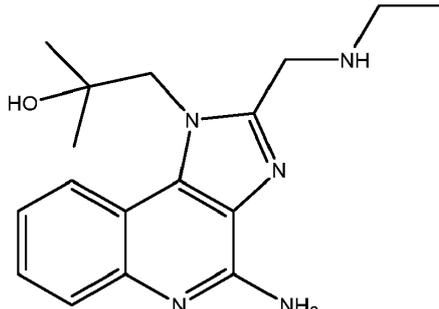
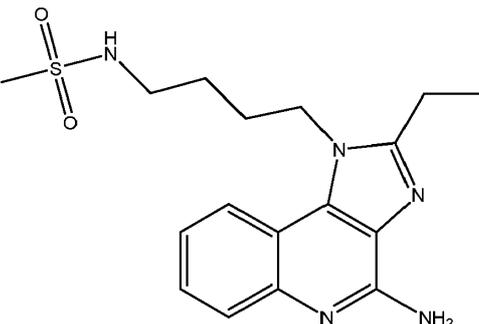
o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

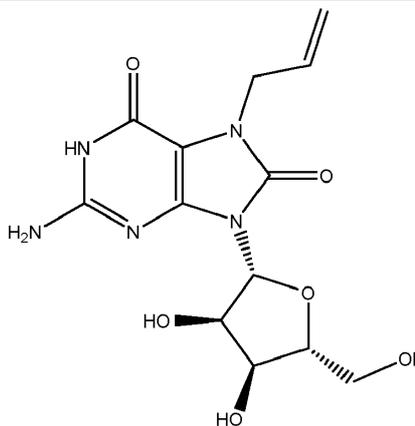
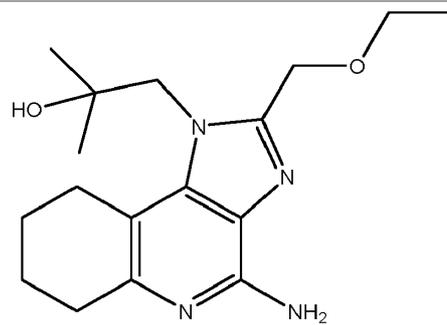
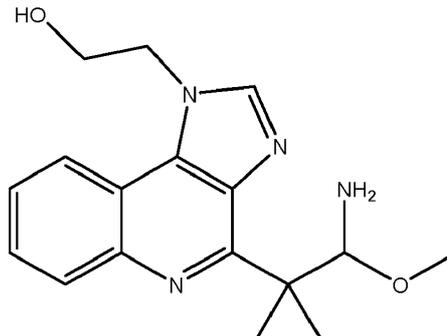
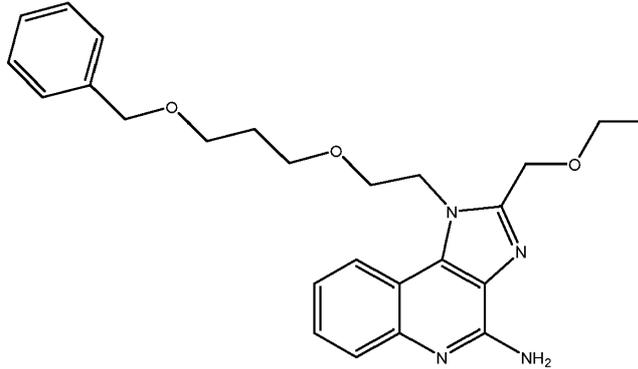
El radical de activación divulgado puede ser un agonista de TLR7 y/o TLR8 que se selecciona de la Tabla 1. Los compuestos de la Tabla 1 se describen y caracterizan con más detalle en los documentos US4.689.338, US5.389.640, US5.226.575, US6.110.929, US6.194.425, US5.352.784, US6.331.539, US5.482.936, US6.451810, WO2002/46192,

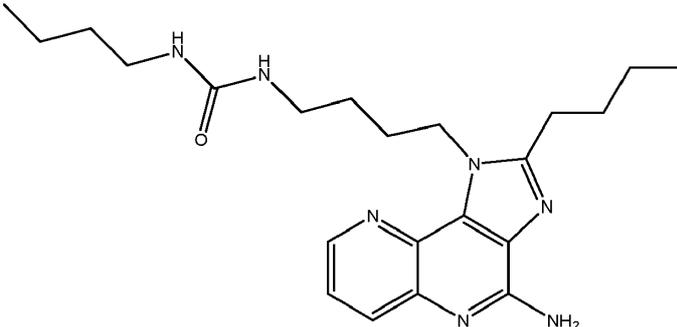
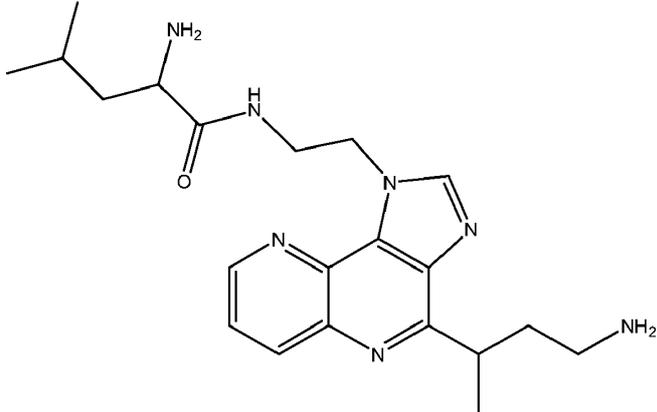
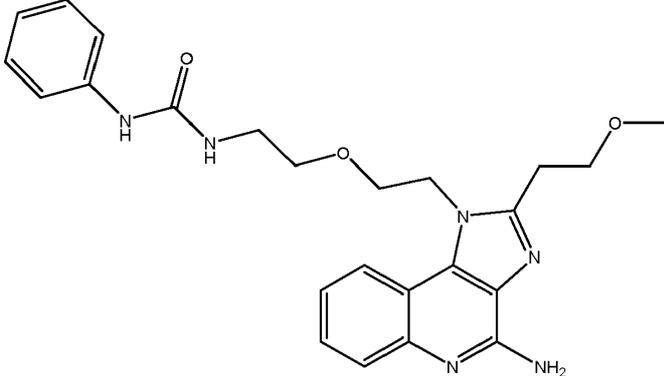
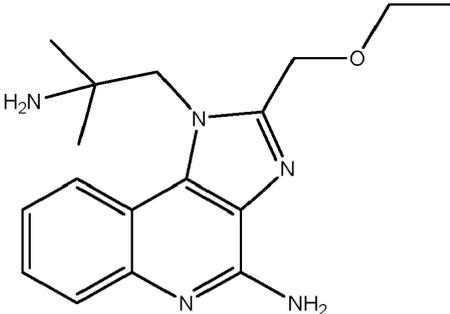
35

WO2002/46193, WO2002/46194, US2004/0014779 y US2004/0162309.

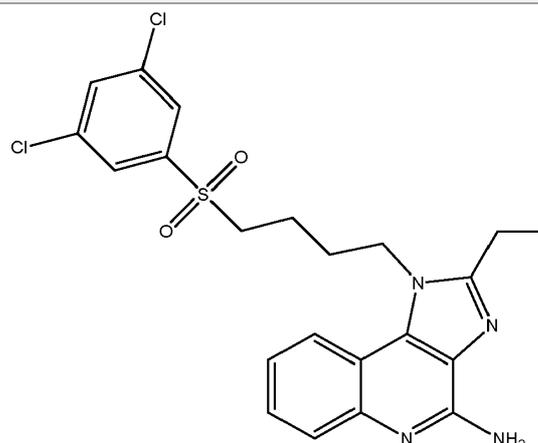
Tabla 1 Agonistas representativos de TLR7 y/o TLR8

Nombre	Estructura
2-propiltiazolo[4,5-c]quinolin-4-amina (CL075)	
1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (Imiquimod)	
4-amino-2-(etoximetil)-a,a-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-etanol (Resiquimod)	
1-(4-amino-2-etilaminometilimidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2-metilpropan-2-ol (Gardiquimod)	
N-[4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil-]metanosulfonamida (CM001)	

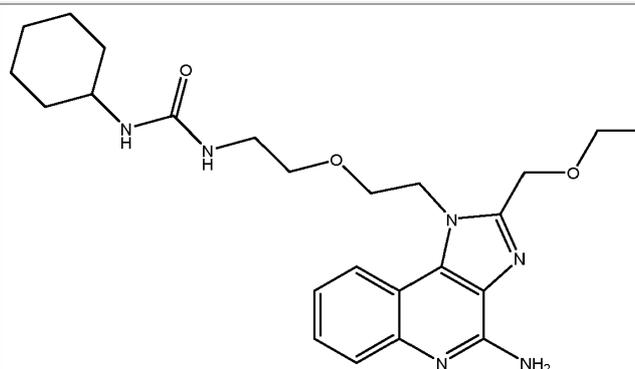
<p>7-alil-7,8-dihidro-8-oxo-guanosina (Loxoribina)</p>	
<p>4-amino-2-etoximetil-aa-dimetil-6,7,8,9-tetrahidro-1h-imidazo[4,5-c]quinolin-1-etanol</p>	
<p>4-amino-N,N-dimetil-2-metoxietil-1h-imidazo[4,5-c]quinolin-1-etanol</p>	
<p>1-(2-(3-(benciloxi)propoxi)etil)-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina</p>	

<p>N-[4-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c][1,5]naftiridin-1-il)butil]-n'-butilurea</p>	
<p>N1-[2-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c][1,5]naftiridin-1-il)etil]-2-amino-4-metilpentanamida</p>	
<p>N-(2-{2-[4-amino-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etoxi}etil)-n'-fenilurea</p>	
<p>1-(2-amino-2-metilpropil)-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina</p>	

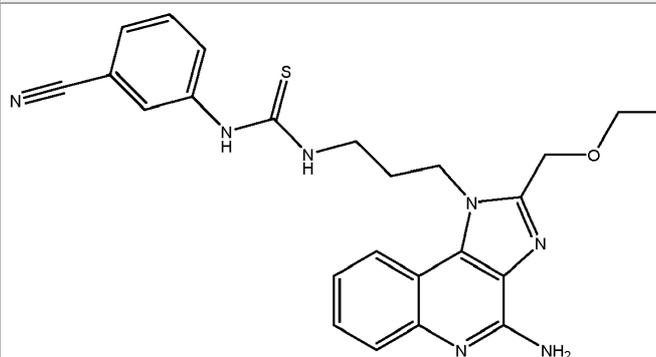
1-{4-[(3,5-diclorofenil)sulfonil]butil}-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina



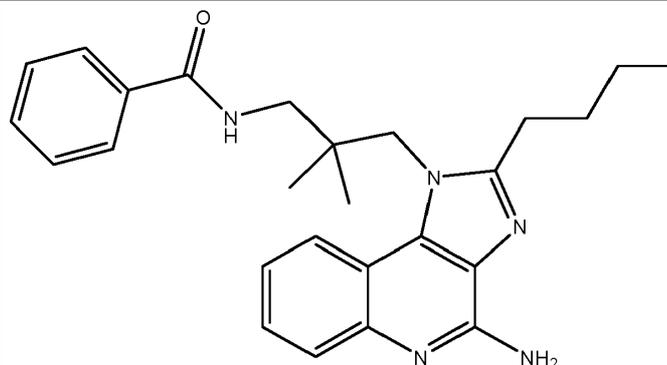
N-(2-{2-[4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]etoxi}etil)-n'-ciclohexilurea

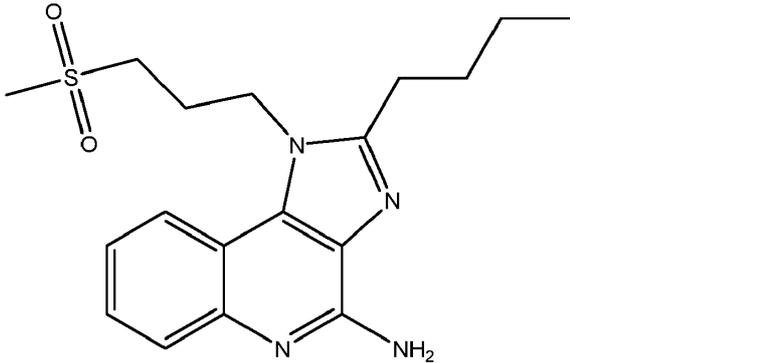
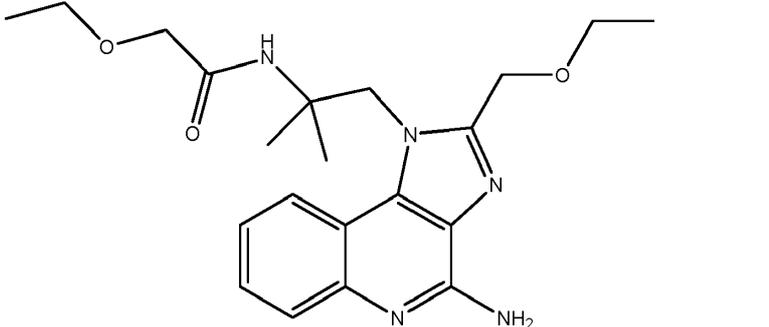
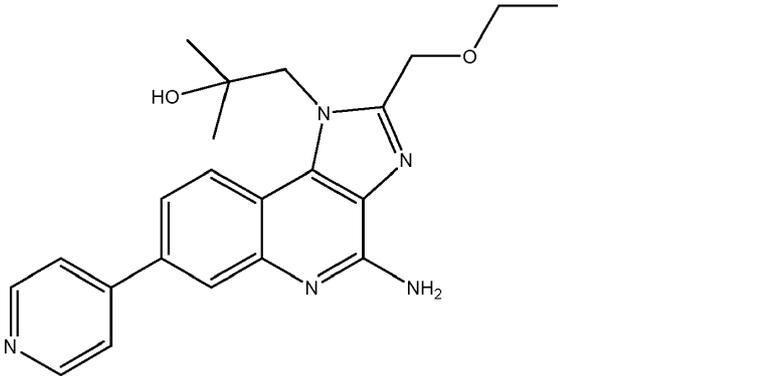
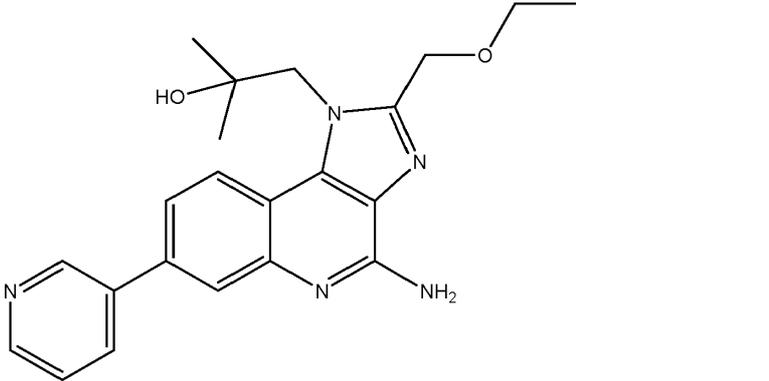


N-{3-[4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]propil}-n'-(3-cianofenil)tiurea

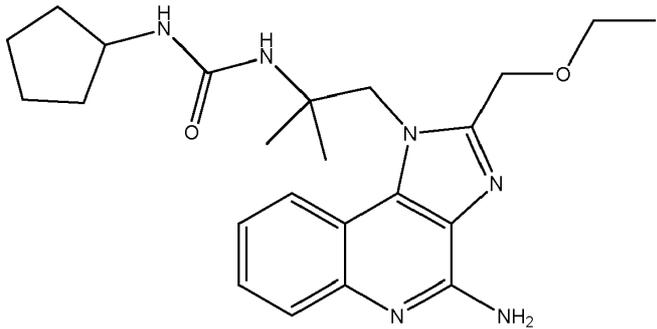
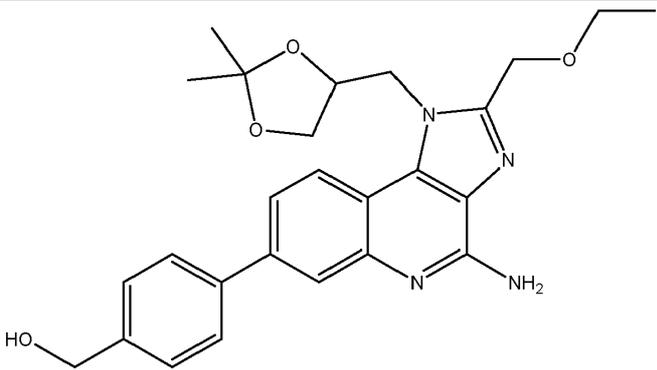
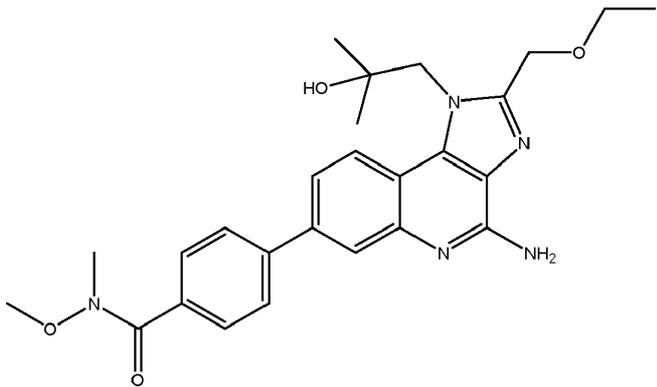
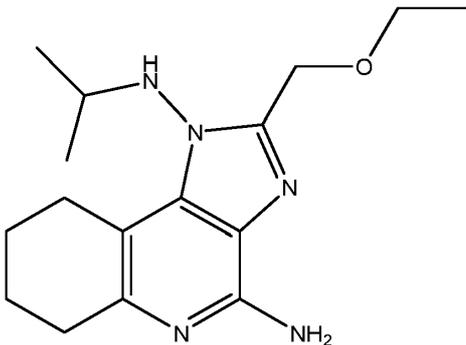


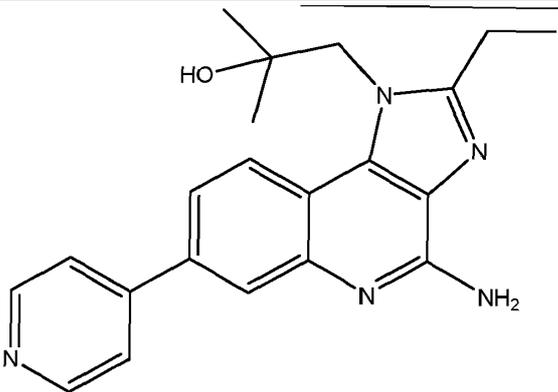
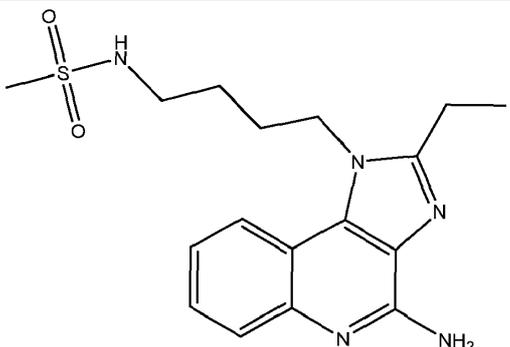
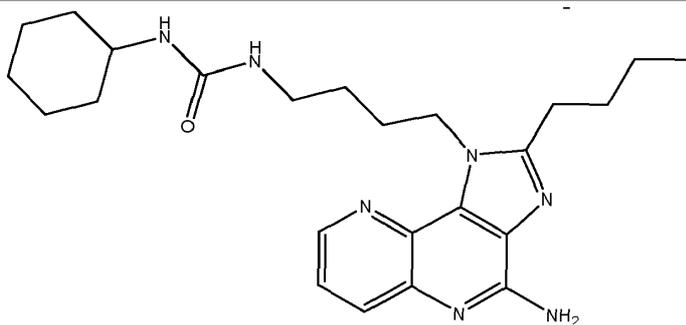
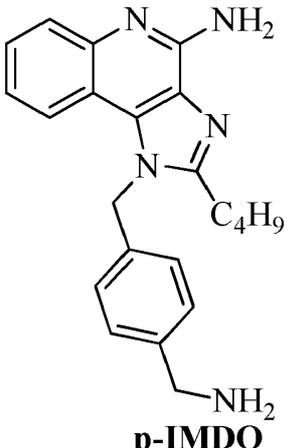
N-[3-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-2,2-dimetilpropil]benzamida

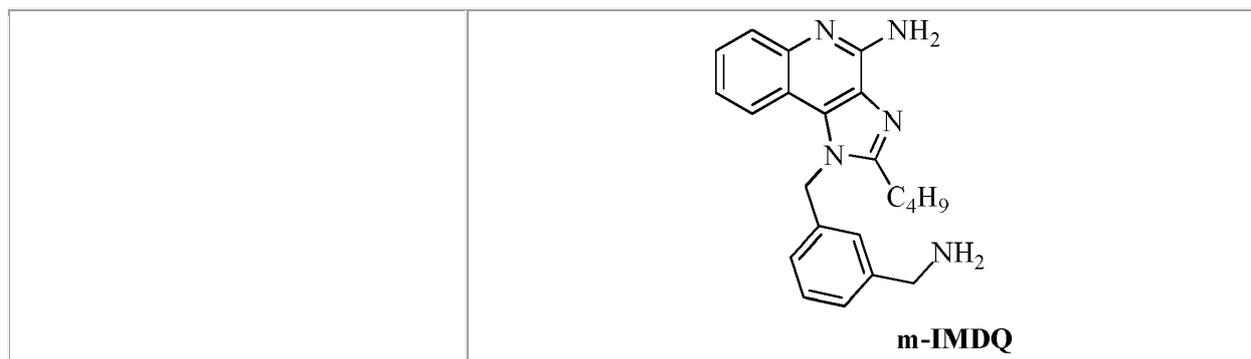


2-butil-1-[3-(metilsulfonil)propil]-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina	
N-[2-[4-amino-2-(etoximetil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-1,1-dimetiletil]-2-etoxiacetamida	
1-[4-amino-2-etoximetil-7-(piridin-4-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol	
1-[4-amino-2-(etoximetil)-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol	

<p>N-(3-[4-amino-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-(metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-il]fenil)metanosulfonamida</p>	
<p>1-[4-amino-7-(5-hidroximetilpiridin-3-il)-2-(2-metoxietil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol</p>	
<p>3-[4-amino-2-(etoximetil)-7-(piridin-3-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]propano-1,2-diol</p>	
<p>1-[2-(4-amino-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-1,1-dimetiletil]-3-propilurea</p>	

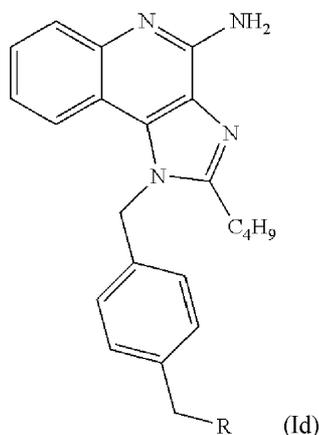
1-[2-(4-amino-2-etoximetil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)-1,1-dimetiletil]-3-ciclopentilurea	
1-[(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metil]-2-(etoximetil)-7-(4-hidroximetilfenil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina	
4-[4-amino-2-etoximetil-1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-7-il]-N-metoxi-N-metilbenzamida	
2-etoximetil-N1-isopropil-6,7,8,9-tetrahidro-1H-imidazo[4,5-c]quinolino-1,4-diamina	

<p>1-[4-amino-2-etil-7-(piridin-4-il)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il]-2-metilpropan-2-ol</p>	
<p>N-[4-(4-amino-2-etil-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-il)butil]metanosulfonamida</p>	
<p>N-[4-(4-amino-2-butil-1H-imidazo[4,5-c][1,5]naftiridin-1-il)butil]-n'-ciclohexilurea</p>	
	 <p>p-IMDQ</p>



AM en la presente invención es Resiquimod.

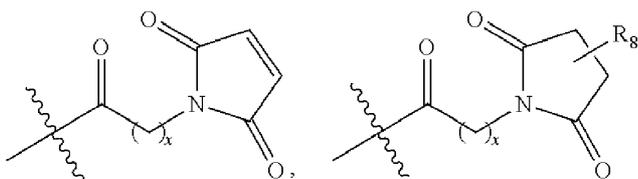
El AM de la presente divulgación puede comprender derivados de imidazoquinolina que tienen la estructura de fórmula (Id):



5

en donde R se selecciona del grupo que consiste en: -NH(R₅) e isotiocianato (-NCS);

R₅ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno (-H), acetilo, -CO-terc-Bu (-Boc), -CO-(CH₂)_x-R₆, alquilo C₁-C₁₆, -CO-4-(ácido fenilborónico), -C(S)-NH-(CH₂)_x-NH-(CH₂)_x-NH-(CH₂)_x-NH₂,



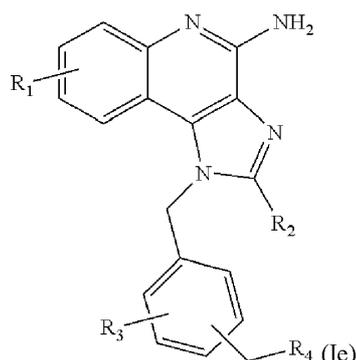
10 R₆ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquino, azido, ácido carboxílico y -CONH-(CH₂)_x-O-(CH₂)_x-O-(CH₂)_x-O-R₇;

R₇ se selecciona del grupo que consiste en amino, isotiocianato y -NH-CO-(CH₂)_x-CO₂H;

R₈ se selecciona entre un radical de antígeno peptídico o un radical de antígeno proteico; y

x es cualquier número entero de 1 a 10.

15 El AM puede comprender un derivado de imidazoquinolina que tiene la estructura de fórmula (Ie):

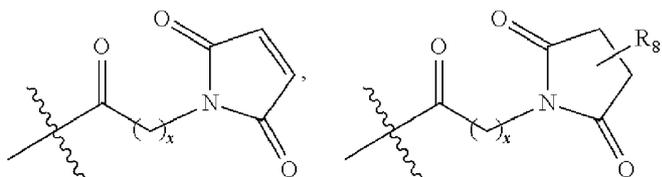


en donde, R₁ y R₃ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, nitro, -NH₂, azido, hidroxilo, -CF₃, ácido carboxílico y -CO₂R₂;

R₂ es un alquilo C₂-C₅, y

5 R₄ se selecciona del grupo que consiste en: -NH(R₅) e isotiocianato;

R₅ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, acetilo, -CO-terc-Bu (-Boc), -CO-(CH₂)_x-R₆, alquilo C₁-C₁₆, -CO-4-(ácido fenilborónico), -C(S)-NH-(CH₂)_x-NH-(CH₂)_x-NH-(CH₂)_x-NH₂,



10 R₆ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, azido, ácido carboxílico y -CONH-(CH₂)_x-O-(CH₂)_x-O-(CH₂)_x-O-(CH₂)_x-R₇;

R₇ se selecciona del grupo que consiste en amino, isotiocianato y -NH-CO-(CH₂)_x-CO₂H;

R₈ se selecciona entre un radical de antígeno peptídico o un radical de antígeno proteico; y

x es cualquier número entero de 1 a 10. Publicación de la Solicitud de Patente. de Estados Unidos Núm. 20140256922 A1.

15 En general, cuando el AM comprende derivados de imidazoquinolina que tienen la estructura de fórmula (Id) o fórmula (Ie), el AM se ancla al conector en posiciones, tales como en el NH₂ o R de la fórmula (Id), o el NH₂ o R₄ de la fórmula (Ie).

Radical de direccionamiento

En general, los compuestos de la presente invención comprenden un radical de direccionamiento.

20 Por "radical de direccionamiento (TM)" o "agente de direccionamiento" aquí se entiende una molécula, complejo o agregado que se une específica o selectivamente a una molécula, célula, partícula, tejido o agregado diana, que generalmente se denomina "diana" o "marcador", y estos se analizan con más detalle en el presente documento.

25 El radical de direccionamiento de la divulgación puede comprender una inmunoglobulina, una proteína, un péptido, una molécula pequeña, una nanopartícula o un ácido nucleico. El radical de direccionamiento de la invención comprende una inmunoglobulina.

30 Los agentes de direccionamiento ilustrativos tales como anticuerpos (p. ej., quiméricos, humanizados y humanos), ligandos para receptores, lecitinas y sacáridos, y sustratos para ciertas enzimas son reconocidos en la técnica y son útiles sin limitación en la práctica de la presente invención. Otros agentes de direccionamiento incluyen una clase de compuestos que no incluyen motivos de reconocimiento molecular específicos que incluyen nanopartículas, macromoléculas tales como poli(etilenglicol), polisacáridos y poliaminoácidos que añaden masa molecular al radical de activación. La masa molecular adicional afecta a la farmacocinética del radical de activación, p. ej., a la semivida en suero.

35 Un radical de direccionamiento de la divulgación puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo biespecífico u otra molécula o compuesto basado en anticuerpos. En algunas realizaciones de la invención, el radical de direccionamiento es un anticuerpo. Sin embargo, en la técnica se conocen y se pueden utilizar otros ejemplos de radicales de direccionamiento, tales como aptámeros, avimeros, ligandos de unión a receptores, ácidos nucleicos,

pares de unión biotina-avidina, péptidos o proteínas de unión, etc. Los términos "radical de direccionamiento" y "radical de unión" se utilizan en el presente documento como sinónimos.

Por "diana " o "marcador" en el presente documento se entiende cualquier entidad que sea capaz de unirse específicamente a un radical de direccionamiento particular. En algunas realizaciones, las dianas se asocian específicamente con uno o más tipos de células o tejidos particulares. En algunas realizaciones, las dianas se asocian específicamente con uno o más estados de enfermedad particulares. En algunas realizaciones, las dianas se asocian específicamente con una o más fases de desarrollo particulares. Por ejemplo, un marcador específico del tipo de célula se expresa típicamente a niveles al menos 2 veces mayores en ese tipo de célula que en una población celular de referencia. En algunas realizaciones, el marcador específico del tipo de célula está presente en niveles de al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces o al menos 1.000 veces más que su expresión media en una población de referencia. La detección o medición de un marcador específico de tipo de célula puede hacer posible distinguir el tipo o tipos de células de interés de las células de muchos, la mayoría o todos los demás tipos. En algunas realizaciones, una diana puede comprender una proteína, un carbohidrato, un lípido y/o un ácido nucleico, como se describe en el presente documento.

Se considera que una sustancia es "dirigida" para los fines descritos en el presente documento si se une específicamente a un radical de direccionamiento de ácido nucleico. Un radical de direccionamiento de ácido nucleico se puede unir específicamente a una diana en condiciones rigurosas. Se considera que un complejo o compuesto que comprende un radical de direccionamiento está "dirigido" si el radical de direccionamiento se une específicamente a una diana, suministrando así el complejo o composición de compuesto completos a un órgano, tejido, célula, componente de matriz extracelular y/o compartimento intracelular específicos.

Un compuesto de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un radical de direccionamiento que se une específicamente a una o más dianas (p. ej., antígenos) asociadas con un órgano, tejido, célula, componente de matriz extracelular y/o compartimento intracelular. Los compuestos pueden comprender un radical de direccionamiento que se une específicamente a dianas asociadas con un órgano o sistema de órganos en particular. Los compuestos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender un radical de direccionamiento a núcleos que se une específicamente a una o más dianas intracelulares (p. ej., orgánulo, proteína intracelular). Los compuestos pueden comprender un radical de direccionamiento que se une específicamente a dianas asociadas con órganos, tejidos, células, componentes de la matriz extracelular y/o compartimentos intracelulares enfermos. Los compuestos pueden comprender un radical de direccionamiento que se une específicamente a dianas asociadas con tipos de células particulares (p. ej., células endoteliales, células cancerosas, células malignas, células de cáncer de próstata, etc.).

Los compuestos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender un radical de direccionamiento que se une a una diana que es específica para uno o más tipos de tejido particulares (p. ej., tejido hepático frente a tejido prostático). Los compuestos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender un radical de direccionamiento que se une a una diana que es específica para uno o más tipos de células particulares (p. ej., células T frente a células B). Los compuestos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender un radical de direccionamiento que se une a una diana que es específica para uno o más estados patológicos particulares (p. ej., células tumorales frente a células sanas). Los compuestos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender un radical de direccionamiento que se une a una diana que es específica para una o más fases de desarrollo particulares (p. ej., células madre frente a células diferenciadas).

Una diana puede ser un marcador que está asociado exclusiva o principalmente a uno o unos pocos tipos de células, con una o unas pocas enfermedades y/o con una o unas pocas fases de desarrollo. Un marcador específico de tipo celular se expresa típicamente a niveles al menos 2 veces mayores en ese tipo celular que en una población de células de referencia que puede consistir, por ejemplo, en una mezcla que contiene células de una pluralidad (p. ej., 5-10 o más) de diferentes tejidos u órganos en cantidades aproximadamente iguales. En algunas realizaciones, el marcador específico de tipo celular está presente a niveles de al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces o al menos 1.000 veces mayor que su expresión promedio en una población de referencia. La detección o medición de un marcador específico de tipo celular puede hacer posible distinguir el tipo o tipos de células de interés de las células de muchos, la mayoría o todos los demás tipos.

Una diana puede comprender una proteína, un carbohidrato, un lípido y/o un ácido nucleico. Una diana puede comprender una proteína y/o una porción característica de la misma, tal como un marcador tumoral, integrina, receptor de superficie celular, proteína transmembrana, proteína intercelular, canal iónico, proteína transportadora de membrana, enzima, anticuerpo, proteína quimérica, glicoproteína, etc. Una diana puede comprender un carbohidrato y/o una porción característica del mismo, tal como una glicoproteína, azúcar (p. ej., monosacárido, disacárido, polisacárido), glicocalix (es decir, la zona periférica rica en carbohidratos en la superficie exterior de la mayoría de las células eucarióticas), etc. Una diana puede comprender un lípido y/o una porción característica del mismo, tal como un aceite, ácido graso, glicérido, hormona, esteroide (p. ej., colesterol, ácido biliar), vitamina (p. ej., vitamina E), fosfolípido, esfingolípido, lipoproteína, etc. Una diana puede comprender un ácido nucleico y/o una porción característica del mismo, tal como un ácido nucleico de ADN; ácido nucleico de ARN; ácido nucleico de ADN modificado; ácido nucleico de ARN modificado; ácido nucleico que incluye cualquier combinación de ADN, ARN, ADN

modificado y ARN modificado.

Se conocen numerosos marcadores en la técnica. Los marcadores típicos incluyen proteínas de la superficie celular, por ejemplo, receptores. Los receptores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, el receptor de transferrina; receptor de LDL; receptores de factores de crecimiento tales como miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (p. ej., EGFR, Her2, Her3, Her4) o receptores del factor de crecimiento endotelial vascular, receptores de citocinas, moléculas de adhesión celular, integrinas, selectinas y moléculas de CD. El marcador puede ser una molécula que esté presente exclusivamente o en mayores cantidades en una célula maligna, p. ej., un antígeno tumoral.

En algunas realizaciones, el radical de direccionamiento se une a una célula tumoral específicamente o preferiblemente en comparación con una célula no tumoral.

La unión del radical de direccionamiento a la célula tumoral se puede medir utilizando ensayos conocidos en la técnica.

La célula tumoral puede ser de un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, un mieloma o un cáncer del sistema nervioso central.

El radical de direccionamiento puede ser capaz de unirse a un antígeno tumoral específicamente o preferiblemente en comparación con un antígeno no tumoral.

Por "se une específicamente" o "se une preferiblemente" en el presente documento se entiende que la unión entre dos compañeros de unión (p. ej., entre un radical de direccionamiento y su compañero de unión) es selectiva para los dos compañeros de unión y se puede discriminar de interacciones no deseadas o no específicas. Por ejemplo, la capacidad de un radical de unión a antígeno para unirse a un determinante antigénico específico puede medirse a través de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) u otros mecanismos familiares para un experto en la técnica, p. ej., técnica de resonancia de plasmón superficial (analizada en un instrumento BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) y ensayos de unión tradicionales (Heeley, Endoc Res 28, 217-229 (2002)). Los términos "anticuerpo anti-[antígeno]" y "un anticuerpo que se une a [antígeno]" se refieren a un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno respectivo con suficiente afinidad para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el direccionamiento hacia el antígeno. En algunas realizaciones, el grado de unión de un anticuerpo anti-[antígeno] a una proteína no relacionada es inferior a aproximadamente 10% de la unión del anticuerpo al antígeno medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). Un anticuerpo que se une a [antígeno] puede tener una constante de disociación (KD) de $< 1 \mu\text{M}$, $< 100 \text{ nM}$, $< 10 \text{ nM}$, $< 1 \text{ nM}$, $< 0,1 \text{ nM}$, $< 0,01 \text{ nM}$ o $< 0,001 \text{ nM}$ (p. ej. 10^{-8} M o menos, p. ej. de 10^{-8} M a 10^{-13} M , p. ej., de 10^{-9} M a 10^{-13} M). Se entiende que la definición anterior también es aplicable a radicales de unión a antígeno que se unen a un antígeno.

Una diana puede ser un marcador tumoral. Un marcador tumoral puede ser un antígeno que está presente en un tumor que no está presente en órganos, tejidos y/o células normales. Un marcador tumoral puede ser un antígeno que prevalece más en un tumor que en órganos, tejidos y/o células normales. Un marcador tumoral puede ser un antígeno que prevalece más en las células cancerosas malignas que en las células normales.

En el presente documento, "antígeno tumoral" significa una sustancia antigénica producida en células tumorales, es decir, desencadena una respuesta inmunitaria en el anfitrión. Las proteínas normales en el organismo no son antigénicas debido a la autotolerancia, un proceso en el que los linfocitos T citotóxicos (CTL) que reaccionan por sí mismos y los linfocitos B productores de autoanticuerpos se eliminan "centralmente" en el tejido linfático primario (BM) y "periféricamente" en tejido linfático secundario (principalmente timo para las células T y bazo/ganglios linfáticos para las células B). Por lo tanto, cualquier proteína que no esté expuesta al sistema inmunitario desencadena una respuesta inmunitaria. Esto puede incluir proteínas normales que están bien secuestradas del sistema inmunitario, proteínas que normalmente se producen en cantidades extremadamente pequeñas, proteínas que normalmente se producen solo en ciertas fases de desarrollo o proteínas cuya estructura se modifica debido a una mutación.

Una diana puede expresarse preferiblemente en tejidos y/o células tumorales frente a tejidos y/o células normales.

Un marcador puede ser un marcador tumoral. El marcador puede ser un polipéptido que se expresa a niveles más altos en las células que se dividen que en las que no se dividen. Por ejemplo, Her-2/neu (también conocido como ErbB-2) es un miembro de la familia de receptores de EGF y se expresa en la superficie celular de los tumores asociados con el cáncer de mama. Otro ejemplo es un péptido conocido como F3 que es un agente de direccionamiento adecuado para dirigir una nanopartícula a la nucleolina (Porkka et al., 2002, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 99:7444; y Christian et al., 2003, J. Cell Biol., 163:871). Se ha demostrado que las partículas dirigidas que comprenden una nanopartícula y el aptámero A10 (que se une específicamente a PSMA) pudieron suministrar docetaxel de manera específica y eficaz a los tumores de cáncer de próstata.

Los anticuerpos u otros fármacos que se dirigen específicamente a estas dianas tumorales interfieren específicamente y regulan las vías de señalización del comportamiento biológico de las células tumorales, regulan directamente o bloquean la vía de señalización para inhibir el crecimiento de células tumorales o inducir la apoptosis. Hasta la fecha, se han aprobado docenas de fármacos diana para la investigación y el tratamiento clínicos de tumores sólidos o neoplasias malignas hematológicas, y existen varios fármacos dirigidos para neoplasias hematológicas malignas.

Los antígenos tumorales (o dianas tumorales) pueden incluir CD2, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79 y CD137.

5 Los antígenos tumorales (o dianas tumorales) pueden incluir 4-1BB, 5T4, AGS-5, AGS-16, Angiopoyetina 2, B7.1, B7.2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, *BTLA*, CAIX, antígeno Carcinoembrionario, CTLA4, Cripto, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, Fibronectina, Receptor de Folato, Gangliósido
10 GM3, GD2, receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGF1R, integrina α v, integrina α v β , KIR, LAG-3, antígeno de Lewis Y, Mesotelina, c-MET, anhidrasa carbónica IX MN, MUC1, MUC16, nectina-4, NKGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, Syndecan-1, TACI, TAG-72, Tenascina, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 y variantes de los mismos. Las variantes del antígeno tumoral abarcan varios mutantes o polimorfismos conocidos en la técnica y/o de origen natural. El antígeno tumoral según la invención es ErbB2 (Her2) o EGFR.

El radical de direccionamiento puede comprender un anticuerpo.

15 Por "inmunoglobulina" o "anticuerpo" en el presente documento se entiende una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formada por procesos de recombinación de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales) (p. ej., un anticuerpo IgG) o una porción inmunológicamente activa (es decir, que se une específicamente) de una molécula de inmunoglobulina, como un fragmento de anticuerpo. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden conjugarse o derivatizarse de otro modo dentro del alcance del objeto reivindicado. Tales anticuerpos incluyen IgG1, IgG2a, IgG3, IgG4 (y subformas de IgG4), así como isotipos de IgA.

20 El término "anticuerpo" en el presente documento se emplea en el sentido más amplio y abarca varias estructuras de anticuerpos, incluidos, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos siempre que muestren la actividad de unión al antígeno deseada y comprendan una región Fc o una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto", y "anticuerpo completo" se utilizan en el presente documento indistintamente para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de un anticuerpo nativo o que tiene cadenas pesadas que contienen una
25 región Fc como se define en el presente documento.

30 Por "anticuerpos nativos" en el presente documento se entienden moléculas de inmunoglobulina de origen natural con estructuras variables. Por ejemplo, los anticuerpos IgG nativos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que están unidas por puentes de disulfuro. Del extremo N- al extremo C-terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también llamada dominio pesado variable o dominio variable de cadena pesada, seguida de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3), también llamada región constante de cadena pesada. Del mismo modo, desde el extremo N- al extremo C-terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada dominio variable ligero o dominio variable de cadena ligera, seguida de un dominio ligero constante (CL), también denominado región constante de cadena ligera. La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

35 Por "fragmento de anticuerpo" en el presente documento se entiende una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una porción de un anticuerpo intacto que se une al antígeno al que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla (p. ej., scFv), anticuerpos de dominio único y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Para una revisión de los fragmentos scFv, véase, p. ej. Plückerthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994); véanse también el documento WO 93/16185; y las Patentes de Estados Unidos
40 Núm. 5.571.894 y 5.587.458. Para una discusión de los fragmentos Fab y F(ab')₂ que comprenden restos de epítipo de unión al receptor de rescate y que tienen una semivida in vivo aumentada, véase la Patente de Estados Unidos Núm. 5.869.046. Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véanse, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); y Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también son descritos por Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase p. ej. la Patente de Estados Unidos Núm. 6.248.516 B1). Los fragmentos de anticuerpos pueden fabricarse mediante diversas técnicas, que incluyen, pero sin limitarse a, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células anfitrionas recombinantes (p. ej., E. coli o fago), como se describe en el presente documento.
55

60 Por "dominio de unión a antígeno" en el presente documento se entiende la parte de un anticuerpo que comprende la zona que se une específicamente y es complementaria a parte o la totalidad de un antígeno. Un dominio de unión a antígeno puede ser proporcionado, por ejemplo, por uno o más dominios variables de anticuerpos (también denominados regiones variables de anticuerpos). En particular, un dominio de unión a antígeno comprende una región

variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo.

Por "región variable" o "dominio variable" en el presente documento se entiende el dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicada en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) conservadas y tres regiones hipervariables (HVR). Véanse, p. ej., Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6ª ed., W.H. Freeman and Co., página 91 (2007). Un solo dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno.

Por "región hipervariable" o "HVR" en el presente documento se entiende cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente ("bucles hipervariables"). Generalmente, los anticuerpos nativos de cuatro cadenas comprenden seis HVR, tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR generalmente comprenden restos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), teniendo estas últimas la más alta variabilidad de secuencia y/o estando implicadas en el reconocimiento de antígenos. Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR generalmente comprenden los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las regiones hipervariables (HVR) también se denominan "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), y estos términos se emplean en el presente documento indistintamente en referencia a porciones de la región variable que forman las regiones de unión al antígeno. Esta región particular ha sido descrita por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (1983) y por Chothia et al., *J Mol Biol* 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen solapamientos o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo esté dentro del alcance del término tal como se define y se emplea en el presente documento. Los números de restos exactos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar rutinariamente qué restos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos o proteínas de fusión de anticuerpos.

Por "anticuerpo quimérico" en el presente documento se entiende una proteína recombinante que contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, incluidas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo obtenido de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, más preferiblemente un anticuerpo murino, mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se obtienen de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones veterinarias, los dominios constantes del anticuerpo quimérico se pueden obtener de los de otras especies, tales como un primate subhumano, un gato o un perro.

Por "anticuerpo humanizado" en el presente documento se entiende una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie; p. ej., un anticuerpo de roedor, se transfieren desde las cadenas variables pesadas y ligeras del anticuerpo de roedor a los dominios variables pesados y ligeros humanos. Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se obtienen de los de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, los restos específicos de la región marco del anticuerpo humanizado, particularmente aquellos que tocan o están cerca de las secuencias CDR, pueden modificarse, por ejemplo, reemplazarse por los restos correspondientes del anticuerpo de roedor, primate subhumano u otro original.

Por "anticuerpo humano" en el presente documento se entiende un anticuerpo obtenido, por ejemplo, a partir de ratones transgénicos que han sido "modificados por ingeniería genética" para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición antigénica. En esta técnica, los elementos del locus de cadena ligera y pesada humana se introducen en cepas de ratones obtenidas de líneas de células madre embrionarias que contienen interrupciones elegidas como diana de los loci endógenos de cadena pesada y cadena ligera. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden usarse para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos son descritos por Green et al., *Nature Genet.* 7: 13 (1994), Lonberg et al., *Nature* 368:856 (1994), y Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579 (1994). También se puede construir un anticuerpo completamente humano mediante métodos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de presentación en fagos, todos los cuales son conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990) para la producción de anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. En esta técnica, los genes del dominio variable del anticuerpo se clonan en marco en un gen de la proteína de la cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de hebra sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. De esta forma, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos se puede realizar en una variedad de formatos, para su revisión, véase, p. ej., Johnson y Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:5564-571 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas in vitro. Véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.567.610 y 5.229.275.

Por "proteína de fusión de anticuerpo" se entiende en el presente documento una molécula de unión a antígeno producida de forma recombinante en la que se unen dos o más del mismo o diferente anticuerpo natural, anticuerpo monocatenario o segmentos de fragmentos de anticuerpo con las mismas o diferentes especificidades. Una proteína de fusión comprende al menos un sitio de unión específico. La valencia de la proteína de fusión indica el número total de brazos o sitios de unión que tiene la proteína de fusión para uno o varios antígenos o epítopos; es decir, monovalente, bivalente, trivalente o multivalente. La multivalencia de la proteína de fusión de anticuerpos significa que puede aprovechar múltiples interacciones al unirse a un antígeno, aumentando así la avididad de unión al antígeno, o a diferentes antígenos. La especificidad indica a cuántos tipos diferentes de antígenos o epítopos se puede unir una proteína de fusión de anticuerpo; es decir, monoespecífico, biespecífico, trispecífico, multispecífico. Utilizando estas definiciones, un anticuerpo natural, p. ej., una IgG, es bivalente porque tiene dos brazos de unión pero es monoespecífico porque se une a un tipo de antígeno o epítipo. Una proteína de fusión multivalente monoespecífica tiene más de un sitio de unión para el mismo antígeno o epítipo. Por ejemplo, un diacuerpo monoespecífico es una proteína de fusión con dos sitios de unión reactivos con el mismo antígeno. La proteína de fusión puede comprender una combinación multivalente o multispecífica de diferentes componentes de anticuerpos o múltiples copias del mismo componente de anticuerpos. La proteína de fusión puede comprender adicionalmente un agente terapéutico.

De acuerdo con la divulgación, el radical de direccionamiento comprende un proanticuerpo, tal como los divulgados en las Patentes de Estados Unidos Núm. 8.518.404; 8.513.390; y en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm.; 20120237977A1, 20120149061A1, 20130150558A1.

Los proanticuerpos son anticuerpos monoclonales que se activan selectivamente dentro del microambiente canceroso, enfocando la actividad de los anticuerpos terapéuticos a los tumores y preservando el tejido sano.

En general, el proanticuerpo comprende al menos un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo (denominados colectivamente "AB"), capaces de unirse específicamente a una diana, en donde el AB está modificado por un radical de enmascaramiento (MM). Cuando el AB se modifica con un MM y está en presencia de la diana, la unión específica del AB a su diana se puede reducir o inhibir, en comparación con la unión específica del AB no modificado con un MM o la unión específica del AB parental a la diana. La constante de disociación (Kd) del MM hacia el AB es generalmente mayor que la Kd del AB hacia la diana. Cuando el AB se modifica con un MM y está en presencia de la diana, la unión específica del AB a su diana se puede reducir o inhibir, en comparación con la unión específica del AB no modificado con un MM o la unión específica del AB parental a la diana. Cuando un AB se acopla a, o se modifica por medio de un MM, el MM puede "enmascarar" o reducir, o inhibir la unión específica del AB a su diana. Cuando un AB está acoplado o modificado por un MM, tal acoplamiento o modificación puede efectuar un cambio estructural que reduce o inhibe la capacidad del AB para unirse específicamente a su diana.

El proanticuerpo puede ser un anticuerpo activable (AA) donde el AB modificado por un MM puede incluir adicionalmente uno o más radicales escindibles (CM). Tales AA exhiben una unión activable/conmutable a la diana de AB. Los AA generalmente incluyen un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (AB), modificado o acoplado a un radical de enmascaramiento (MM) y un radical modificable o escindible (CM). En algunas realizaciones, el CM contiene una secuencia de aminoácidos que sirve como sustrato para una proteasa de interés. En otras realizaciones, el CM proporciona un enlace disulfuro cisteína-cisteína que se puede escindir por reducción. En otras realizaciones más, el CM proporciona un sustrato fotolítico que es activable por fotólisis.

El CM y el AB del AA pueden seleccionarse de modo que el AB represente un radical de unión para una diana de interés, y el CM represente un sustrato para una proteasa que se localiza con la diana en un sitio de tratamiento en un sujeto. Como alternativa o adicionalmente, el CM es un enlace disulfuro cisteína-cisteína que se puede escindir como resultado de la reducción de este enlace disulfuro. Los AA contienen al menos uno de un CM escindible por proteasa o un enlace disulfuro cisteína-cisteína, y en algunas realizaciones incluyen ambos tipos de CM. Los AA pueden alternativamente o adicionalmente incluir un sustrato fotolábil, activable por una fuente de luz. Los AA divulgados en el presente documento encuentran un uso particular cuando, por ejemplo, una proteasa capaz de escindir un sitio en el CM está presente a niveles relativamente más altos en el tejido que contiene la diana de un sitio de tratamiento (por ejemplo, tejido enfermo; por ejemplo, para tratamiento terapéutico o tratamiento diagnóstico) que en tejido de sitios no tratados (por ejemplo, en tejido sano). Los AA divulgados en el presente documento también encuentran un uso particular cuando, por ejemplo, un agente reductor capaz de reducir un sitio en el CM está presente a niveles relativamente más altos en el tejido que contiene la diana de un sitio de tratamiento o diagnóstico que en el tejido de sitios sin tratamiento ni diagnóstico. Los AA divulgados en el presente documento también encuentran un uso particular cuando, por ejemplo, se introduce una fuente de luz, por ejemplo, por medio de láser, capaz de fotolizar un sitio en el CM en un tejido que contiene la diana de un sitio de tratamiento o diagnóstico.

Los AA pueden proporcionar reducción de la toxicidad y/o de los efectos secundarios adversos que de otro modo podrían resultar de la unión del AB a sitios que sin tratamiento si el AB no se enmascarara o se inhibiera de otro modo su unión a la diana. Cuando el AA contiene un CM que se puede escindir mediante un agente reductor que facilita la reducción de un enlace disulfuro, los AB de tales AA pueden seleccionarse para explotar la activación de un AB donde una diana de interés está presente en un sitio de tratamiento deseado caracterizado por niveles elevados de un agente reductor, de modo que el ambiente tenga un potencial de reducción mayor que, por ejemplo, un ambiente de un sitio sin tratamiento.

En general, un AA se puede diseñar seleccionando un AB de interés y construyendo el resto del AA de modo que,

cuando esté restringido conformacionalmente, el MM proporcione el enmascaramiento del AB o la reducción de la unión del AB a su diana. Criterios de diseño estructural a tener en cuenta para prever esta característica funcional.

El radical de direccionamiento puede ser un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, que se selecciona en función de su especificidad por un antígeno expresado sobre una célula diana o en un sitio diana de interés. Se ha identificado una amplia variedad de antígenos específicos de tumores o específicos de otras enfermedades y se han usado o propuesto anticuerpos contra esos antígenos para su uso en el tratamiento de tales tumores u otras enfermedades. Los anticuerpos que se conocen en la técnica se pueden utilizar en los compuestos de la invención, en particular para el tratamiento de la enfermedad con la que está asociado el antígeno diana. Los ejemplos de antígenos diana (y sus enfermedades asociadas) a los que se puede dirigir un producto conjugado de anticuerpo-conector-fármaco de la invención incluyen: CD2, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79, CD137, 4-1BB, 5T4, AGS-5, AGS-16, Angiopoyetina 2, B7.1, B7.2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, Antígeno carcinoembrionario, CTLA4, Cripto, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, Fibronectina, Receptor de folato, Gangliósido GM3, GD2, receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GTR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGF1R, Integrina α v, Integrina α v β , KIR, LAG-3, Lewis Y, Mesotelina, c-MET, Anhidrasa carbónica IX MN, MUC1, MUC16, Nectina-4, NKGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, Syndecan-1, TACI, TAG-72, Tenascina, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3.

Los anticuerpos divulgados incluyen Rituxan (rituximab), Herceptin (trastuzumab), Erbitux (cetuximab), Vectibix (Panitumumab), Arzerra (Ofatumumab), Benlysta (belimumab), Yervoy (ipilimumab), Perjeta (Pertuzumab), Tremelimumab, Nivolumab, Dacetuzumab, Urelumab, MPDL3280A, Lambrolizumab y Blinatumomab.

Rituxan (Rituximab) es un anticuerpo quimérico utilizado para el tratamiento del linfoma no Hodgkin de células B. Actúa sobre la superficie de las células B expresando el antígeno CD20 que se expresa en 90% de los linfomas no Hodgkin de células B. Rituxan se une a CD20 para inducir la lisis de células B a través de CDC y ADCC, así como sensibilizar los linfocitos humanos que son resistentes a los fármacos para algunos agentes quimioterapéuticos citotóxicos.

Herceptin (Trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado que actúa sobre el dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano de Her2, que se expresa en 25%-30% de los casos de cáncer de mama. Se cree que Trastuzumab tiene un efecto antitumoral a través de (1) la regulación por disminución del receptor Her2, la inhibición de las vías de transducción de señalización intracelular de Her2 y la inducción de la apoptosis; (2) mecanismos inmunitarios relacionados con ADCC y CDC dependientes de anticuerpos para destruir células tumorales; (3) mejorar los efectos de la quimioterapia.

Erbitux (Cetuximab) es un anticuerpo quimérico que actúa sobre el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Erbitux se une al EGFR para inhibir su vía de transducción de señales, lo que afecta a la proliferación celular, la invasión y la metástasis, y la angiogénesis. La inhibición de la vía de transducción de señales de EGFR puede mejorar la eficacia de los fármacos de quimioterapia y la radioterapia.

Avastin (Bevacizumab) es un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Su unión a VEGFR inhibe el VEGF y la transducción de señales, lo que da como resultado la inhibición de la angiogénesis tumoral.

Otros anticuerpos que actualmente se encuentran en desarrollo también pueden usarse como radical de direccionamiento. Por ejemplo, se están desarrollando anticuerpos monoclonales terapéuticos contra las siguientes dianas para el tratamiento de tumores: CD2, CD19, CD20, CD22, CD27, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD52, CD56, CD70, CD79 y CD137 y las siguientes dianas para el tratamiento de tumores: 4-1BB, 5T4, AGS-5, AGS-16, Angiopoyetina 2, B7.1, B7.2, B7DC, B7H1, B7H2, B7H3, BT-062, BTLA, CAIX, Antígeno carcinoembrionario, CTLA4, Cripto, ED-B, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, EGFL7, EpCAM, EphA2, EphA3, EphB2, FAP, Fibronectina, Receptor de folato, Gangliósido GM3, GD2, receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GTR), gp100, gpA33, GPNMB, ICOS, IGF1R, integrina α v, integrina α v β , KIR, LAG-3, Lewis, Mesotelina, c-MET, anhidrasa carbónica IX MN, MUC1, MUC16, nectina-4, NKGD2, NOTCH, OX40, OX40L, PD-1, PDL1, PSCA, PSMA, RANKL, ROR1, ROR2, SLC44A4, Syndecan-1, TACI, TAG-72, Tenascina, TIM3, TRAILR1, TRAILR2, VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 y sus variantes. (Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody Therapy of Cancer. Nat Rev Cancer. 2012 22 de marzo; 12 (4): 278-87).

El radical de direccionamiento puede comprender un Fab, Fab', F(ab')₂, anticuerpo de dominio único, dímero T y Ab, Fv, scFv, dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpo lineal, minianticuerpo, diacuerpo, fragmento de anticuerpo biespecífico, bianticuerpo, trianticuerpo, sc-diacuerpo, cuerpo kappa (λ), BiTE, DVD-Ig, SIP, SMIP, DART o un análogo de anticuerpo que comprende una o más CDR.

La siguiente tabla muestra las diversas estructuras de anticuerpos y las dianas que se están estudiando.

Tabla 2

Estructura del anticuerpo	Diana Ilustrativa
scfv	CC49, ERBB2, Ley
Diacuerpo	Ley y TAG-72
Aficuerpo	ERBB2
Minianticuerpo	CEA, ERBB2
Proteína-Fc	Angiopoyetina 1, angiopoyetina 2, VEGFR1, VEGFR2
IgG intacta	CD20, CD33, EGFR, ERBB2, VEGF
IgE e IgM	GM2
Productos conjugados de fármacos	CD30, CD33 y ERBB2
Nanopartículas cargadas	A33, EGFR y transferrina
Biespecíficos	CD19-CD3, EPCAM-CD3, gp100-CD3

El radical de direccionamiento divulgado puede comprender un polipéptido ATWLPPR de VEGFR, miméticos de trombospondina-1, polipéptido CDCRGDCFCG (cíclico), fragmento SCH 221153, polipéptido NCNGRC (cíclico), polipéptido CTTHWGFTLC, polipéptido CGNKRTRGC (LyP-1), Octreotida, Vapreotida, Lanreotida, polipéptido C-3940, Decapeptilo, Lupron, Zoladex o Cetorelix.

El radical de direccionamiento divulgado comprende ácido fólico o un derivado del mismo.

En los últimos años, la investigación sobre el ácido fólico ha progresado mucho. El ácido fólico es una vitamina de molécula pequeña que es necesaria para la división celular. Las células tumorales se dividen de manera anormal y hay una alta expresión del receptor de folato (FR) sobre la superficie de la célula tumoral para capturar suficiente ácido fólico para apoyar la división celular.

Los datos indican que la expresión de FR en las células tumorales es de 20 a 200 veces superior a la de las células normales. Las tasas de expresión de FR en varios tumores malignos son: 82% en cáncer de ovario, 66% en cáncer de pulmón de células no pequeñas, 64% en cáncer de riñón, 34% en cáncer de colon y 29% en cáncer de mama (Xia W, Low PS. Late-targeted therapies for cancer. J Med Chem. 2010; 14; 53 (19):6811-24). La tasa de expresión de FA y el grado de malignidad de la invasión y metástasis del tumor epitelial se correlacionan positivamente. El FA ingresa a la célula a través de endocitosis mediada por FR, y el FA a través de su grupo carboxilo forma complejos de FA con fármacos que ingresan a las células. En condiciones ácidas (valor de pH de 5), el FR se separa del FA y el FA libera fármacos en el citoplasma.

Clínicamente, el sistema se puede utilizar para suministrar fármacos que ataquen selectivamente a las células tumorales. El ácido fólico tiene un peso molecular pequeño, no tiene inmunogenicidad y tiene alta estabilidad, y su síntesis es económica. Lo que es más importante, el acoplamiento químico entre el fármaco y el portador es simple y, como tal, el uso de FA como molécula de direccionamiento para construir un sistema de suministro de fármacos se ha convertido en un punto clave de investigación para el tratamiento del cáncer. Actualmente EC145 (compuesto conjugado de fármaco para quimioterapia y FA) que se encuentra en ensayos clínicos puede atacar eficazmente las células cancerosas (Pribble P y Edelman MJ. EC145: a novel targeted agent for adenocarcinoma of the lung. Expert Opin. Investig. Drugs (2012) 21:755-761).

El radical de direccionamiento divulgado comprende dominios extracelulares (ECD) o formas solubles de PD-1, CTLA4, CD47, BTLA, KIR, TIM3, 4-1BB y LAG3, longitud completa o parcial de un ligando de superficie Anfirregulina, Betacelulina, EGF, Efrina, Epigen, Epirregulina, IGF, Neurregulina, TGF, TRAIL o VEGF.

El radical de direccionamiento divulgado comprende una partícula (partícula diana), tal como una nanopartícula, opcionalmente una nanopartícula dirigida que se ancla a una molécula de direccionamiento que puede unirse específica o de forma preferible a una diana. La partícula de direccionamiento por sí misma guía el compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, mediante enriquecimiento en células o tejido tumorales) y no hay moléculas de direccionamiento adicionales ancladas al mismo.

Por "nanopartícula" en el presente documento se entiende cualquier partícula que tenga un diámetro inferior a 1000 nm. Se pueden asociar un agente terapéutico y/o una molécula de direccionamiento a la matriz polimérica. La molécula de direccionamiento se puede asociar covalentemente con la superficie de una matriz polimérica. La asociación covalente está mediada por un conector. El agente terapéutico puede estar asociado con la superficie, encapsulado dentro, rodeado por y/o disperso a través de la matriz polimérica. Patente de Estados Unidos Núm. 8.246.968.

En general, las nanopartículas de la presente divulgación comprenden cualquier tipo de partícula. Se puede utilizar

cualquier partícula de acuerdo con la presente divulgación. Las partículas pueden ser biodegradables y biocompatibles. En general, una sustancia biocompatible no es tóxica para las células. Se puede considerar que una sustancia es biocompatible si su adición a las células da como resultado menos de cierto umbral de muerte celular. Una sustancia puede considerarse biocompatible si su adición a las células no induce efectos adversos. Una sustancia biodegradable puede ser aquella que se descompone en condiciones fisiológicas en el transcurso de un período de tiempo terapéuticamente relevante (p. ej., semanas, meses o años). Una sustancia biodegradable puede ser una sustancia que puede ser descompuesta por la maquinaria celular. Una sustancia biodegradable puede ser una sustancia que se puede descomponer mediante procesos químicos. Una partícula puede ser una sustancia que sea tanto biocompatible como biodegradable. Una partícula puede ser una sustancia biocompatible, pero no biodegradable. Una partícula puede ser una sustancia biodegradable, pero no biocompatible.

Las partículas pueden tener un tamaño mayor que el límite de excreción renal (p. ej., partículas con diámetros superiores a 6 nm). Las partículas pueden ser lo suficientemente pequeñas para evitar que el hígado las elimine del torrente sanguíneo (p. ej., partículas con diámetros inferiores a 1000 nm). En general, las características fisicoquímicas de las partículas deberían permitir que una partícula elegida como diana circule durante más tiempo en el plasma al disminuir la excreción renal y el aclaramiento hepático.

A menudo es deseable utilizar una población de partículas que sea relativamente uniforme en términos de tamaño, forma y/o composición, de modo que cada partícula tenga propiedades similares. Por ejemplo, al menos 80%, al menos 90 % o al menos 95% de las partículas puede tener un diámetro o una dimensión máxima que esté dentro de 5%, 10% o 20% del diámetro medio o de la dimensión máxima. Una población de partículas puede ser heterogénea en cuanto a tamaño, forma y/o composición.

Se puede utilizar una variedad de partículas diferentes de acuerdo con la presente divulgación. Las partículas pueden ser esferas o esféricas. Las partículas pueden ser esferas o esféricas. Las partículas pueden ser planas o en forma de placa. Las partículas pueden ser cubos o paralelepípedos. Las partículas pueden ser óvalos o elipses. Las partículas pueden ser cilindros, conos o pirámides.

Las partículas pueden ser micropartículas (p. ej., microesferas). En general, una "micropartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro inferior a 1000 μm . Las partículas pueden ser picopartículas (p. ej., picoesferas). En general, una "picopartícula" se refiere a cualquier partícula que tenga un diámetro de menos de 1 nm. Las partículas pueden ser liposomas. Las partículas pueden ser micelas.

Las partículas pueden ser sólidas o huecas y pueden comprender una o más capas (p. ej., nanoenvolturas, nanoanillos). Cada capa puede tener una composición única y propiedades únicas con relación a la otra capa o a las otras capas. Por ejemplo, las partículas pueden tener una estructura de núcleo/envoltura, en donde el núcleo es una capa y la envoltura es una segunda capa. Las partículas pueden comprender una pluralidad de capas diferentes. Una capa puede estar sustancialmente entrecruzada, con una segunda capa no sustancialmente entrecruzada, y así sucesivamente. Una, unas pocas o todas las diferentes capas pueden comprender uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico que se van a suministrar. Una capa puede comprender un agente que se va a suministrar, con una segunda capa que no comprende un agente que se va a suministrar, y así sucesivamente. Cada capa individual puede comprender un agente diferente o un conjunto de agentes que se van a suministrar.

Una partícula puede ser porosa, lo que significa que la partícula contiene orificios o canales, que típicamente son pequeños en comparación con el tamaño de una partícula. Por ejemplo, una partícula puede ser una partícula de sílice porosa, p. ej., una nanopartícula de sílice mesoporosa o puede tener un recubrimiento de sílice mesoporosa (Lin et al., 2005, J. Am. Chem. Soc., 17:4570). Las partículas pueden tener poros que oscilan entre aproximadamente 1 nm y aproximadamente 50 nm de diámetro, p. ej., entre aproximadamente 1 y 20 nm de diámetro. Entre aproximadamente 10% y 95% del volumen de una partícula puede consistir en vacíos dentro de los poros o canales.

Las partículas pueden tener una capa de recubrimiento. El uso de una capa de recubrimiento biocompatible puede ser ventajoso, p. ej., si las partículas contienen materiales que son tóxicos para las células. Los materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero sin limitarse a, proteínas naturales tales como albúmina de suero bovino (BSA), polímeros hidrófilos biocompatibles tales como polietilenglicol (PEG) o un derivado de PEG, fosfolípidos-(PEG), sílice, lípidos, polímeros, carbohidratos tales como dextrano, otras nanopartículas que se pueden asociar con nanopartículas de la invención, etc. Los recubrimientos se pueden aplicar o ensamblar en una variedad de formas, tal como por inmersión, utilizando una técnica de capa por capa, autoensamblaje, conjugación, etc. El autoensamblaje se refiere a un proceso de ensamblaje espontáneo de una estructura de orden superior que se basa en la atracción natural de los componentes de la estructura de orden superior (p. ej., moléculas) entre sí. Típicamente, se produce través de movimientos aleatorios de las moléculas y la formación de enlaces según el tamaño, la forma, la composición o las propiedades químicas.

Los ejemplos de polímeros incluyen polialquilenos (p. ej., polietilenos), policarbonatos (p. ej., poli(1,3-dioxan-2-ona)), polianhídridos (p. ej., poli(anhídrido sebácico)), polihidroxiácidos (p. ej., poli(β -hidroxialcanoato)), polifumaratos, policaprolactonas, poliamidas (p. ej., policaprolactama), poliacetales, poliéteres, poliésteres (p. ej., polilactida, poliglicólido), poli(ortoésteres), poli(alcoholes vinílicos), poliuretanos, polifosfacenos, poliácridatos, polimetacrilatos, policianoacrilatos, poliureas, poliestirenos y poliaminas. Los polímeros de acuerdo con la presente divulgación incluyen

polímeros que han sido aprobados para su uso en seres humanos por la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) bajo 21 C.F.R. §177.2600, incluidos, pero sin limitarse a, poliésteres (p. ej., poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-glicólico), policaprolactona, polivalerolactona, poli(1,3-dioxan-2-ona)); polianhídridos (p. ej., poli(anhídrido sebácico)); poliéteres (p. ej., polietilenglicol); poliuretanos; polimetacrilatos; poliacrilatos; y policianoacrilatos.

Las partículas pueden ser partículas no poliméricas (p. ej., partículas metálicas, puntos cuánticos, partículas cerámicas, polímeros que comprenden materiales inorgánicos, materiales derivados de huesos, sustitutos óseos, partículas virales, etc.). Un agente terapéutico o de diagnóstico que se va a suministrar puede estar asociado con la superficie de tal partícula no polimérica. Una partícula no polimérica puede ser un agregado de componentes no poliméricos, tal como un agregado de átomos metálicos (p. ej., átomos de oro). El agente terapéutico o de diagnóstico que se va a suministrar puede estar asociado con la superficie y/o encapsulado dentro, rodeado por y/o disperso a lo largo de un agregado de componentes no poliméricos.

Las partículas (p. ej., nanopartículas, micropartículas) se pueden preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de partículas se pueden formar mediante métodos tales como nanoprecipitación, canales fluidicos de enfoque de flujo, secado por aspersion, evaporación de disolventes de emulsión simple y doble, extracción con disolventes, separación de fases, molienda, procedimientos de microemulsión, microfabricación, nanofabricación, capas de sacrificio, coacervación simple y compleja, y otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Como alternativa o adicionalmente, se han descrito síntesis de disolventes acuosos y orgánicos para semiconductores monodispersos, nanopartículas conductivas, magnéticas, orgánicas y otras (Pellegrino et al., 2005, Small, 1:48; Murray et al., 2000, Ann. Rev. Mat. Sci., 30:545; y Trindade et al., 2001, Chem. Mat., 13:3843).

Los métodos para preparar micropartículas para el suministro de agentes encapsulados se describen en la bibliografía (véanse, p. ej., Doubrow, Ed., "Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy", CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz et al., 1987, J. Control. Release, 5:13; Mathiowitz et al., 1987, Reactive Polymers, 8: 275; y Mathiowitz et al., 1988, J. Appl. Polymer Sci., 35:755).

El radical de direccionamiento de la divulgación puede comprender un radical de direccionamiento de ácido nucleico.

En general, un radical de direccionamiento de ácido nucleico es cualquier polinucleótido que se une a un componente asociado con un órgano, tejido, célula, componente de matriz extracelular y/o compartimento intracelular (el diana).

Los radicales de direccionamiento de ácido nucleico pueden ser aptámeros.

Un aptámero es típicamente un polinucleótido que se une a una estructura diana específica que está asociada con un órgano, tejido, célula, componente de matriz extracelular y/o compartimento intracelular en particular. En general, la función de direccionamiento del aptámero se basa en la estructura tridimensional del aptámero. La unión de un aptámero a una diana puede estar típicamente mediada por la interacción entre las estructuras bidimensionales y/o tridimensionales tanto del aptámero como de la diana. La unión de un aptámero a una diana puede no basarse únicamente en la secuencia primaria del aptámero, sino que depende de la estructura o las estructuras tridimensionales del aptámero y/o de la diana. Los aptámeros pueden unirse a sus dianas a través del emparejamiento de bases complementario de Watson-Crick que se interrumpe por estructuras (p. ej., bucles de horquilla) que interrumpen el emparejamiento de bases.

Los radicales de direccionamiento de ácido nucleico pueden ser espejelmeros (Publicaciones PCT WO 98/08856, WO 02/100442, y WO 06/117217). En general, los espejelmeros son ácidos nucleicos sintéticos de imagen especular que pueden unirse específicamente a una diana (es decir, aptámeros de imagen especular). Los espejelmeros se caracterizan por rasgos estructurales que los hacen insensibles a exonucleasas y endonucleasas.

Un experto con un conocimiento práctico normal de la técnica reconocerá que se puede utilizar cualquier radical de direccionamiento de ácido nucleico (p. ej., aptámero o espejelmero) que sea capaz de unirse específicamente a una diana de acuerdo con la presente divulgación. Los radicales de direccionamiento de ácido nucleico que se van a utilizar de acuerdo con la presente divulgación pueden dirigirse a un marcador asociado con una enfermedad, trastorno y/o afección. Los radicales de direccionamiento de ácido nucleico que se van a utilizar de acuerdo con la presente divulgación pueden dirigirse a dianas asociadas con el cáncer. Los radicales de direccionamiento de ácido nucleico que se utilizarán de acuerdo con la presente divulgación se pueden dirigir a marcadores tumorales. Cualquier tipo de cáncer y/o cualquier marcador tumoral se pueden elegir como diana utilizando radicales de direccionamiento de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Para dar solo algunos ejemplos, los radicales de direccionamiento de ácidos nucleicos pueden elegir como diana marcadores asociados con cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de huesos, cáncer de esófago, cáncer de hígado, cáncer de estómago, tumores cerebrales, melanoma cutáneo y/o leucemia.

Los ácidos nucleicos de la presente divulgación (incluidos los radicales de direccionamiento de ácidos nucleicos y/o los ARN funcionales que se van a suministrar, p. ej., entidades inductoras de ARNi, ribozimas, ARNt, etc., descritos con mayor detalle a continuación) se pueden preparar de acuerdo con cualquier técnica disponible que incluye, pero no se limita a, síntesis química, síntesis enzimática, escisión enzimática o química de un precursor más largo, etc. Los métodos

para sintetizar ARN son conocidos en la técnica (véanse, p. ej., Gait, M. J. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, Oxford [Oxfordshire], Washington, D.C.: IRL Press, 1984; and Herdewijn, P. (ed.) *Oligonucleotide synthesis: methods and applications*, *Methods in molecular biology*, v. 288 (Clifton, N.J.) Totowa, N.J.: Humana Press, 2005).

5 El ácido nucleico que forma el radical de direccionamiento de ácido nucleico del ácido nucleico puede comprender nucleósidos de origen natural, nucleósidos modificados, nucleósidos de origen natural con conectores hidrocarbonados (p. ej., un alquileno) o un conector de poliéter (p. ej., un conector de PEG) insertado entre uno o más nucleósidos, nucleósidos modificados con conectores hidrocarbonados o de PEG insertados entre uno o más nucleósidos, o una combinación de los mismos. Los nucleótidos o nucleótidos modificados del radical de direccionamiento de ácido nucleico del ácido nucleico se pueden reemplazar por un conector hidrocarbonado o un conector de poliéter siempre que la afinidad de unión y la selectividad del radical de direccionamiento de ácido nucleico del ácido nucleico no se reduzcan sustancialmente por la sustitución (p. ej., la constante de disociación del radical de direccionamiento de ácido nucleico del ácido nucleico para la diana no debe ser mayor que aproximadamente $1 \times 10^{-3}M$).

10 Los expertos en la técnica apreciarán que los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender nucleótidos completamente de los tipos que se encuentran en los ácidos nucleicos naturales, o en su lugar pueden incluir uno o más análogos de nucleótidos o tener una estructura que de otra manera difiere de la de un ácido nucleico natural. Las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.403.779; 6.399.754; 6.225.460; 6.127.533; 6.031.086; 6.005.087; 5.977.089; y sus referencias divulgan una amplia variedad de nucleótidos específicos y modificaciones que pueden utilizarse. Crooke, S. (ed.) *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications* (1ª ed), Marcel Dekker; ISBN: 0824705661; 1ª edición (2001) y sus referencias. Por ejemplo, las modificaciones en 2' incluyen grupos halo, alcoxi y aliloxi. El grupo 2'-OH puede ser reemplazado por un grupo seleccionado entre H, OR, R, halo, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en donde R es alquilo, alqueno o alquino C₁-C₆, y halo es F, Cl, Br o I. Los ejemplos de enlaces modificados incluyen enlaces fosforotioato y 5'-N-fosforamida.

15 Los ácidos nucleicos que comprenden una variedad de diferentes análogos de nucleótidos, cadenas principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales se pueden utilizar de acuerdo con la presente divulgación. Los ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden incluir nucleósidos naturales (es decir, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina y desoxicitidina) o nucleósidos modificados. Los ejemplos de nucleótidos modificados incluyen nucleósidos modificados con bases (p. ej., aracitidina, inosina, isoguanosina, nebularina, pseudouridina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, 2-tiotimidina, 3-desaza-5-azacitidina, 2'-desoxiuridina, 3-nitropirrol, 4-metilindol, 4-tiouridina, 4-tiotimidina, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, 2-tiouridina, 5-bromocitidina, 5-yodouridina, inosina, 6-azauridina, 6-cloropurina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-azaadenosina, 8-azidoadenosina, benzimidazol, M1-metiladenosina, pirrolo-pirimidina, 2-amino-6-cloropurina, 3-metiladenosina, 5-propinilcitidina, 5-propiniluridina, 5-bromouridina, 5-fluorouridina, 5-metilcitidina, 7-desazaadenosina, 7-desazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina y 2-tiocitidina), bases modificadas química o biológicamente (p. ej., bases metiladas), azúcares modificados (p. ej., 2'-fluororribosa, 2'-aminorribosa, 2'-azidorribosa, 2'-O-metilribosa, L-nucleósidos enantioméricos arabinosa y hexosa), grupos fosfato modificados (p. ej., enlaces fosforotioato y 5'-N-fosforamida), y combinaciones de los mismos. Los monómeros de nucleótidos naturales y modificados para la síntesis química de ácidos nucleicos están fácilmente disponibles. En algunos casos, los ácidos nucleicos que comprenden tales modificaciones muestran propiedades mejoradas con relación a los ácidos nucleicos que consisten únicamente en nucleótidos naturales. Las modificaciones de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden utilizarse para reducir y/o prevenir la digestión por nucleasas (p. ej., exonucleasas, endonucleasas, etc.). Por ejemplo, la estructura de un ácido nucleico puede estabilizarse incluyendo análogos de nucleótidos en el extremo 3' de una o ambas hebras para reducir la digestión.

20 Los ácidos nucleicos modificados no necesitan modificarse uniformemente a lo largo de toda la longitud de la molécula. Pueden existir diferentes modificaciones de nucleótidos y/o estructuras de cadena principal en varias posiciones en el ácido nucleico. Un experto normal en la técnica apreciará que los análogos de nucleótidos u otras modificaciones pueden ubicarse en cualquier posición de un ácido nucleico de modo que la función del ácido nucleico no se vea sustancialmente afectada. Para proporcionar solo un ejemplo, las modificaciones se pueden ubicar en cualquier posición de un radical de direccionamiento de ácido nucleico de modo que la capacidad del radical de direccionamiento de ácido nucleico para unirse específicamente a la diana no se vea sustancialmente afectada. La región modificada puede estar en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de una o ambas cadenas. Por ejemplo, se han empleado radicales de direccionamiento de ácidos nucleicos modificados en los que aproximadamente 1-5 restos en el extremo 5' y/o 3' de cualquiera de ambas hebras son análogos de nucleótidos y/o tienen una modificación de la cadena principal. La modificación puede ser una modificación del extremo 5' o 3'. Una o ambas hebras de ácido nucleico pueden comprender al menos 50% de nucleótidos sin modificar, al menos 80% de nucleótidos sin modificar, al menos 90% de nucleótidos sin modificar o 100% de nucleótidos sin modificar.

25 Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación pueden, por ejemplo, comprender una modificación de una conexión de azúcar, nucleósido o internucleósido tal como las descritas en las Publicaciones de Solicitud de Patentes de Estados Unidos Núm. 2003/0175950, 2004/0192626, 2004/0092470, 2005/0020525, y 2005/0032733. La presente divulgación abarca el uso de cualquier ácido nucleico que tenga una o más cualesquiera de las modificaciones allí descritas. Por ejemplo, se ha informado de que una serie de productos conjugados terminales, p. ej., lípidos tales como colesterol, ácido litocólico, ácido alúrico o largas cadenas ramificadas de alquilo, mejoran la absorción celular. Los análogos y las modificaciones se pueden probar utilizando, p. ej., cualquier ensayo apropiado

conocido en la técnica, por ejemplo, para seleccionar aquellos que dan como resultado un mejor suministro de un agente terapéutico o de diagnóstico, una mejor unión específica de un radical de direccionamiento de ácido nucleico a una diana, etc. Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender una o más conexiones nucleosídicas no naturales. Uno o más nucleótidos internos en el extremo 3', el extremo 5' o ambos extremos 3' y 5' del radical de direccionamiento de ácido nucleico puede invertirse para producir una conexión tal como una conexión 3'-3' o una conexión 5'-5'.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente divulgación pueden no ser sintéticos, pero son entidades que se producen de forma natural que se han aislado de sus entornos naturales.

Se puede utilizar cualquier método para diseñar nuevos radicales de direccionamiento de ácido nucleico (véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.716.583; 6.465.189; 6.482.594; 6.458.543; 6.458.539; 6.376.190; 6.344.318; 6.242.246; 6.184.364; 6.001.577; 5.958.691; 5.874.218; 5.853.984; 5.843.732; 5.843.653; 5.817.785; 5.789.163; 5.763.177; 5.696.249; 5.660.985; 5.595.877; 5.567.588; y 5.270.163; y Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2005/0069910, 2004/0072234, 2004/0043923, 2003/0087301, 2003/0054360, y 2002/0064780). La presente divulgación proporciona métodos para diseñar nuevos radicales de direccionamiento de ácido nucleico. La presente divulgación proporciona además métodos para aislar o identificar nuevos radicales de direccionamiento de ácidos nucleicos a partir de una mezcla de radicales de direccionamiento de ácidos nucleicos candidatos.

Se pueden diseñar y/o identificar radicales de direccionamiento de ácido nucleico que se unen a una proteína, un carbohidrato, un lípido y/o un ácido nucleico. Los radicales de direccionamiento de ácido nucleico se pueden diseñar y/o identificar para su uso en los complejos de la divulgación que se unen a proteínas y/o porciones características de las mismas, tales como marcadores tumorales, integrinas, receptores de superficie celular, proteínas transmembrana, proteínas intercelulares, canales iónicos, proteínas transportadoras de membrana, enzimas, anticuerpos, proteínas quiméricas, etc. Se pueden diseñar y/o identificar radicales de direccionamiento de ácido nucleico para su uso en los complejos de la divulgación que se unen a carbohidratos y/o porciones características de los mismos, tales como glicoproteínas, azúcares (p. ej., monosacáridos, disacáridos y polisacáridos), glicocalix (es decir, la zona periférica rica en carbohidratos en la superficie exterior de la mayoría de las células eucarióticas), etc. Se pueden diseñar y/o identificar radicales de direccionamiento de ácido nucleico para su uso en los complejos de la divulgación que se unen a lípidos y/o porciones características de los mismos, tales como aceites, ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, glicéridos, hormonas, esteroides (p. ej., colesterol, ácidos biliares), vitaminas (p. ej., vitamina E), fosfolípidos, esfingolípidos, lipoproteínas, etc. Se pueden diseñar y/o identificar radicales de direccionamiento de ácido nucleico para su uso en los complejos de la divulgación que se unen a ácidos nucleicos y/o porciones características de los mismos, tales como ácidos nucleicos de ADN; ácidos nucleicos de ARN; ácidos nucleicos de ADN modificados; ácidos nucleicos de ARN modificados; y ácidos nucleicos que incluyen cualquier combinación de ADN, ARN, ADN modificado y ARN modificado; etc.

Se pueden diseñar y/o identificar radicales de direccionamiento de ácido nucleico (p. ej., aptámeros o espiegelmeros) utilizando cualquier método disponible. Se pueden diseñar y/o identificar radicales de direccionamiento de ácido nucleico mediante la identificación de radicales de direccionamiento de ácido nucleico a partir de una mezcla candidata de ácidos nucleicos. Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX), o una variación del mismo, es un método comúnmente utilizado para identificar radicales de direccionamiento de ácidos nucleicos que se unen a una diana de una mezcla candidata de ácidos nucleicos.

Los radicales de direccionamiento de ácido nucleico que se unen selectivamente a cualquier diana pueden aislarse mediante el procedimiento SELEX, o una variación del mismo, siempre que la diana pueda utilizarse como diana en el procedimiento SELEX.

Conectores

En general, el compuesto de la invención comprende un conector que conecta el radical de direccionamiento y el radical de activación. Sin embargo, en algunos compuestos divulgados no hay conector y el radical de activación y el radical de direccionamiento están conectados directamente.

Por "conector" en el presente documento se entiende un radical que conecta una primera molécula con una segunda molécula a través de enlaces químicos. En los conectores de la invención, la conexión se puede cortar para liberar una forma biológicamente activa de la primera y/o segunda moléculas. Un ejemplo preferido de un conector es un radical que comprende un enlace que es estable a pH neutro pero que se escinde fácilmente en condiciones de pH bajo. Los ejemplos particularmente preferidos de conectores son radicales que comprenden un enlace que es estable a valores de pH entre 7 y 8 pero que se escinde fácilmente a valores de pH entre 4 y 6. Otro ejemplo de un conector es un radical que comprende un enlace que se escinde fácilmente en presencia de una enzima. Los ejemplos preferidos de tales conectores sensibles a enzimas son péptidos que comprenden una secuencia de reconocimiento para una peptidasa endosómica. Otro ejemplo de un conector es un conector sensible al potencial redox que es estable en condiciones de bajo potencial de reducción (p. ej., baja concentración de tior o glutatión) pero es escindido en condiciones de alto potencial de reducción (p. ej., alta concentración de tior o glutatión). Los ejemplos preferidos de tales conectores sensibles al potencial redox incluyen disulfuros y sulfenamidas. Los ejemplos particularmente preferidos incluyen disulfuros de aril-alquilo sustituidos en los que el grupo arilo está sustituido con sustituyentes

estéricamente exigentes y captadores de electrones o donadores de electrones, para controlar la sensibilidad de la conexión disulfuro hacia la reacción con el tiol. Otro ejemplo de un conector es un radical que comprende un enlace que se escinde fácilmente tras la exposición a la radiación. Los ejemplos preferidos de tales conectores sensibles a la radiación son los éteres de 2-nitrobencilo que se escinden tras la exposición a la luz. Los ejemplos particularmente preferidos de conectores son radicales que enmascaran la actividad biológica de una de las dos moléculas conectadas hasta que se corta la conexión.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención comprende un conector que se selecciona del grupo que consiste en un grupo hidrazina, un polipéptido, un grupo disulfuro y un grupo tioéter.

Por "grupo hidracina" o "conector de hidracina" o "conector de hidracina autociclante" se entiende en el presente documento un radical conector que, tras un cambio de condiciones, tal como un cambio en el pH, sufrirá una reacción de ciclación y formará uno o más anillos. El radical hidracina se convierte en una hidrazona cuando se ancla. Este anclaje puede ocurrir, por ejemplo, a través de una reacción con un grupo cetona en el radical L4. Por lo tanto, el término conector de hidracina también se puede utilizar para describir el conector de la presente invención debido a esta conversión en una hidrazona tras el anclaje.

Por "conector de hidracina de cinco miembros" o "conector de hidracina de 5 miembros" se entiende en el presente documento radicales moleculares que contienen hidracina que, tras un cambio de condiciones, tal como un cambio en el pH, experimentarán una reacción de ciclación y formarán uno o más anillos de 5 miembros. Alternativamente, este conector de cinco miembros puede describirse de manera similar como un conector de hidracina de cinco miembros o un conector de hidracina de 5 miembros.

Por "conector de hidracina de seis miembros" o "conector de hidracina de 6 miembros" se entiende en el presente documento radicales moleculares que contienen hidracina que, tras un cambio de condiciones, tal como un cambio en el pH, experimentarán una reacción de ciclación y formarán uno o más anillos de 6 miembros. Este conector de seis miembros puede describirse de manera similar como un conector de hidracina de seis miembros o un conector de hidracina de 6 miembros.

Por "reacción de ciclación" en el presente documento se entiende la ciclación de un conector de péptido, hidrazina o disulfuro, indica la ciclación de ese conector en un anillo e inicia la separación del complejo fármaco-ligando. Esta tasa se puede medir ex situ y se completa cuando se forma al menos 90%, 95% o 100% del producto.

En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención comprende una región conectora entre el radical de direccionamiento y el radical de activación, y el conector puede escindirse mediante un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (p. ej., dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El conector puede ser, p. ej., un conector de peptidilo que es escindido por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosomal o endosomal. Típicamente, el conector de peptidilo tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o de al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármacos dipeptídicos que dan como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, p. ej., Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Los más típicos son los conectores de peptidilo que se pueden escindir mediante enzimas que están presentes en células o tejidos diana. Por ejemplo, se puede utilizar un conector de peptidilo que es escindible por la proteasa catepsina-B dependiente de tiol, que se expresa altamente en tejido canceroso (p. ej., un conector Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly). Otros de tales conectores se describen, p. ej., en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.214.345. En algunas realizaciones, el conector de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un conector Val-Cit o un conector Phe-Lys (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el conector val-cit). Una ventaja de utilizar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente típicamente se atenúa cuando se conjuga y las estabildades en suero de los productos conjugados son típicamente altas.

En algunas realizaciones, el conector escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Típicamente, el conector sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, puede utilizarse un conector lábil en medio ácido que sea hidrolizable en el lisosoma (p. ej., una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal o similares). (Véanse, p. ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661). Tales conectores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el conector hidrolizable es un conector de tioéter (tal como, p. ej., un tioéter anclado al agente terapéutico a través de un enlace de acilhidrazona (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 5.622.929).

En otras realizaciones más, el conector se puede escindir en condiciones reductoras (p. ej., un conector disulfuro). Se conocen en la técnica una variedad de conectores disulfuro, incluidos, por ejemplo, los que se pueden formar utilizando SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT (Véanse, p. ej., Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también la Patente de Estados Unidos Núm. 4.880.935).

En otras realizaciones específicas más, el conector es un conector de malonato (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), un conector de maleimidobenzoilo (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304), o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12).

5 Típicamente, el conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular. Como se emplea en el presente documento, "no sustancialmente sensible al entorno extracelular", en el contexto de un conector, significa que no más de aproximadamente 20%, típicamente no más de aproximadamente 15%, más típicamente no más de aproximadamente 10% e incluso más típicamente, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 3% o no más de aproximadamente 1% de los conectores, en una muestra de compuestos de la presente invención, se escinden cuando los compuestos de la presente invención están presentes en un entorno extracelular (p. ej., en plasma). Se puede determinar si un conector no es sustancialmente sensible al entorno extracelular, por ejemplo, incubando de forma independiente con plasma (a) el compuesto de la invención (la "muestra del Compuesto") y (b) una cantidad molar igual de anticuerpo o agente terapéutico no conjugados (la "muestra de control") durante un período de tiempo predeterminado (p. ej., 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y a continuación comparando la cantidad de anticuerpo o agente terapéutico no conjugados presentes en la muestra de Compuesto con la de la presente en la muestra de control, medida, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

En otras realizaciones que no se excluyen mutuamente, el conector promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el conector promueve la internalización celular cuando se conjuga con el radical de activación. En otras realizaciones más, el conector promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto con el radical de direccionamiento como con el radical de activación.

20 Una variedad de conectores que se puede utilizar con las presentes composiciones y métodos se describe en el documento WO 2004010957 titulado "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease", documentos US20120141509A1, y US20120288512A1.

La unidad conectora puede tener la siguiente fórmula general:

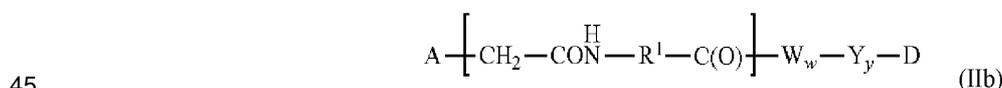
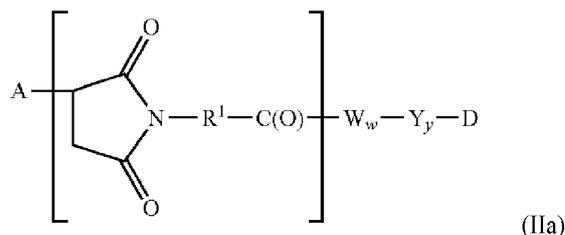


25 en donde -T- es una unidad de extensión; a es 0 o 1; cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido; w es independientemente un número entero que varía de 2 a 12; -Y- es una unidad espaciadora; e y es 0, 1 o 2.

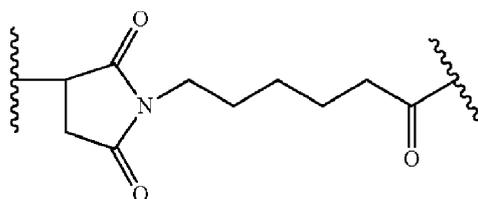
La unidad de extensión

30 La unidad de extensión (-T-), cuando está presente, conecta el radical de direccionamiento a una unidad de aminoácido (-W-). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un radical de direccionamiento, tal como un anticuerpo, ya sea de forma natural o mediante manipulación química, incluyen, pero sin limitarse a, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato y carboxilo. Los grupos funcionales adecuados son sulfhidrilo y amino. Los grupos sulfhidrilo se pueden generar mediante la reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de un anticuerpo. Alternativamente, los grupos sulfhidrilo pueden generarse mediante la reacción de un grupo amino de un radical de lisina de un anticuerpo con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos generadores de sulfhidrilo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo recombinante y está diseñado para transportar una o más lisinas. El anticuerpo recombinante puede diseñarse para transportar grupos sulfhidrilo adicionales, p. ej., cisteínas adicionales.

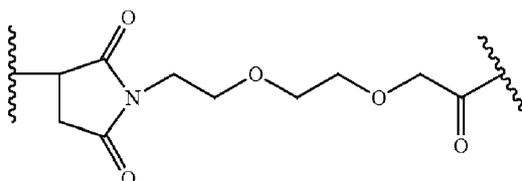
35 La unidad de extensión puede formar un enlace con un átomo de azufre del anticuerpo. El átomo de azufre se puede obtener a partir de un grupo sulfhidrilo (-SH) de un anticuerpo reducido (A). Las unidades de extensión representativas se representan entre corchetes de las Fórmulas (IIa) y (IIb), en donde A-, -W-, -Y-, -D, w e y se definen como antes y R¹ se selecciona entre -alquileo C₁-C₁₀-, -carbociclo C₃-C₈-, -O-(alquilo C₁-C₈)-, -arileno-, -alquileo C₁-C₁₀-arileno-, -arileno-alquileo C₁-C₁₀-, -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-, y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es un número entero que varía de 1 y 10.



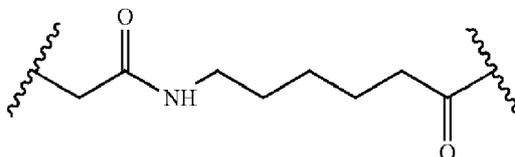
45 Una unidad de extensión ilustrativa es la de fórmula (IIa) donde R¹ es -(CH₂)₅-:



Otra unidad de extensión ilustrativa es la de fórmula (IIa) donde R¹ es -(CH₂CH₂O)_r-CH₂- y r es 2:



Otra unidad de extensión ilustrativa más es la de fórmula (IIb) donde R¹ es -(CH₂)₅-:



5

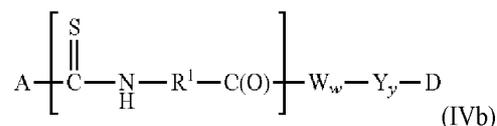
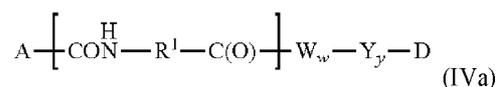
La unidad de extensión puede conectarse a la unidad de anticuerpo (A) a través de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de anticuerpo y un átomo de azufre de la unidad de extensión. Una unidad de extensión representativa de esta realización se representa entre corchetes en la fórmula (III), en donde R¹, A-, -W-, -Y-, -D, w e y se definen como antes.

10



El grupo reactivo del extensor puede contener un sitio reactivo que puede ser reactivo con un grupo amino de un anticuerpo. El grupo amino puede ser el de una arginina o una lisina. Los sitios reactivos con amina adecuados incluyen, pero no se limitan a, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades de extensión representativas se representan entre corchetes de las fórmulas (IVa) y (IVb), en donde R¹, A-, -W-, -Y-, -D, w e y se definen como antes;

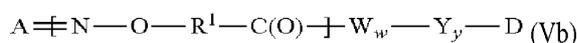
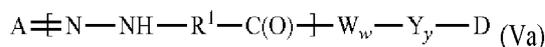
15

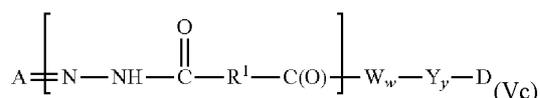


20

La función reactiva del extensor puede contener un sitio reactivo que puede ser reactivo con un grupo carbohidrato modificado que puede estar presente en un anticuerpo. El anticuerpo se puede glicosilar enzimáticamente para proporcionar un radical carbohidrato. El carbohidrato se puede oxidar suavemente con un reactivo tal como peryodato de sodio y la unidad de carbonilo resultante del carbohidrato oxidado se puede condensar con un extensor que contiene una funcionalidad como una hidrazida, una oxima, una amina reactiva, una hidracina, una tiosemicarbacida, un carboxilato de hidrazina y una arilhidrazida tales como las descritas por Kaneko et al., 1991, Bioconjugate Chem 2:133-41. Las unidades de extensión representativas de esta realización se representan entre corchetes en las fórmulas (Va)-(Vc), en donde R¹, A-, -W-, -Y-, -D, w e y se definen como antes.

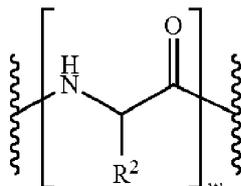
25



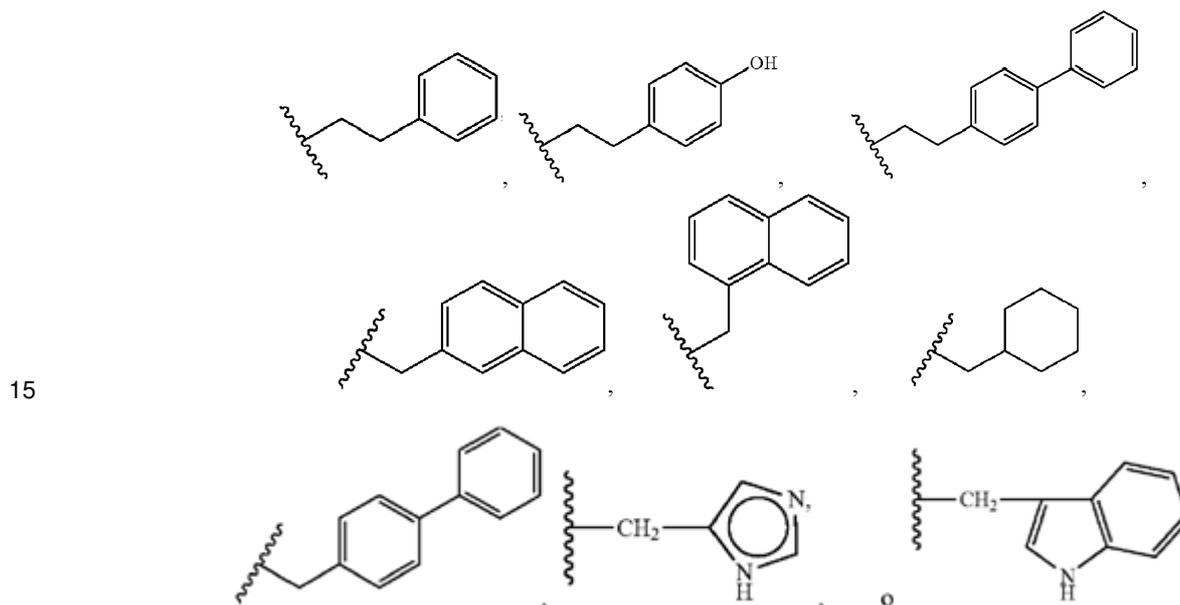


La Unidad de Aminoácido

5 La unidad de aminoácido (-W-) conecta la unidad extensora (-T-) a la unidad Espaciadora (-Y-) si la unidad espaciadora está presente, y conecta la unidad de extensión al agente citotóxico o citostático (Radical de Activación; D) si la unidad espaciadora está ausente. -Ww- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula indicada a continuación entre corchetes, y w es un número entero que varía de 2 a 12:

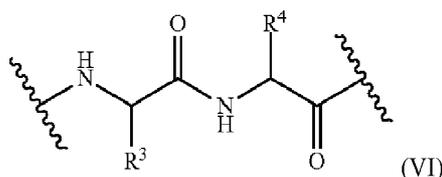


10 en donde R² es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, p-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃,
 -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂,
 -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO,
 -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,

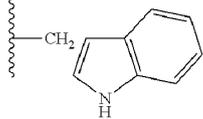


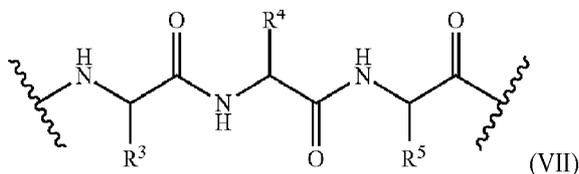
La unidad de aminoácido de la unidad conectora se puede escindir enzimáticamente mediante una enzima que incluye, pero sin limitarse a, una proteasa asociada a tumores para liberar el radical de activación (-D) que se protona in vivo tras la liberación para proporcionar una molécula activadora (D).

20 las unidades W_w ilustrativas están representadas por las fórmulas (VI)-(VIII):



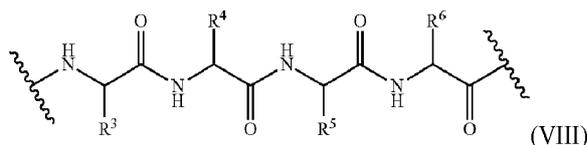
donde R³ y R⁴ son los siguientes:

R ³	R ⁴
Bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
Metilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
Isopropílico	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
Isopropílico	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
Bencilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
Isobutilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
sec-butilo	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
	(CH ₂) ₃ NHCONH ₂ ;
Bencilo	metilo; y
Bencilo	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂ ;



en donde R³, R⁴ y R⁵ son los siguientes:

R ³	R ⁴	R ⁵
Bencilo	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
Isopropílico	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ; y
H	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;



5

en donde R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son los siguientes:

R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
H	Bencilo	isobutilo	H; y
metilo	Isobutilo	metilo	isobutilo.

10

Las unidades de aminoácidos adecuadas incluyen, pero no se limitan a, unidades de fórmula (VI) donde: R³ es bencilo y R⁴ es -(CH₂)₄NH₂; R³ es isopropilo y R⁴ es -(CH₂)₄NH₂; o R³ es isopropilo y R⁴ es -(CH₂)₃NHCONH₂. Otra unidad de aminoácido adecuada es una unidad de fórmula (VII), donde: R³ es bencilo, R⁴ es bencilo, y R⁵ es -(CH₂)₄NH₂. La selectividad para la escisión enzimática de las unidades -Ww se puede diseñar y optimizar por medio de una proteasa particular asociada a un tumor. Las unidades -Ww- adecuadas son aquellas cuya escisión está catalizada por las proteasas, catepsina B, C y D, y plasmina.

-Ww- puede ser una unidad de dipéptido, tripéptido o tetrapéptido.

15

cuando R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ son distintos de hidrógeno, el átomo de carbono al que se anclan R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ es quiral. Cada átomo de carbono al que se anclan R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ está independiente en la configuración (S) o (R).

La unidad de aminoácido puede ser un dipéptido de fenilalanina-lisina (conector Phe-Lys o FK). La unidad de aminoácido puede ser un dipéptido de valina-citrulina (conector Val-Cit o VC). La unidad de aminoácido puede ser

ácido 5-aminovalérico, homofenilalanina lisina, tetraisoquinolinocarboxilato lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido isonipecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina o ácido isonipecótico.

La unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otras realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos no naturales.

5 La unidad espaciadora

La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, conecta una unidad de aminoácido a la unidad de fármaco. Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmolables y no autoinmolables. Una unidad espaciadora no autoinmolable es aquella en la que parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida a la unidad del radical de activación después de la escisión enzimática de una unidad de aminoácido del producto conjugado de TM-conector-AM o el compuesto fármaco-conector. Los ejemplos de una unidad espaciadora no autoinmolable incluyen, pero no se limitan a, una unidad espaciadora (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina. Cuando un producto conjugado de TM-conector-AM que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina se somete a escisión enzimática a través de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, se escinde un radical de glicina-glicina-fármaco o radical de glicina-fármaco de A-T-Ww-. Para liberar el AM, debe tener lugar una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana para escindir el enlace de la unidad de glicina-fármaco.

Típicamente, -Yy- puede ser un éter p-aminobencílico que puede estar sustituido con Qm donde Q es -alquilo C₁-C₈, -alcoxi C₁-C₈, -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4.

Una unidad espaciadora no autoinmolable (-Y-) puede ser -Gly-Gly-.

20 Una unidad espaciadora (-Y-) no autoinmolable puede ser -Gly-.

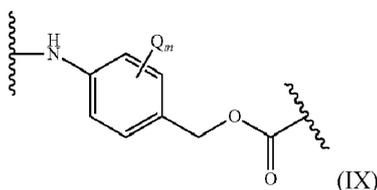
El compuesto AM-conector o un producto conjugado de TM-conector-AM pueden carecer de una unidad espaciadora (y=0).

Alternativamente, un producto conjugado de TM-conector-AM que contiene una unidad espaciadora autoinmolable puede liberar el AM (D) sin necesidad de una etapa de hidrólisis separada. En estas configuraciones, -Y- es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) que está conectada a -Ww- a través del átomo de nitrógeno del grupo PAB y conectada directamente a -D a través de un grupo carbonato, carbamato o éter.

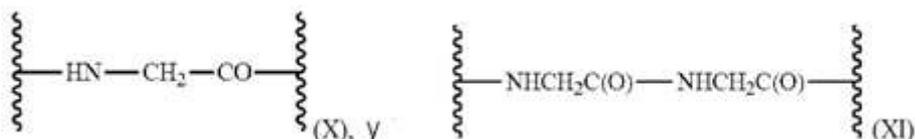
Otros ejemplos de espaciadores autoinmolables incluyen, pero sin limitarse a, compuestos aromáticos que son electrónicamente equivalentes al grupo PAB, tales como los derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237 para los ejemplos) y orto o para-aminobencilacetales. Se pueden utilizar espaciadores que experimenten una fácil ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como las amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2:223), sistemas de anillos biciclo[2,2,1] y biciclo[2,2,2] apropiadamente sustituidos (Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry et al., 1990, J. Org. Chem. 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen aminas que están sustituidas en la posición α de la glicina (Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447) también es un ejemplo de estrategias de espaciador autoinmolable que se pueden aplicar a los productos conjugados de TM-conector-AM.

La unidad espaciadora puede ser una unidad ramificada de bis(hidroximetil)estireno (BHMS).

Las unidades espaciadoras típicas (-Yy-) están representadas por las fórmulas (IX)-(XI):

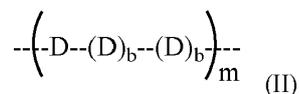


40 donde Q es alquilo C₁-C₈, alcoxi C₁-C₈, halógeno, nitro o ciano; y m es un número entero que varía de 0 a 4;

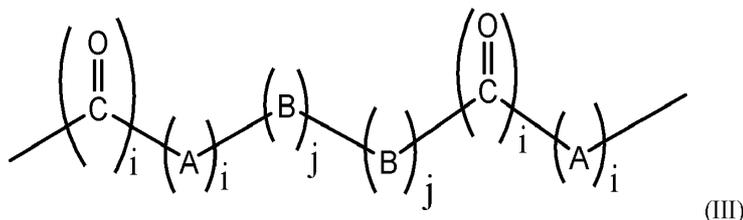


El conector puede ser escindible enzimáticamente. El conector puede no ser escindible enzimáticamente.

En algunas realizaciones, el conector se presenta mediante la siguiente estructura de fórmula (II):



m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, cada b es independientemente 0 o 1, y D está representado independientemente por la estructura de fórmula (III):



5

en donde cada i es independientemente 0 o 1;

cada j es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

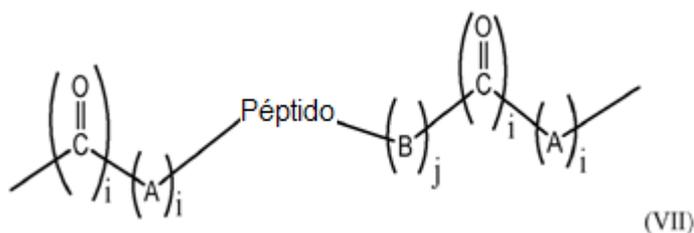
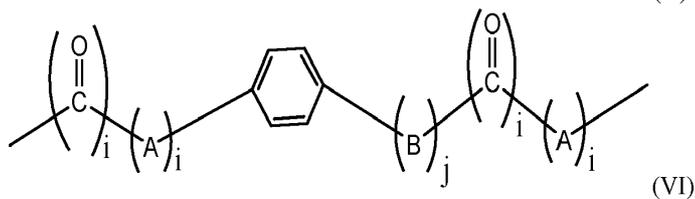
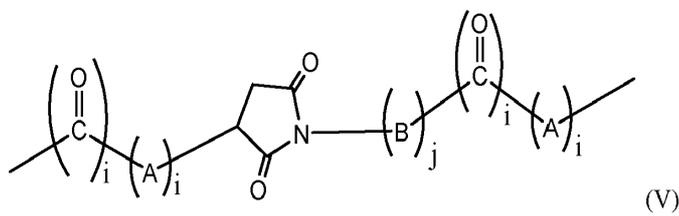
cada A es independientemente S, O o N-R_a, en donde R_a es hidrógeno, alquilo, alquenilo o alcoxi;

10

cada B es independientemente alquilo, alquenilo, --O-alquil--, --alquil-O--, --S-alquil--, --alquil-S--, arilo, heteroarilo, heterociclilo o péptido, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, --alquil-arilo, --alquil-heteroarilo, --alquil-heterociclilo, --O-R₄, --O-alquil-R₄, --C(O)-R₄, --C(O)-O-R₄, --S-R₄, --S(O)₂-R₄, --NHR₄, --NH-alquil-R₄, halógeno, --CN, --NO₂, y -SH, en donde R₄ es alquilo, alquenilo, -alquil-hidroxilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o haloalquilo;

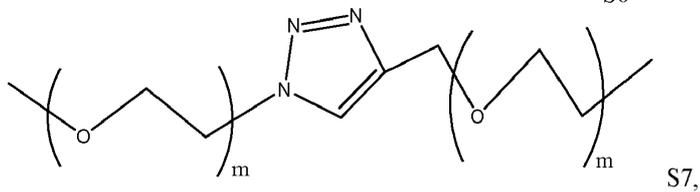
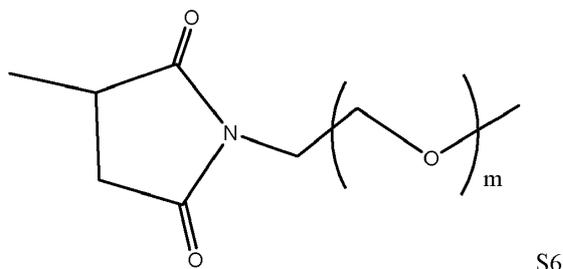
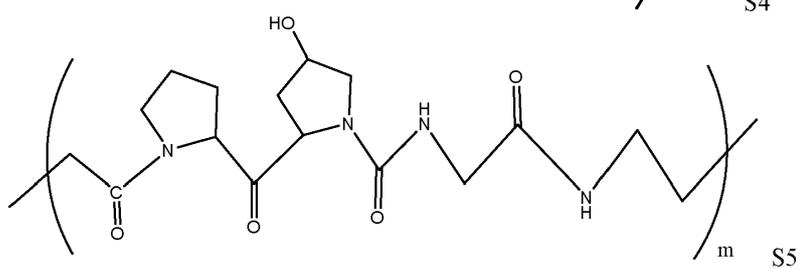
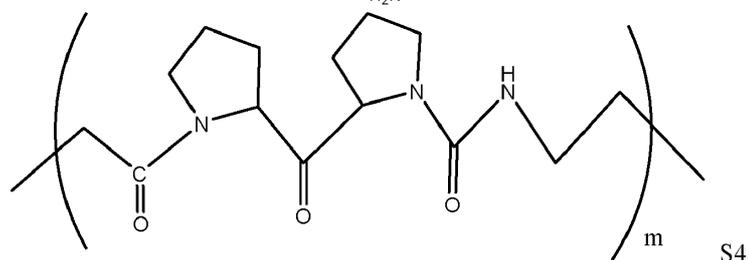
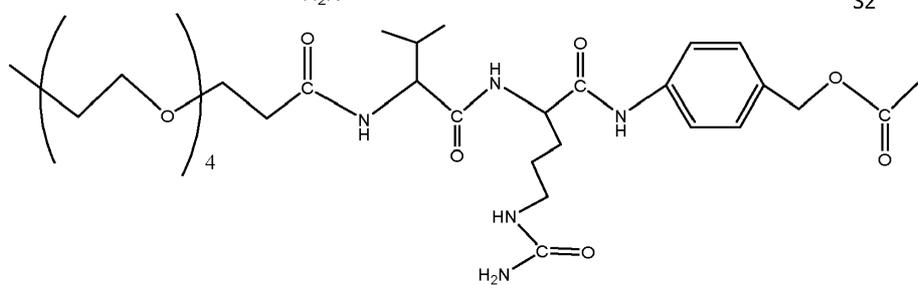
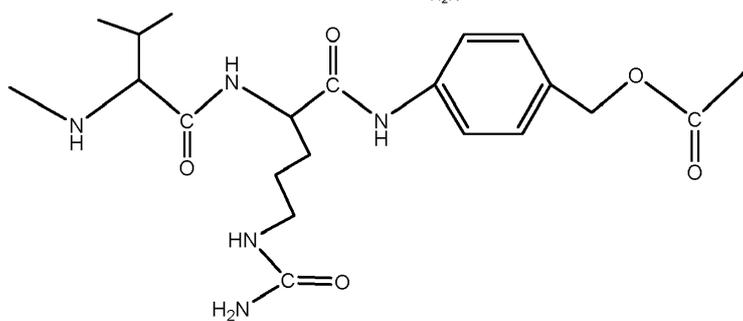
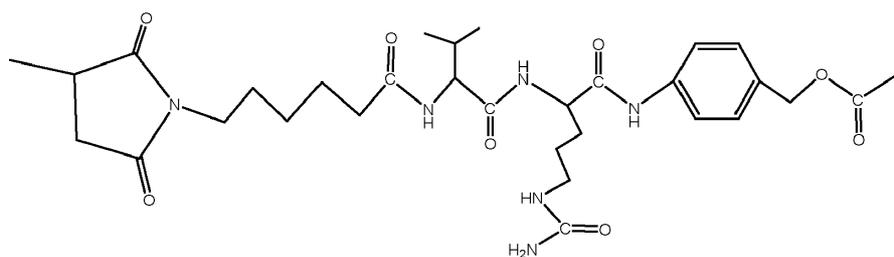
15

En algunas realizaciones, el conector se presenta mediante las siguientes estructuras de fórmula (V)-(VII):



A, B, i y j se definen más arriba.

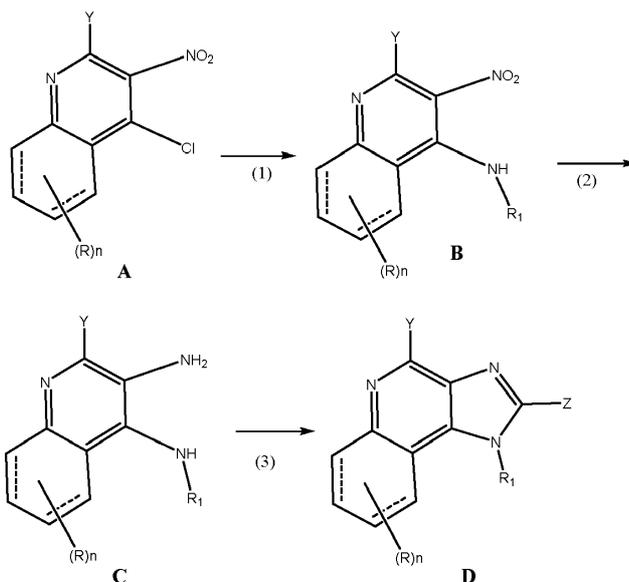
20 El conector puede seleccionarse entre S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, -Gly-Phe-Leu-Gly-, -Ala-Leu-Ala-Leu-, -Phe-Arg-, -Phe-Lys-, -Val-Lys-, -Val-Ala-, o Val-Cit-, en donde S1-S7 están representados por las siguientes estructuras:



en donde cada m es independientemente de 1 a 20. Preferiblemente, m es de 1 a 3, de 1 a 5, de 1 a 10 o de 2 a 5.

Preparación de los Compuestos

5 En general, el radical de activación representado por las estructuras de fórmula (I) se puede preparar utilizando los procedimientos sintéticos que se describen a continuación. En la etapa (1), se hace reaccionar una 4-cloro-3-nitroquinolina de fórmula A con una amina de fórmula R_1NH_2 para proporcionar una 3-nitroquinolino-4-amina de fórmula B. En la etapa 2, la 3-nitroquinolino-4-amina de fórmula B se reduce para proporcionar una quinoíno-3-4-diamina de fórmula C. En la etapa 3, la quinoíno-3-4-diamina de fórmula C se hace reaccionar con un ácido carboxílico o un equivalente del mismo para proporcionar una 1H-imidazo[4,5c]quinolina de fórmula D.



10 Alternativamente, los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar de acuerdo con métodos sintéticos descritos en los documentos US6.331.539B1, US6.451.810B1, US7.157.452 y US7.301027B2.

15 Los compuestos de fórmula (Ia) y (Ib) se pueden preparar utilizando un conector para conectar tanto con un radical de direccionamiento como con un radical de activación. El conector utiliza sus sitios reactivos para unirse a los radicales de direccionamiento y activación. En algunas realizaciones, la unión se realiza mediante la formación de enlaces covalentes entre el conector y los radicales de direccionamiento y activación. Los sitios reactivos pueden ser grupos nucleófilos. Los sitios reactivos pueden ser grupos electrófilos. Los grupos nucleófilos útiles en un conector incluyen, pero no se limitan a, grupos hidrazida, oxima, amino, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida. Los grupos electrófilos útiles incluyen, pero no se limitan a, grupos maleimida, carbonato y haloacetamida.

20 Formulaciones Farmacéuticas y Administración

La presente invención se refiere adicionalmente a una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptables y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

25 Los compuestos descritos en el presente documento, incluidos los portadores farmacéuticamente aceptables, tales como las sales de adición o sus hidratos, se pueden suministrar a un paciente utilizando una amplia variedad de vías o modos de administración. Las vías de administración adecuadas incluyen, pero sin limitarse a, la administración por inhalación, transdérmica, oral, rectal, transmucosa, intestinal y parenteral, incluidas las inyecciones intramusculares, subcutáneas e intravenosas. Los compuestos de la invención que comprenden un anticuerpo o fragmento de anticuerpo como radical de direccionamiento pueden administrarse por vía parenteral, más preferiblemente por vía intravenosa.

30 Como se emplea en el presente documento, se pretende que los términos "administrar" o "administración" abarquen todos los medios para suministrar directa o indirectamente un compuesto en su sitio de acción previsto.

Los compuestos descritos en el presente documento, o sus sales y/o hidratos farmacéuticamente aceptables, pueden administrarse individualmente, combinados con otros compuestos de la invención y/o en cócteles combinados con otros agentes terapéuticos. Por supuesto, la elección de los agentes terapéuticos que pueden administrarse conjuntamente con los compuestos de la invención dependerá, en parte, de la afección que se esté tratando.

35 Por ejemplo, cuando se administran a pacientes que padecen un estado patológico causado por un organismo que depende de un autoinductor, los compuestos de la divulgación pueden administrarse en cócteles que contienen agentes utilizados para tratar el dolor, la infección y otros síntomas y efectos secundarios comúnmente asociados con

la enfermedad. Tales agentes incluyen, p. ej., analgésicos, antibióticos, etc.

Cuando se administran a un paciente que se somete a un tratamiento contra el cáncer, los compuestos se pueden administrar en cócteles que contienen agentes anticancerosos y/o agentes potenciadores complementarios. Los compuestos también se pueden administrar en cócteles que contienen agentes que tratan los efectos secundarios de la radioterapia, tales como antieméticos, protectores de radiación, etc.

Los agentes potenciadores complementarios que se pueden administrar conjuntamente con los compuestos de la invención incluyen, p. ej., fármacos antidepresivos tricíclicos (p. ej., imipramina, desipramina, amitriptilina, clomipramina, trimipramina, doxepina, nortriptilina, protriptilina, amoxapina y maprotilina); fármacos no tricíclicos y antidepresivos (p. ej., sertralina, trazodona y citalopram); antagonistas de Ca^{+2} (p. ej., verapamilo, nifedipina, nitrendipina y caroverina); anfotericina; análogos de triparanol (p. ej., tamoxifeno); fármacos antiarrítmicos (p. ej., quinidina); fármacos antihipertensivos (p. ej., reserpina); agotadores de tiol (p. ej., butionina y sulfoximina); y leucovorina cálcica.

El compuesto o los compuestos activos de la invención se administran per se o en forma de una composición farmacéutica en donde el compuesto o los compuestos activos están mezclados con uno o más portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se formulan típicamente de manera convencional utilizando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Para la administración transmucosa, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se deba atravesar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

Para la administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando el compuesto o los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones para la ingestión oral por parte de un paciente que se vaya a tratar. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener con excipiente sólido, opcionalmente moliendo una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados, si se desea para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una de sus sales, tal como alginato sódico.

Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados. Para ello se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las preparaciones farmacéuticas, que se pueden utilizar por vía oral, incluyen cápsulas de gelatina que encajan a presión, así como cápsulas blandas selladas preparadas a partir de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de encaje a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para tal administración.

Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

Para la administración por inhalación, los compuestos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para utilizar en un inhalador o insuflador que contengan una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos pueden formularse para administración parenteral por inyección, p. ej., por inyección en bolo o infusión continua. La inyección es un método de administración preferido para las composiciones de la presente invención. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como

suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

5 Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Además, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como suspensiones inyectables oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede
10 contener estabilizantes o agentes adecuados, que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Para su inyección, los agentes de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico.

15 Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

Los compuestos también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

20 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación o suministro transcutáneo (p. ej., por vía subcutánea o intramuscular), inyección intramuscular o parche transdérmico. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (p. ej., como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

25 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender portadores o excipientes adecuados en fase sólida o gel. Los ejemplos de tales portadores o excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

30 Una composición farmacéutica preferida es una composición formulada para inyección tal como inyección intravenosa e incluye de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 100% en peso del compuesto de la presente invención, basándose en 100% en peso de la composición farmacéutica total. El producto conjugado de fármaco-ligando puede ser un producto conjugado de anticuerpo-citotoxina en donde el anticuerpo ha sido seleccionado para dirigirse a un cáncer particular.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente invención comprende adicionalmente un agente terapéutico adicional.

El agente terapéutico adicional es un agente anticanceroso.

35 El agente anticanceroso adicional se selecciona entre un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa I y II, un agente alquilante, un inhibidor de microtúbulos, un agente antiandrógeno, un modulador de GNRh o mezclas de los mismos.

El agente terapéutico adicional puede ser un agente quimioterapéutico.

40 Por "agente quimioterapéutico" se entiende en el presente documento un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos son, pero sin limitarse a, Gemcitabina, Irinotecán, Doxorrubicina, 5-Fluorouracilo, Arabinósido de citosina ("Ara-C"), Ciclofosfamida, Tiotepa, Busulfán, Citotoxina, TAXOL, Metotrexato, Cisplatino, Melfalán, Vinblastina y Carboplatino.

45 El segundo agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en tamoxifeno, raloxifeno, anastrozol, exemestano, letrozol, imatanib, paclitaxel, ciclofosfamida, lovastatina, minosina, gemcitabina, citarabina, 5-fluorouracilo, metotrexato, docetaxel, goserelina, vincristina, vinblastina, nocodazol, tenipósido, etopósido, gemcitabina, epotilona, vinorelbina, camptotecina, daunorrubicina, actinomicina D, mitoxantrona, acridina, doxorrubicina, epirubicina o idarrubicina.

Kits

50 También se divulgan kits que contienen uno o más de los compuestos o composiciones de la divulgación e instrucciones para utilizar el compuesto o composición. Un kit puede ser para conjugar un brazo conector de la invención con otra molécula. El kit incluye el conector e instrucciones para anclar el conector a un grupo funcional particular. El kit también puede incluir uno o más de un fármaco citotóxico, un agente de direccionamiento, una marca detectable, sales farmacéuticas o tampones. El kit también puede incluir un recipiente y, opcionalmente, uno o más viales, tubos de ensayo, matraces, frascos o jeringas. Otros formatos de kits serán evidentes para los expertos en la técnica y están dentro del alcance de la presente invención.

Uso médico

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente invención y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento, particularmente para su uso en el tratamiento del cáncer.

- 5 Además de las composiciones y construcciones descritas anteriormente, la presente divulgación también incluye varios usos médicos de los compuestos de la invención. Los compuestos de la divulgación pueden utilizarse para destruir o inhibir el crecimiento, la proliferación o la replicación de una célula tumoral o una célula cancerosa, tratar el cáncer, tratar una afección precancerosa, prevenir la multiplicación de una célula tumoral o una célula cancerosa, prevenir el cáncer, o prevenir la multiplicación de una célula que expresa un anticuerpo autoinmunitario.
- 10 El compuesto de la presente invención es útil para tratar enfermedades tales como el cáncer en un sujeto, tal como un ser humano. Se divulgan composiciones para su uso en el tratamiento de tumores proporcionando a un sujeto la composición de una manera farmacéuticamente aceptable, con una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición de la presente invención. El tumor puede ser metastásico o no metastásico.

- 15 Por "cáncer" o "tumor" en el presente documento se entiende el estado patológico en seres humanos que se caracteriza por una proliferación celular no regulada. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: carcinoma, linfoma, blastoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de cáncer incluyen, pero no se limitan a: pulmón (células pequeñas y no pequeñas), mama, próstata, carcinóide, vejiga, gástrico, pancreático, hígado (hepatocelular), hepatoblastoma, colorrectal, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, esofágico, ovárico, cervical, endometrial, mesotelioma, melanoma, sarcoma, osteosarcoma, liposarcoma, tiroides, desmoides, leucemia mielocítica aguda (LMA) y leucemia mielocítica crónica (LMC).
- 20

- Por "inhibir" o "tratar" o "tratamiento" en el presente documento se entiende la reducción, el tratamiento terapéutico y el tratamiento profiláctico o preventivo, en donde el objetivo es reducir o prevenir el trastorno o afección patológicos buscados. En un ejemplo, tras la administración de un compuesto de la presente invención, un paciente con cáncer puede experimentar una reducción del tamaño del tumor. "Tratamiento" o "tratar" incluye (1) inhibir una enfermedad en un sujeto que experimenta o muestra la patología o los síntomas de la enfermedad, (2) mejorar una enfermedad en un sujeto que experimenta o muestra la patología o los síntomas de la enfermedad, y/o (3) afectar a cualquier disminución medible de una enfermedad en un sujeto o paciente que está experimentando o mostrando la patología o los síntomas de la enfermedad. En la medida en que un compuesto de la presente invención pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas, puede ser citostático y/o citotóxico.
- 25

- 30 Por "cantidad terapéuticamente eficaz" en el presente documento se entiende una cantidad de un compuesto proporcionado en el presente documento eficaz para "tratar" un trastorno en un sujeto o 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 la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, inhibir la metástasis tumoral, inhibir el crecimiento tumoral hasta cierto punto y/o aliviar uno o más de los síntomas asociados con el cáncer hasta cierto punto.

- 35 La presente invención proporciona compuestos para tratar un tumor/cáncer. El tumor o cáncer pueden estar en cualquier estadio, p. ej., temprano o avanzado, tal como un tumor o cáncer en estadio I, II, III, IV o V. El tumor o cáncer pueden ser metastásicos o no metastásicos. En el contexto de la metástasis, los tratamientos divulgados pueden reducir o inhibir la metástasis de un tumor o cáncer primarios a otros sitios, o la formación o establecimiento de tumores o cánceres metastásicos en otros sitios distantes del tumor primario o de la terapia contra el cáncer. Por lo tanto, los tratamientos de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, 1) reducir o inhibir el crecimiento, la proliferación, la movilidad o la invasividad de células tumorales o cancerosas que potencialmente desarrollan metástasis (p. ej., células tumorales diseminadas, DTC); 2) reducir o inhibir la formación o el establecimiento de metástasis que surgen de un tumor o cáncer primario en uno o más sitios, ubicaciones o regiones distintas del tumor o cáncer primario; 3) reducir o inhibir el crecimiento o proliferación de una metástasis en uno o más sitios, ubicaciones o regiones distintos del tumor primario o cáncer después de que se haya formado o establecido una metástasis; y 4) reducir o inhibir la formación o el establecimiento de metástasis adicionales después de que se haya formado o establecido la metástasis.
- 40
- 45

- El tumor o cáncer puede ser una masa celular sólida o líquida. Un tumor "sólido" se refiere a cáncer, neoplasia o metástasis que típicamente se agregan y forman una masa. Los ejemplos específicos no limitantes incluyen tumores/cánceres de mama, ovario, útero, cuello uterino, estómago, pulmón, gástrico, colon, vejiga, glía y endometrio, etc. Un tumor líquido se refiere a una neoplasia que se dispersa o es de naturaleza difusa, ya que típicamente no forma una masa sólida. Los ejemplos particulares incluyen neoplasia del sistema reticuloendotelial o hematopoyético, tales como linfomas, mielomas y leucemias. Los ejemplos no limitantes de leucemias incluyen, linfoblástica, mielooblástica agudas y crónicas y mieloma múltiple. Típicamente, tales enfermedades surgen de leucemias agudas escasamente diferenciadas, p. ej., leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides específicos incluyen, pero no se limitan a, leucemia promielocítica aguda (LPMA), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (LMC). Las neoplasias linfoides incluyen, pero sin limitarse a, leucemia linfoblástica aguda (LLA), que incluye LLA de linaje B (LLA-B) y LLA de linaje T (LLA-T), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (LPL), leucemia de células pilosas (LCP) y macroglobulinemia de Waldenstroem (MW). Los linfomas malignos específicos incluyen linfoma no Hodgkin y variantes, linfomas de células T periféricas,
- 50
- 55

leucemia/linfoma de células T adultas (LTA), linfoma cutáneo de células T (LCCT), leucemia linfocítica granular grande (LGG), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

5 Los tratamientos de la presente invención se pueden poner en práctica con otros tratamientos o terapias (p. ej., resección quirúrgica, radioterapia, radioterapia ionizante o química, quimioterapia, inmunoterapia, terapia térmica local o regional (hipertermia) o vacunación). Tales otros tratamientos o terapias pueden administrarse antes, sustancialmente al mismo tiempo (por separado o en una mezcla) o después de la administración de los compuestos de la presente invención.

10 En algunas realizaciones, los tratamientos de la presente invención comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención combinado con un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional es un agente anticanceroso/antitumoral seleccionado entre un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa I y II, un agente alquilante, un inhibidor de microtúbulos, un agente antiandrógeno, un modulador de GNRh o mezclas de los mismos. El agente terapéutico adicional puede seleccionarse del grupo que consiste en tamoxifeno, raloxifeno, anastrozol, exemestano, letrozol, imatanib, paclitaxel, ciclofosfamida, lovastatina, minosina, gemcitabina, citarabina, 5-fluorouracilo, metotrexato, docetaxel, goserelina, vincristina, vinblastina, nocodazol, tenipósido, etopósido, gemcitabina, epotilona, vinorelbina, camptotecina, daunorrubicina, actinomicina D, mitoxantrona, acridina, doxorrubicina, epirubicina o idarrubicina.

15 La administración "combinada con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden. Como se emplea en el presente documento, el término "combinación farmacéutica" se refiere a un producto obtenido al mezclar o combinar ingredientes activos, e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los ingredientes activos. El término "combinación fija" significa que los ingredientes activos, p. ej., un compuesto de Fórmula (1) y un coagente, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una sola entidad o dosificación. El término "combinación no fija" significa que los ingredientes activos, p. ej., un compuesto de Fórmula (1) y un coagente, se administran a un paciente como entidades separadas de forma simultánea, concurrente o secuencial sin límites de tiempo específicos, en donde tal administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los ingredientes activos en el organismo del paciente. Esto último también se aplica a la terapia de cócteles, p. ej., la administración de tres o más ingredientes activos.

20 El estado patológico es un tumor o cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer o tumor se seleccionan entre cáncer de estómago, colon, recto, hígado, páncreas, pulmón, mama, cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, testículo, vejiga, riñón, cerebro/SNC, cabeza y cuello, garganta, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, melanoma, cáncer de piel no melanoma, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, sarcoma de Ewing, cáncer de pulmón de células pequeñas, coriocarcinoma, rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, leucemia de células pilosas, boca/faringe, esófago, laringe, cáncer de riñón o linfoma.

El estado patológico puede comprender una proliferación celular anormal, tal como una lesión precancerosa.

35 La presente invención es particularmente útil para el tratamiento del cáncer y para la inhibición de la multiplicación de una célula tumoral o célula cancerosa en un animal. El cáncer, o una afección precancerosa, incluyen un tumor, metástasis o cualquier enfermedad o trastorno caracterizados por un crecimiento celular descontrolado, puede tratarse o prevenirse mediante la administración del complejo de fármaco-ligando de la presente divulgación. El compuesto suministra el radical de activación a una célula tumoral o a una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el radical de direccionamiento se une o se asocia específicamente con una célula cancerosa o un antígeno asociado a una célula tumoral. Debido a su estrecha proximidad al ligando, después de ser internalizado, el radical de activación puede incorporarse dentro de una célula tumoral o una célula cancerosa mediante, por ejemplo, endocitosis mediada por receptor. El antígeno se puede anclar a una célula tumoral o a una célula cancerosa o puede ser una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o a la célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, el conector se escinde hidrolítica o enzimáticamente por proteasas asociadas a células tumorales o células cancerosas, liberando así el radical de activación. El radical de activación liberado queda libre después para difundirse e inducir o potenciar la actividad inmunitaria de las células inmunitarias o las células tumorales. Alternativamente, el radical de activación se puede escindir del compuesto en el microambiente tumoral y el fármaco penetrar posteriormente en la célula.

45 Los ejemplos representativos de afecciones precancerosas que pueden ser elegidas como diana de los compuestos de la presente invención incluyen: metaplasia, hiperplasia, displasia, pólipos colorrectales, cetatosis actínica, queratitis actínica, virus del papiloma humano, leucoplasia, liquen plano y enfermedad de Bowen.

50 Los ejemplos representativos de cánceres o tumores a los que pueden dirigirse los compuestos de la presente invención incluyen: cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, linfoma, melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer del SNC, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer oral, cáncer nasal, cáncer de cuello uterino y leucemia. Será evidente para el experto en la técnica que el radical de direccionamiento particular utilizado en el compuesto se puede elegir de manera que dirija el radical de activación al tejido tumoral que se va a tratar con el fármaco (es decir, se elige un agente de direccionamiento específico para un antígeno específico del tumor). Los ejemplos de tal radical de direccionamiento son bien conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales incluyen anti-Her2 para el tratamiento del cáncer de mama, anti-CD20 para el tratamiento del linfoma, anti-PSMA para el tratamiento del cáncer de próstata y anti-CD30 para el tratamiento de los

linfomas, incluido el linfoma no Hodgkin.

La proliferación anormal puede ser de células cancerosas.

5 En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer colorrectal, linfoma difuso de células B grandes, cáncer de endometrio, linfoma folicular, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y carcinoma de células renales.

10 La presente divulgación incluye un compuesto para su uso en la destrucción de una célula. El compuesto se administra a la célula en una cantidad suficiente para destruir dicha célula. Adicionalmente, la administración puede servir para retrasar o detener el crecimiento de un tumor que incluye la célula (p. ej., la célula puede ser una célula tumoral). Para que la administración retrase el crecimiento, la tasa de crecimiento de la célula debe ser al menos 10% menor que la tasa de crecimiento antes de la administración. Preferiblemente, la tasa de crecimiento se retrasará al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o se detendrá por completo.

15 Además, la presente divulgación incluye un compuesto o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso como medicamento. La presente divulgación también incluye un compuesto o una composición farmacéutica para destruir, inhibir o retrasar la proliferación de una célula tumoral o cancerosa, o para tratar una enfermedad en donde están implicados TLR7 y/o TLR8.

Dosificaciones eficaces

20 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso con la presente invención incluyen composiciones en donde el ingrediente activo está contenido en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad eficaz para lograr el propósito previsto. La cantidad real eficaz para una aplicación en particular dependerá, pero sin limitarse a, la afección que se esté tratando. La determinación de una cantidad eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada en el presente documento.

25 Para cualquier compuesto descrito en el presente documento, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Las concentraciones plasmáticas diana serán aquellas concentraciones de compuesto o compuestos activos que sean capaces de inhibir el crecimiento o la división celulares. En realizaciones preferidas, la actividad celular se inhibe al menos en 25%. Actualmente se prefieren concentraciones plasmáticas diana de compuesto o compuestos activos que sean capaces de inducir al menos aproximadamente 30%, 50%, 75% o incluso 90% o más de inhibición de la actividad celular. El porcentaje de inhibición de la actividad celular en el paciente puede controlarse para evaluar la idoneidad de la concentración de fármaco en plasma lograda, y la dosificación puede ajustarse hacia arriba o hacia abajo para lograr el porcentaje de inhibición deseado.

30 Como es bien sabido en la técnica, las cantidades terapéuticamente eficaces para su uso en seres humanos también pueden determinarse a partir de modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis para seres humanos para lograr una concentración circulante que se haya encontrado eficaz en animales. La dosificación en seres humanos se puede ajustar controlando la inhibición celular y ajustando la dosis hacia arriba o hacia abajo, como se describió anteriormente.

También puede determinarse una dosis terapéuticamente eficaz a partir de datos en seres humanos para compuestos que se sabe que muestran actividades farmacológicas similares. La dosis aplicada se puede ajustar en función de la biodisponibilidad relativa y la potencia del compuesto administrado en comparación con el compuesto conocido.

40 El ajuste de la dosis para conseguir la máxima eficacia en seres humanos basándose en los métodos descritos anteriormente y otros métodos bien conocidos en la técnica está dentro de las capacidades del experto en la técnica.

En el caso de la administración local, la concentración circulante sistémica del compuesto administrado no tendrá una importancia particular. En tales casos, el compuesto se administra para lograr una concentración en la zona local eficaz para lograr el resultado deseado.

45 Para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con la proliferación celular anormal, se prefiere una concentración circulante del compuesto administrado de aproximadamente 0,001 μM a 20 μM , prefiriéndose aproximadamente de 0,01 μM a 5 μM .

50 Las dosis en pacientes para la administración oral de los compuestos descritos en el presente documento oscilan típicamente entre aproximadamente 1 mg/día y aproximadamente 10.000 mg/día, más típicamente entre aproximadamente 10 mg/día y aproximadamente 1.000 mg/día, y lo más típicamente entre aproximadamente 50 mg/día y aproximadamente 500 mg/día. Expresado en términos del peso corporal del paciente, las dosificaciones típicas oscilan entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 150 mg/kg/día, más típicamente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 15 mg/kg/día, y los más típicamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg/kg/día, por ejemplo 5 mg/kg/día o 3 mg/kg/día.

Las dosis en pacientes que retardan o inhiben el crecimiento tumoral pueden ser de 1 $\mu\text{mol/kg/día}$ o menos. Por ejemplo,

las dosis en pacientes pueden ser 0,9, 0,6, 0,5, 0,45, 0,3, 0,2, 0,15 o 0,1 μ moles/kg/día o menos (refiriéndose a los moles del fármaco). Preferiblemente, los productos conjugados de anticuerpo con fármacos retardan el crecimiento del tumor cuando se administran a la cantidad de dosificación diaria durante un periodo de al menos cinco días.

5 Para otros modos de administración, la cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del compuesto administrado eficaces para la indicación clínica particular que se está tratando. Por ejemplo, un compuesto según la invención se puede administrar a concentraciones relativamente altas varias veces al día. Alternativamente, puede ser más deseable administrar un compuesto de la invención a concentraciones eficaces mínimas y utilizar un régimen de administración menos frecuente. Esto proporcionará un régimen terapéutico acorde con la gravedad de la enfermedad del individuo.

10 Utilizando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, se puede planificar un régimen de tratamiento terapéutico eficaz que no provoque toxicidad sustancial y, sin embargo, sea totalmente eficaz para tratar los síntomas clínicos demostrados por el paciente en particular. Esta planificación debe implicar la elección cuidadosa del compuesto activo considerando factores tales como la potencia del compuesto, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la presencia y la gravedad de los efectos secundarios adversos, el modo de administración preferido y el perfil de toxicidad del agente seleccionado.

15 Se pretende que las reivindicaciones adjuntas definan el alcance de la invención.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente, pero no está limitada, por los siguientes Ejemplos que ilustran la preparación de los compuestos de la invención.

20 Ejemplo 1

Generación de líneas de células L transfectadas con her2 o egfr

Reactivos: la célula L era de ATCC (Manassas, VA; Núm. Cat. CRL2648), el ADNc de Her2/pEZ-Lv105 o egfr/pCMV se adquirió de Sino Biological Inc., (Núm. Cat. H10004) o GeneCopeia, (Núm. Cat. Z2866), glucosa DMEM, L-glutamina, Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Carlsbad, CA).

25 Para preparar líneas celulares para escrutar el Trastuzumab conjugado, se generaron células L que expresaban Her2 o EGFR etiquetados. La construcción de ADNc de Her2/pEZ-Lv105 o egfr/pCMV se transfectó a células L (que crecieron en DMEM con alto contenido de glucosa + FBS al 10% + células L-glutamina 2 mM) mediante el protocolo Lipofectamine 2000 convencional.

Análisis de unión (Análisis FACS)

30 Para determinar la capacidad de unión de Trastuzumab conjugado, se realizaron análisis FACS de células L que expresaban her2 humano. Brevemente, se incubaron aproximadamente 10^6 células de células L con her2 transfectado transitoriamente en 100 μ l con cantidades variables de anticuerpo conjugado Trastuzumab, se utilizaron PBS o anticuerpo secundario solo o hulgG irrelevante como control negativo. Después del lavado, las células se resuspendieron en tampón FACS y se incubaron 30 min a temperatura ambiente con 20 μ L de anticuerpo secundario anti-IgG humana de ratón conjugado con ficoeritrina (anti-humana Mu-PE) en un volumen de reacción de 100 μ L.

35 Después del lavado, las células se fijaron en 200 μ l de paraformaldehído/PBS al 2% y se realizó una citometría de flujo. Se usó el mismo procedimiento para el anticuerpo IgG humano irrelevante como control de isotipo para establecer la PMT de referencia por línea celular. La citometría de flujo se realizó en un BD FACSCalibur® y se registró la intensidad de fluorescencia media geométrica para cada muestra. Los datos registrados se analizaron utilizando el soporte lógico FlowJo. Los resultados se muestran en la Figura 1.

40

Generación de anticuerpos con productos conjugados de ligando de receptor tipo toll

Reactivos: Trastuzumab (Roche/Genentech Corporation, San Francisco Sur, CA), Cetuximab (Merck); MC-val-cit-PAB conectado con resiquimod (MC-vc-PAB-TLRL) o MC conectado con resiquimod (MC-TLRL) (Sintetizado en Contract Research Organization, China), Borato de sodio, Cloruro de sodio, Ditiotreitól (DTT), Sephadex G25, DTPA, DTNB y Maleimidocaproil-monometilo (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin).

45

Los fármacos utilizados para la generación de productos conjugados de ligando de TLR con anticuerpos incluyeron Trastuzumab y resiquimod (TLRL), en algunos casos, se utilizó Cetuximab para los productos conjugados. Los conectores utilizados para la generación de la TLAC fueron el conector escindible MC-vc-PAB o el conector no escindible MC.

50 Preparación de Trastuzumab MC-TLRL o Cetuximab MC-TLRL

Se purificó Trastuzumab a partir de HERCEPTIN® mediante intercambio de tampón a 20 mg/mL, y el anticuerpo disuelto en borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0 se trató con un exceso de ditiotreitól (DTT) 100 mM. Después de la incubación a 37°C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se cambió por elución

sobre resina Sephadex G25 y se eluyó con PBS con DTPA 1 mM. El valor tiol/Ab se comprobó determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin) y determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfrió en hielo. El reactivo conector de fármaco, Mc-ligado con resiquimod, disuelto en DMSO, se diluyó en acetonitrilo y agua a una concentración conocida y se añadió al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añadió un exceso de maleimida para sofocar la reacción y proteger cualquier grupo tiol del anticuerpo que no haya reaccionado. En algún caso, se realizó acoplamiento a lisinas de inmunoglobulina con procedimiento convencional. La mezcla de reacción se concentró mediante ultrafiltración centrífuga y el anticuerpo conjugado se purificó y desaló mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtró a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles y se congeló para su almacenamiento. La preparación de Cetuximab MC-TLRL utilizó el mismo procedimiento.

Preparación de Trastuzumab MC-vc-TLRL o Cetuximab MC-vc-TLRL

Los anticuerpos se conectaron a TLRL a través de la cisteína mediante maleimidocaproil-valina-citrulina (vc)-p-aminobenciloxicarbonilo (MC-vc-PAB). El conector MC-vc-PAB es escindible por proteasas intercelulares tales como cathepsina B y, cuando se escinde, libera fármaco libre (Doronina et al., Nat. Biotechnol., 21: 778-784 (2003)) mientras que el conector MC es resistente a la escisión por proteasas intracelulares. El Trastuzumab purificado se disolvió en borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0 y se trató adicionalmente con un exceso de ditioneitol (DTT) 100 mM. Después de la incubación a 37°C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se cambió por elución sobre resina Sephadex G25 y se eluyó con PBS con DTPA 1 mM. El valor tiol/Ab se comprobó determinando la concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol por reacción con DTNB (Sigma-Aldrich, Milwaukee, Wisconsin) y determinación de la absorbancia a 412 nm (coeficiente de extinción = 13600 cm⁻¹M⁻¹). El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfrió en hielo. El MC-val-cit-PAB-PNP conectado con resiquimod en DMSO se disolvió en acetonitrilo y agua y se añadió al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de una hora de incubación, se añadió un exceso de maleimida para sofocar la reacción y proteger cualquier grupo tiol del anticuerpo que no haya reaccionado. En algún caso, se realizó acoplamiento a lisinas de inmunoglobulina con procedimiento convencional. La mezcla de reacción se concentró mediante ultrafiltración centrífuga y el producto conjugado de anticuerpo y fármaco se purificó y desaló mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtró a través de filtros de 0,2 µm en condiciones estériles y se congeló para su almacenamiento. La preparación de Cetuximab MC-vc-TLRL utilizó el mismo procedimiento.

Típicamente, una reacción de conjugación de anticuerpo con MC-TLRL o MC-vc-TLRL da como resultado una mezcla heterogénea que comprende anticuerpos con diferente número de fármacos TLRL conjugados anclado, es decir, carga de fármacos donde el fármaco tiene una distribución de 1 a aproximadamente 8. Por lo tanto, el anticuerpo MC-TLRL, o el anticuerpo MC-vc-TLRL, incluyen moléculas de especies aisladas y purificadas, así como mezclas de carga promedio de fármaco de 1 a 8. Por proceso de control, las cargas de fármaco estuvieron en el rango de 3-5. El número promedio de radicales de fármaco TLRL por anticuerpo en preparaciones de compuestos a partir de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopia de masas, ensayo ELISA, electroforesis y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa del anticuerpo MC-TLRL o del anticuerpo MC-vc-TLRL en términos de fármaco. Mediante ELISA, se puede determinar el valor promedio del número de carga útil del fármaco en una preparación particular de anticuerpo con conjugación de TLRL (Hamblett et al (2004) Clinical Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clinical Cancer Res. 11:843-852). Sin embargo, la distribución de los valores del fármaco no es perceptible por la limitación de detección y unión anticuerpo-antígeno del ELISA. Asimismo, el ensayo ELISA para la detección de productos conjugados de anticuerpo y fármaco no determina dónde se anclan los radicales del fármaco al anticuerpo, por ejemplo, los fragmentos de cadena pesada o de cadena ligera, o los restos de aminoácidos particulares. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de Trastuzumab MC-TLRL o Trastuzumab MC-vc-TLRL homogéneos donde el fármaco tiene un cierto valor de Trastuzumab MC-TLRL o Trastuzumab MC-vc-TLRL con otras cargas de fármacos puede lograrse mediante métodos tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

Ensayo de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)

Reactivos: las células SKBR3 (ATCC, Núm. de catálogo HTB-30), 5A de McCoy (Invitrogen, Núm. Cat. 22400, Núm. de Lote. 747809); RPMI-1640 (Invitrogen, Núm. Cat. 11835, Núm. de Lote 764956); FCS (Hyclone, Núm. Cat. SH30084.03, Núm. de lote GRH0054); Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Núm. Cat. 17-1440-02), placa de 96 pocillos (Costar, Núm. Cat. 3599, Núm. Cat. 3916); azul de tripán (Invitrogen Núm. Cat. 15250-061); Kit LDH (Promega, Núm. Cat. G7891), lector de ELISA MD5 (Molecular device), anticuerpo humanizado Herceptin® (Genentech Corporation, San Francisco Sur, CA; nombre comercial Trastuzumab) se reconstituyeron con agua para preparar una solución de partida de 10 mg/ml antes de su uso.

Para determinar si Trastuzumab conjugado con una alta carga útil de TLRL aún tendría función efectora, se probaron las actividades de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de las diferentes formas de conjugación y se compararon con la actividad ADCC del material de referencia Trastuzumab que se ha demostrado que mejoraba significativamente la actividad ADCC. Los ensayos de ADCC se llevaron a cabo utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos como células efectoras y una línea celular SKBR3 humana como células diana. El primer día, se sembraron en placas de 96 pocillos 1 × 10⁴/100 ul de células SKBR3

seguido de incubación a 37°C con CO₂ al 5% durante 48 horas.

Al tercer día, se prepararon PBMC humanas de nueva aportación a partir de sangre humana obtenida de donantes voluntarios sanos. Las muestras de sangre venosa humana se recogieron en tubos de citrato de amonio (ACD-A). Los tubos se invirtieron varias veces y la sangre total se transfirió a un tubo cónico de 50 mL. La sangre se diluyó 1:3 con PBS en FBS al 2%. Se dispensó lentamente Ficoll-Hypaque debajo de la mezcla de sangre/PBS. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 2400 rpm durante 30 minutos antes de eliminar la capa superior (plasma/PBS) por aspiración. Las capas leucocitarias se recogieron con pipetas estériles y se agruparon en un tubo cónico de 50 mL. Si quedaban grumos visibles de GB por debajo de la capa leucocitaria, se recolectaba todo el material de GB, con cuidado de no eliminar el exceso de Ficoll-Hypaque. Se añadió PBS estéril-FBS al 2% y se mezcló por inversión. Las suspensiones de PBMC diluidas se centrifugaron a 250 × g a temperatura ambiente durante 20 minutos y se recogió el sedimento celular. El sedimento de PBMC se suspendió en medio RPMI-1640 con FBS inactivado por calor al 2%, se lavó y se comprobó el número de células viables mediante exclusión con azul de tripán. Se prepararon 1,2 × 10⁷ células/mL en densidad y quedaron listas para su uso. Mientras tanto, las concentraciones finales de anticuerpos que oscilaron entre 12, 4, 1,2, 0,4, 0,12, 0,04, 0,012, 0,004 y 0 µg/mL se prepararon en RPMI-1640.

A continuación, se añadieron diluciones seriadas de anticuerpos de prueba y de control a los pocillos que contenían las células diana, se añadieron células efectoras PBMC en 50 µl de medio RPMI-1640 a cada pocillo con una proporción de células efectoras:células diana de 60:1 y se incubaron durante 17 horas más. Las placas se centrifugaron al final de la incubación y se analizó la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) de los sobrenadantes utilizando un kit de medición de LDH. La lisis celular se cuantificó a través de la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de microplacas. La absorbancia de los pocillos que contenían solo las células diana sirvió como control del fondo, mientras que los pocillos que contenían las células diana lisadas con Triton-X100 proporcionaron la señal máxima disponible. La citotoxicidad celular independiente de anticuerpos se midió en pocillos que contenían células diana y efectoras sin la adición de anticuerpos. La citotoxicidad se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = 100\% \times \frac{[A490\text{nm (Muestra)} - A490 (\text{célula diana}) - A490 (\text{Células Efect.})]}{[A490 (\text{Células diana lisadas}) - A490 (\text{células diana})]}$$

Los valores medios de ADCC de los duplicados de las diluciones de muestras se representaron frente a la concentración de anticuerpos, y los valores de CE50 y el grado máximo de ADCC (%) se generaron ajustando Prism 5 (GraphPad).

Enriquecimiento de células dendríticas (DC) humanas de PBMC

Se prepararon PBMC humanas a partir de capas leucocitarias obtenidas de donantes voluntarios sanos mediante centrifugación con Ficoll. Las células dendríticas se enriquecieron utilizando agotamiento negativo con cuentas magnéticas (Miltenyi Biotec) con una mezcla de anticuerpos anti-CD3, CD19, CD20, CD14 y CD16 de PBMC humanas. El enriquecimiento de DC se teñió con anti-ratón de cabra-FITC (linajes), HLA-DR-APCCy7, CD123-BV421 y CD11C-APC. Las células teñidas se analizaron en BD LSR Fortessa. Los anticuerpos monoclonales anti-CD3, CD4, CD11C, CD19, CD14, CD16, CD123 se adquirieron de BD Biosciences o Biogend.

La Figura 3(a) muestra los porcentajes de DC antes y después del enriquecimiento. Los números en los dos gráficos superiores representan los porcentajes de DC (HLA-DR+Lin-) del total de células antes y después del agotamiento del linaje. Los números en los gráficos inferiores representan porcentajes de mDC (CD11C+CD123-) y pDC (CD123+CD11C-) del total de DC antes y después del agotamiento del linaje.

Estimulación de DC humanas enriquecidas y expresión de citocinas

Se sembraron en una placa de 96 pocillos 1-2 × 10⁵ DC enriquecidas en 100 µl de medio, se añadieron a la placa 100 µl de estimuladores diluidos y se cultivaron durante 20-22 h en una incubadora a 37°C. Se recogió el sobrenadante y se analizaron mediante ELISA (Mabtech AB) IFN-α, IL-6, IL-12(p70) y TNF-α humanos.

Análisis estadístico

La significación de todas las comparaciones se calculó utilizando una prueba t de Student de dos colas, suponiendo una varianza desigual entre los grupos simulado y de muestra, y los resultados se consideraron significativos cuando p<0,05. Las correlaciones entre los parámetros se evaluaron utilizando la prueba de correlación de rangos de Spearman, los valores de P <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Ensayo de destrucción de células tumorales in vivo utilizando productos conjugados de Trastuzumab TLRL o productos conjugados de Cetuximab TLRL

Para el desarrollo de modelos de ratones con xenoinjerto de carcinoma gástrico (PDX) derivados de pacientes, se utilizaron ratones carentes de sistema inmunitario Balb/c hembra (de SLAC, Shanghái, China) de 6 a 8 semanas de edad para la implantación de fragmentos tumorales. Los animales se alimentaron con una dieta normal para ratones carentes de sistema inmunitario y se alojaron en instalaciones para animales SPF de acuerdo con la Guía para el

Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y las regulaciones del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales. Se implantaron (s.c.) fragmentos de tumor gástrico STO#69 patente de unos 15-30 mm³ de tamaño en el flanco derecho de ratones carentes de sistema inmunitario Balb/c.

5 Para el desarrollo de modelos de xenoinjerto de cáncer de pulmón, se utilizaron ratones carentes de sistema inmunitario Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad para la implantación de fragmentos de tumor. La línea celular de cáncer de pulmón humano H1650 (ATCC, Núm. Cat. CRL5883) se cultivó en medio RPMI-1640 que contenía suero al 10% y se implantó (s.c.) en el flanco derecho de ratones carentes de sistema inmunitario Balb/c. Cada ratón recibió 2×10^6 células por inoculación en 100 μ l de matrigel.

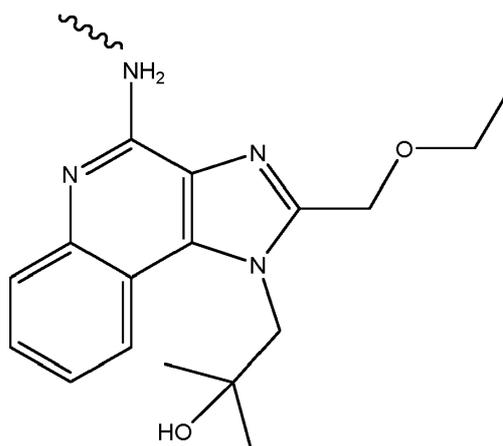
10 Los fármacos se administraron por vía i.v. con 5~20 mg/kg de anticuerpo o 20 mg/kg de Tarceva o fármaco de referencia, QWKx3. Los tumores se midieron una vez por semana con un calibrador para determinar su crecimiento subcutáneo. Los tumores se midieron dos veces por semana en dos dimensiones con calibradores. El volumen del tumor se calculó utilizando la siguiente fórmula: volumen del tumor = (largo \times ancho²) \times 0,5. Los volúmenes tumorales o pesos corporales promedio se trazaron utilizando el programa gráfico Prism 5 (GraphPad). Se estableció un criterio de valoración para el estudio de eficacia entre 30 y 45 días después del primer tratamiento o cuando el tamaño del tumor superaba los 2000 mm³, lo que sucediera primero. Si un ratón pierde más de 20% de su peso corporal o está muy enfermo y no puede obtener suficiente alimento o agua, será retirado del estudio y sacrificado. Los tumores se recolectaron de ratones en el punto final, la mitad congelados en LN₂ y la mitad fijados en formalina para preparar tejidos FFPE.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la estructura de Fórmula (Ib):

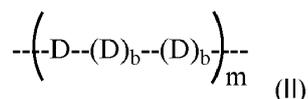


5 en donde TM es un radical de direccionamiento que comprende una inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno tumoral sobre una célula tumoral, en donde el antígeno tumoral es ErbB2 (Her2) o EGFR, L es un conector y AM es un radical de activación que es 4-amino-2-(etoximetil)-a,a-di-metil-1H-imidazo[4,5-c]quinolino-1-etanol (Resiquimod) representado por la estructura:

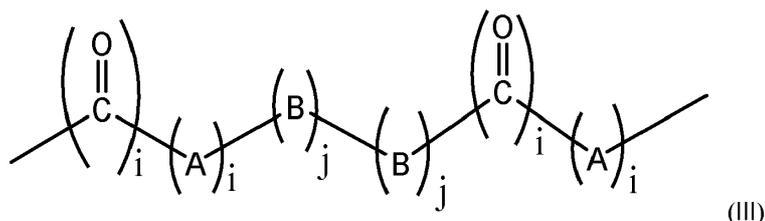


en donde es el punto que se va a conectar al conector L, para su uso en el tratamiento del cáncer.

10 2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde L está representado por la estructura de fórmula (II):



m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, cada b es independientemente 0 o 1, y D está representado independientemente por la estructura de fórmula (III):



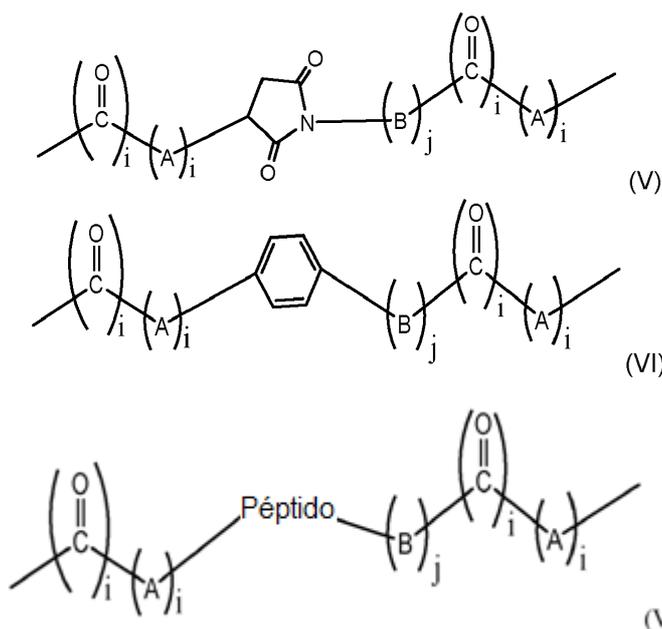
15 en donde cada i es independientemente 0 o 1;

cada j es independientemente 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

20 cada A es independientemente S, O o N-R₄, en donde R₄ es hidrógeno, alquilo, alquenilo o alcoxi; cada B es independientemente alquilo, alquenilo, --O-alquil--, --alquil-O--, --S-alquil--, --alquil-S--, arilo, heteroarilo, heterociclilo o péptido, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, --alquil-arilo, --alquil-heteroarilo, --alquil-heterociclilo, --O-R₄, --O-alquil-R₄, --C(O)-R₄, --C(O)-O-R₄, --S-R₄, --S(O)₂-R₄, --NHR₄, --NH-alquil-R₄, halógeno, --CN, --NO₂, y --SH,

en donde R₄ es alquilo, alquenilo, --alquil-hidroxilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo o haloalquilo.

25 3. El compuesto para uso según la reivindicación 2, en donde D en el radical conector se selecciona entre las estructuras de fórmula (V)-(VII)



en donde A, B, i y j se definen más arriba.

- 5 4. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde la inmunoglobulina se une a una célula tumoral de forma específica o de forma preferible en comparación con una célula no tumoral.
5. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde la inmunoglobulina comprende un anticuerpo.
6. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde la inmunoglobulina comprende Herceptin (trastuzumab), Erbitux (cetuximab), Vectibix (Panitumumab), Perjeta (Pertuzumab) o mezclas de los mismos.
- 10 7. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 para 6, en donde el cáncer se selecciona entre cáncer de estómago, colon, recto, hígado, páncreas, pulmón, mama, cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, testículo, vejiga, renal, cerebro/Sistema Nervioso Central, cabeza y cuello, garganta, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, melanoma, cáncer de piel no melanoma, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, sarcoma de Ewing, cáncer de pulmón de células pequeñas, coriocarcinoma, rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, leucemia de células pilosas, boca/faringe, esófago, laringe o linfoma.
- 15 8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento del cáncer.
9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, que comprende adicionalmente una cantidad eficaz de un agente terapéutico adicional, en donde el agente terapéutico adicional es un agente anticanceroso seleccionado entre un antimetabolito, un inhibidor de topoisomerasa I y II, un agente alquilante, un inhibidor de microtúbulos, un agente antiandrógeno, un modulador de GNRh, y mezclas de los mismos.
- 20 10. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde el cáncer se selecciona entre cáncer de estómago, colon, recto, hígado, páncreas, pulmón, mama, cuello uterino, cuerpo uterino, ovario, testículo, vejiga, renal, cerebro/Sistema Nervioso Central, cabeza y cuello, garganta, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, melanoma, cáncer de piel no melanoma, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, sarcoma de Ewing, cáncer de pulmón de células pequeñas, coriocarcinoma, rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, leucemia de células pilosas, boca/faringe, esófago, laringe o linfoma.
- 25

Figura 1

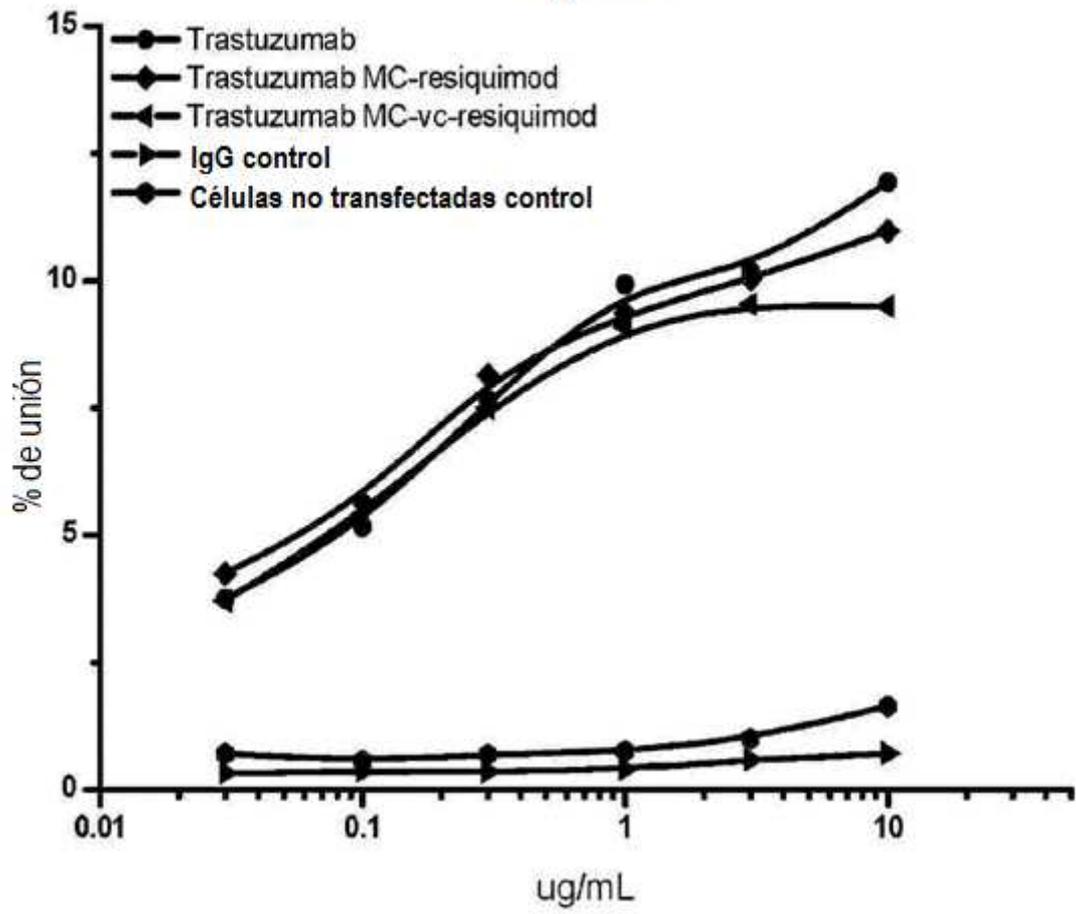


Figura 2

Ensayo ADCC

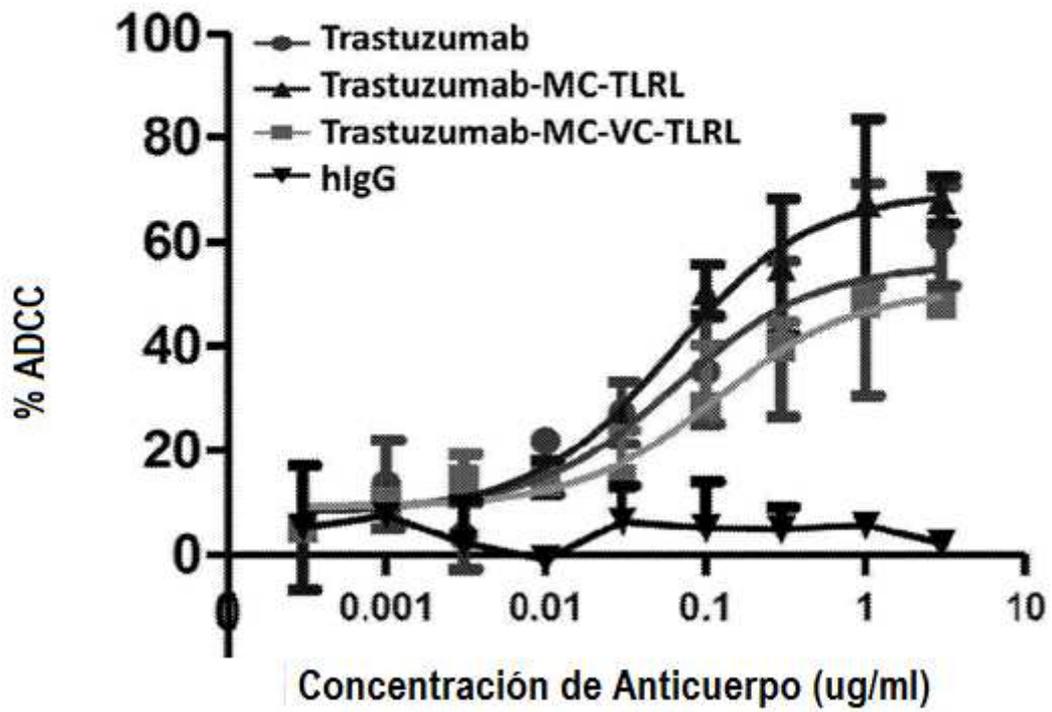


Figura 3A

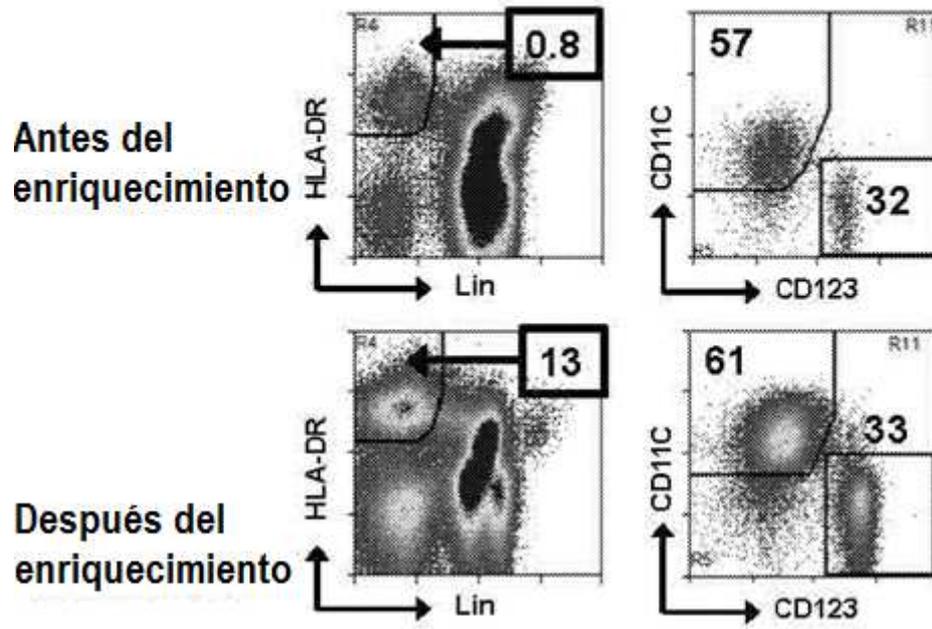


Figura 3B

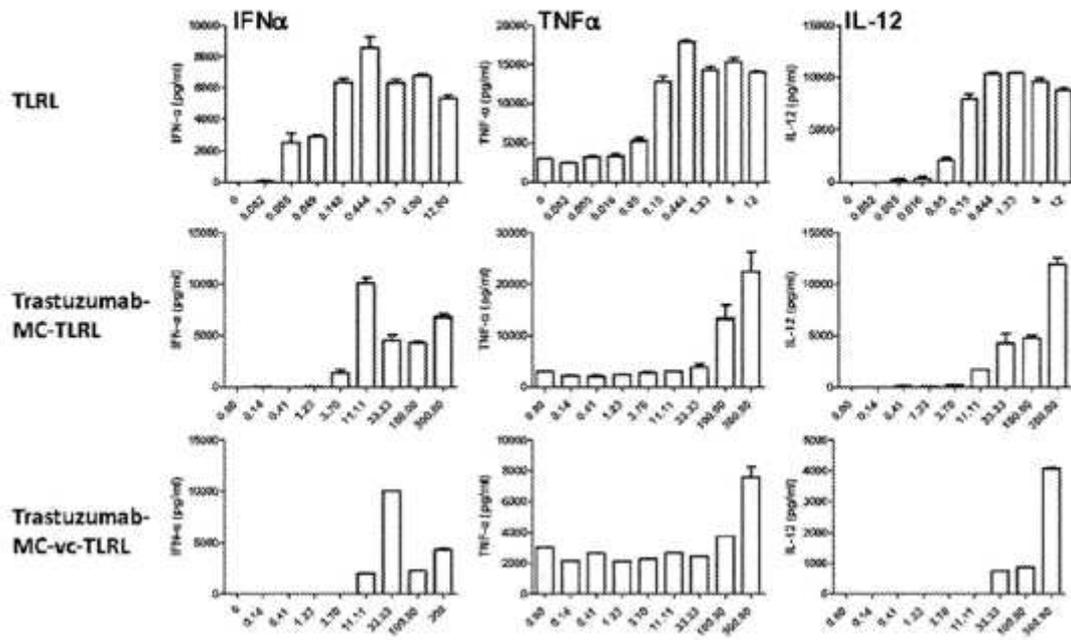


Figura 3C

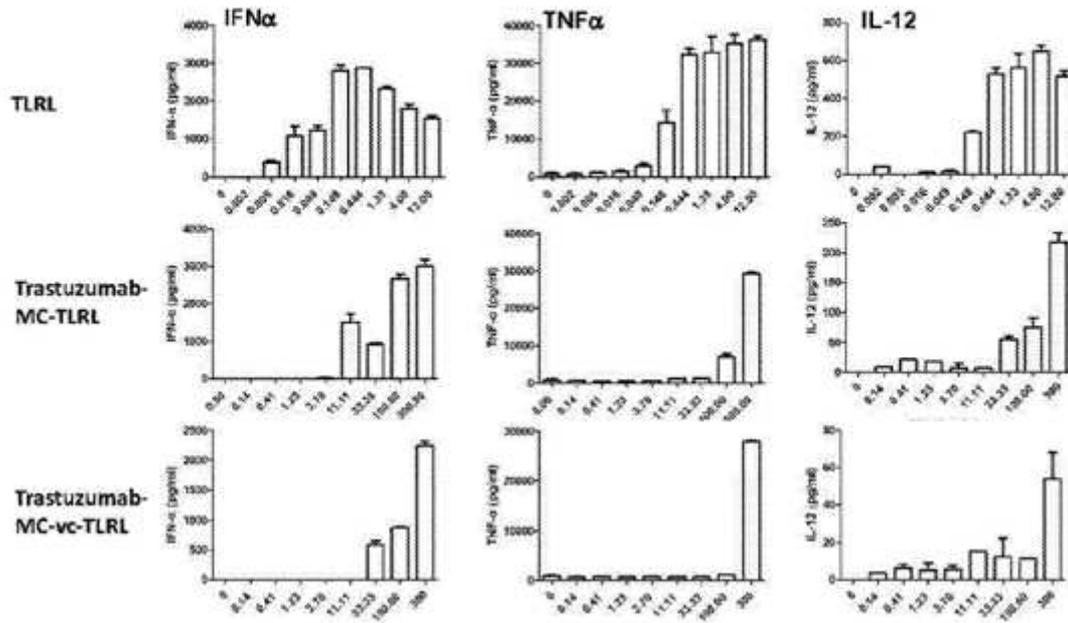


Figura 3D

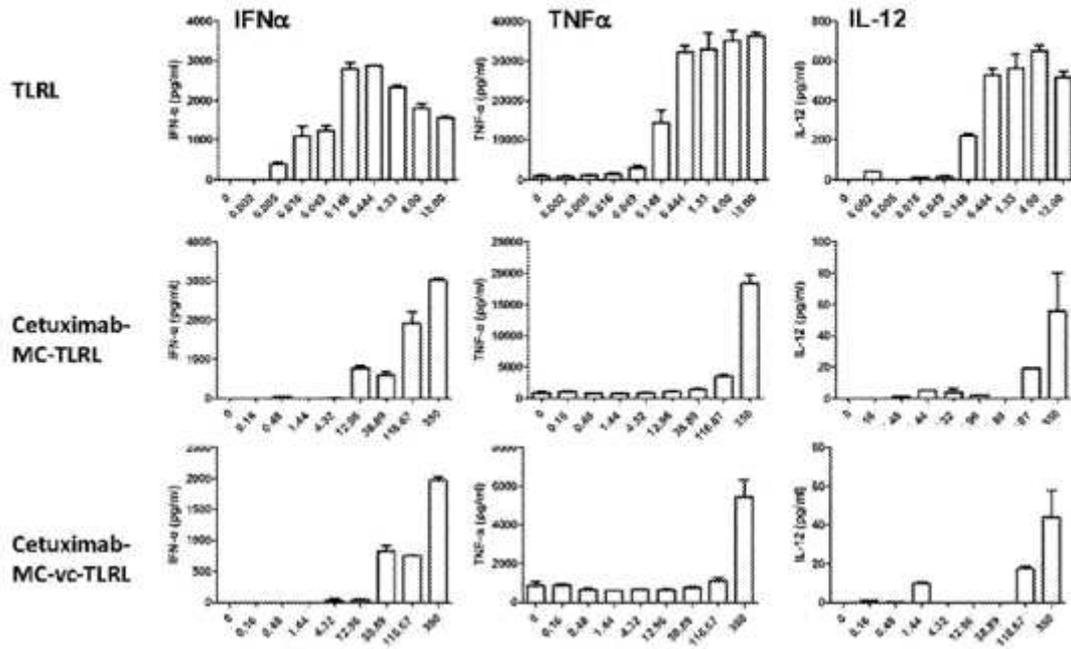


Figura 4A

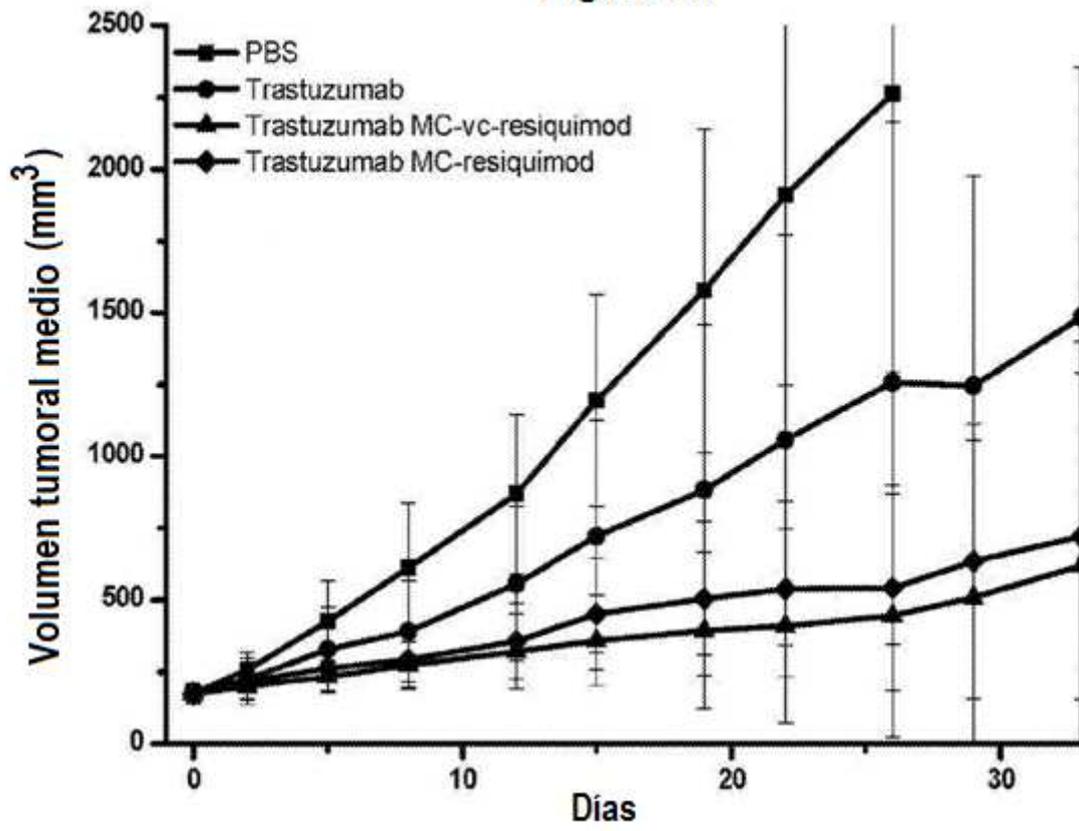


Figura 4B

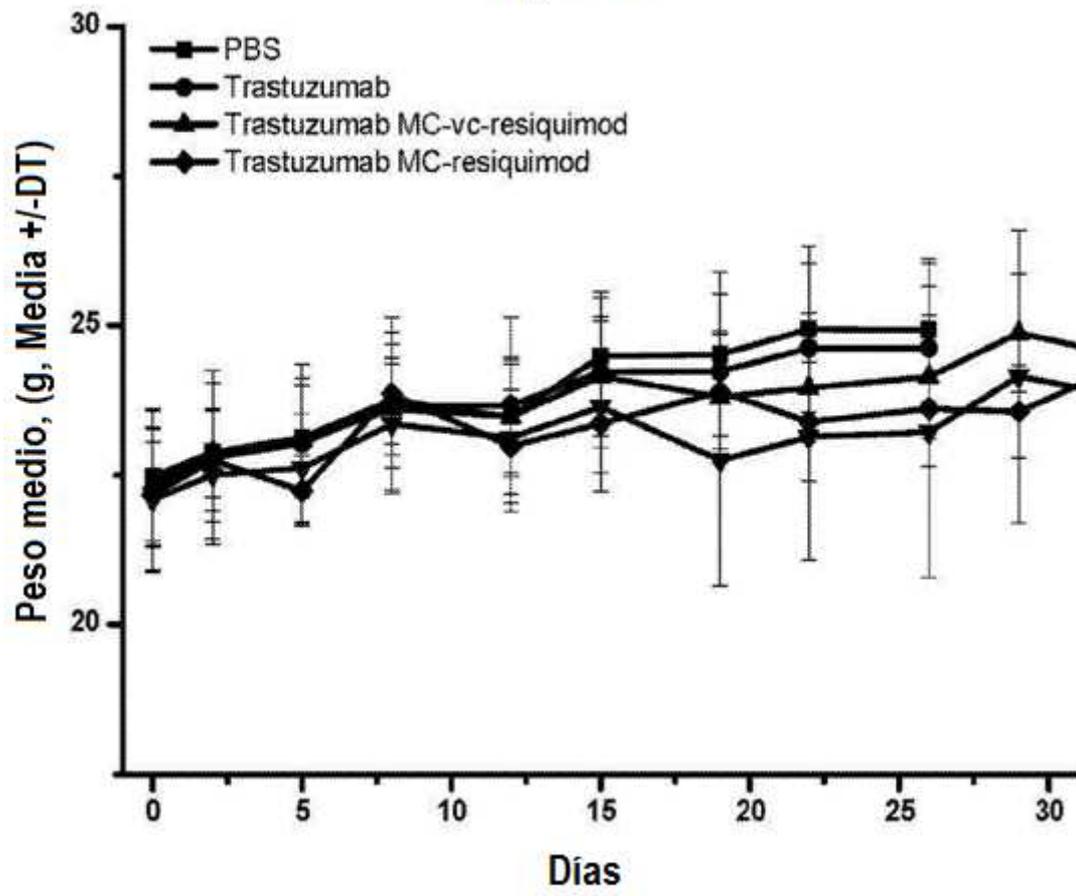


Figura 4C

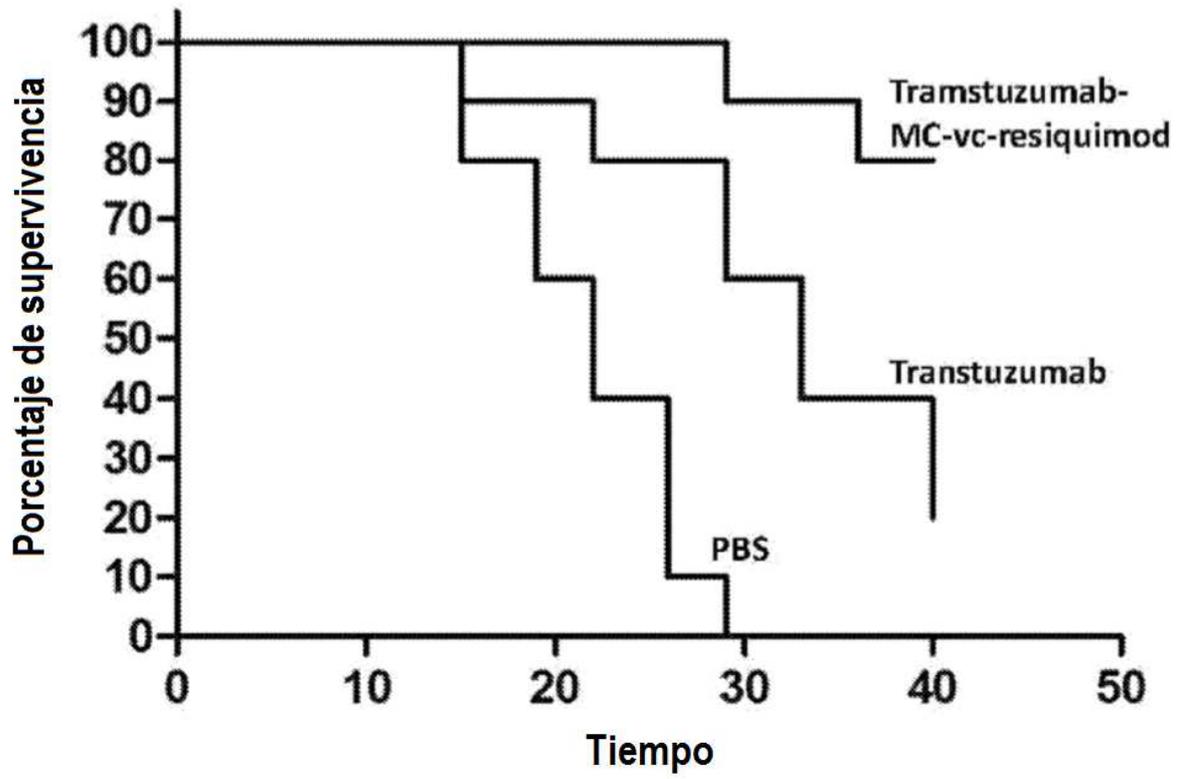


Figura 5A

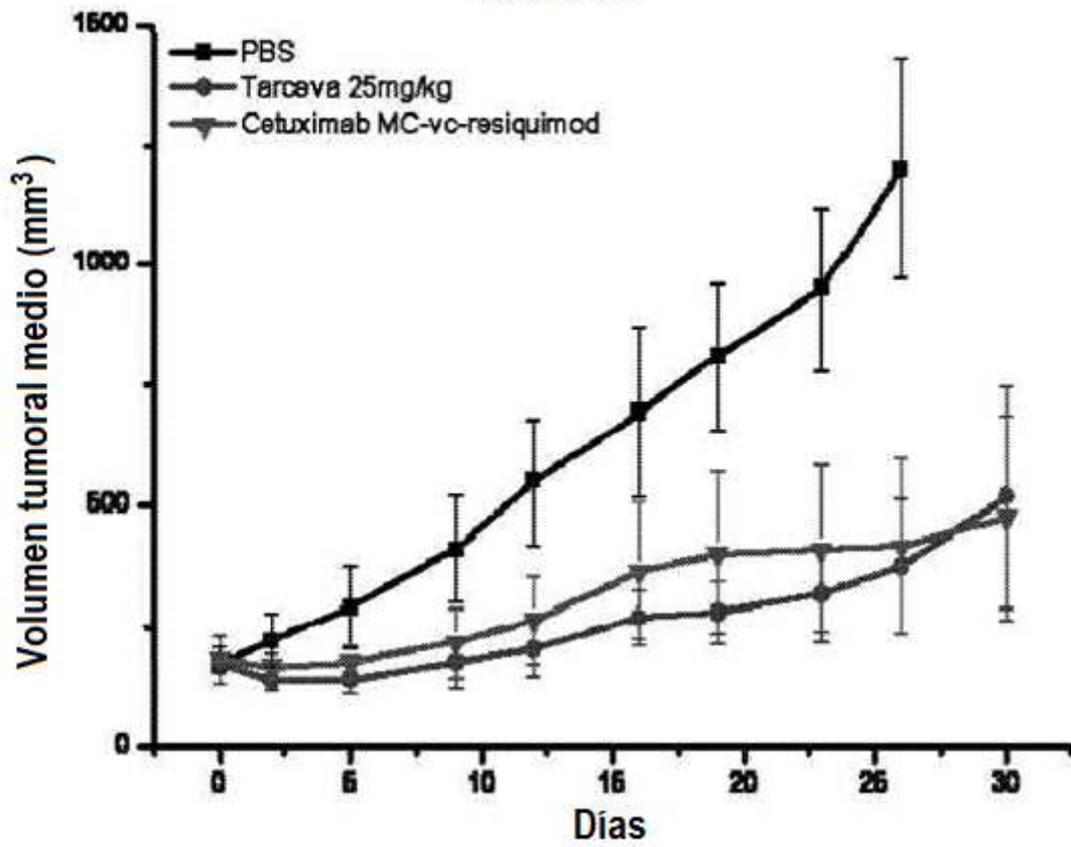


Figura 5B

