

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 523**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
C07D 207/40 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2012 PCT/IB2012/053554**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009774**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2012 E 12880769 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2872157**

54 Título: **Conjugados de moléculas de unión celular con agentes citotóxicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.09.2020

73 Titular/es:

**HANGZHOU DAC BIOTECH CO., LTD (100.0%)
Room B2001-B2019 Building 2. No. 452 Sixth
Street, HEDA
Hangzhou City, Zhejiang Province 310018, CN**

72 Inventor/es:

**ZHAO, R. YONGXIN;
ZHANG, YUE y
MA, YOURANG**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

ES 2 781 523 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).

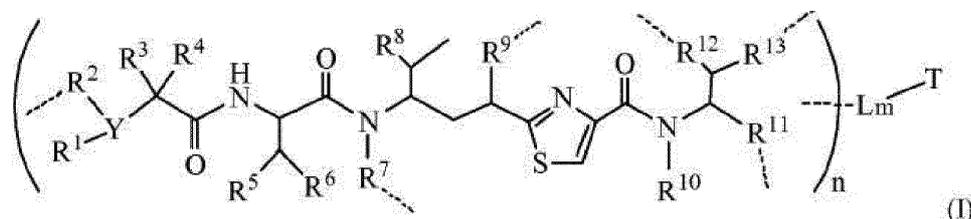
Tubulisina	R ⁱ	R ⁱⁱ	R ⁱⁱⁱ
A	CH ₂ OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	OCOCH ₃	OH
B	CH ₂ OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃	OCOCH ₃	OH
C	CH ₂ OCOCH ₂ CH ₃	OCOCH ₃	OH
D	CH ₂ OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	OCOCH ₃	H
E	CH ₂ OCOCH ₂ CH ₂ CH ₃	OCOCH ₃	H
F	CH ₂ OCOCH ₂ CH ₃	OCOCH ₃	H
G	CH ₂ OCOCH=CH ₂	OCOCH ₃	OH
H	CH ₂ OCOCH ₃	OCOCH ₃	H
I	CH ₂ OCOCH ₃	OCOCH ₃	OH
U	H	OCOCH ₃	H
V	H	OH	H
Z	H	OH	OH
Pretubulisina	CH ₃	H	H

(Las estructuras de los compuestos existentes de tubulisina) Las cepas mixobacterianas de *Archangium gephyra* (F. Sasse et al. J. Antibiot. 2000, 53, 879-885; WO9813375), son miembros del grupo de péptidos antimitóticos que inhiben la polimerización de la tubulina en las células en división, e induciendo así la apoptosis. Con una potencia excepcional superior a la de vinblastina, taxol y epotilonas (Wipf, et al, Org. Lett. 2004, 6, 4057-60; Peltier, et al, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 16018-9; Wipf, et al, Org. Lett., 2007, 9, 1605-1607; Wang, et al, Chem. Biol. Drug Des. 2007, 70, 75-86; Pando, et al, Org. Lett. 2009, 11, 5567-9), estos péptidos antimitóticos son pistas interesantes para terapias dirigidas. Estructuralmente, las tubulisinas tetrapéptidas comprenden ácido N-metilpipercolínico (Mep) en el extremo N, isoleucina (Ile) como segundo residuo, la tubuvalina única que contiene tiazol (Tuv) como tercer residuo y dos posibles γ -aminoácidos. en el extremo C (tubutirosina (Tut) o tubifenilalanina (Tup)). El documento WO 2008/112873 A1 describe conjugados de tubulisinas y ligandos de unión a receptores de vitaminas, con un enlazador liberable. El documento WO 2012/171020 A1, presentado el 11 de junio de 2012 y publicado el 13 de diciembre de 2012, se refiere a un conjugado proteína-polímero-fármaco en donde el fármaco puede ser una tubulisina. El documento WO 2011/017249 se refiere a compuestos estructuralmente relacionados con las tubulisinas, y sus conjugados con un ligando. El documento WO 2011/069116 A1 describe conjugados de tubulisinas y folatos, con un enlazador liberable. Leamon, C.P. et al (Cancer Re 2008; 68: (23). 1 de diciembre de 2008) describe un conjugado folato-tubulisina. A pesar de que recientemente se han sintetizado varias tubulisinas, las toxicidades generales significativas (>15% de pérdida de peso corporal del animal) de las tubulisinas existentes a las dosis requeridas para lograr un efecto terapéutico comprometen su eficacia (Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2010/0048490). Los presentes inventores se han interesado a la técnica de un conjugado de un ligando de unión a la superficie celular, particularmente el uso de un anticuerpo para conjugar con derivados de tubulisina por tener una toxicidad general significativamente menor, pero una eficacia terapéutica útil. Sin embargo, las tubulisinas son poco solubles en una solución reguladora, lo que resulta en una cantidad significativa de agregación de anticuerpos cuando se conjuga con las tubulisinas. Un análogo más simple, como el uso de fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr) para reemplazar los componentes Tup y Tut, respectivamente, para la conjugación de anticuerpos conduce a la hidrólisis de Phe y Tyr en la circulación sanguínea de los animales y genera la unidad estructural Mep-Ile-Tuv mucho menos potente (más de 200 veces menos potencia que la tubulisina A y D). Aquí, esta patente describe conjugados de un ligando de unión a la superficie celular con agua soluble y estable, así como en baja toxicidad sistemática, derivados de tubulisina y el uso de estos conjugados para tratar el cáncer y los trastornos inmunes.

3. Resumen

La presente invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas. En una realización ilustrativa, la divulgación proporciona un conjugado de fórmula

(I):



5

y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos

En donde T es un ligando de direccionamiento o de unión; L es un enlazador liberable; ---- es un enlace que L se conecta a una molécula dentro del corchete de forma independiente; n es 1-20 y m es 1-10. Dentro del corchete (paréntesis) hay un potente agente/fármaco antimotóxico en donde R¹, R², R³ y R⁴ son independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de heterocíclico, carbocíclico, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, C₃~C₈ de arilo, Ar-alquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; o dos R, tales como R¹R², R²R³, R³R⁴, R⁵R⁶ y R¹²R¹³ pueden ser 3~7 miembros de un sistema de anillo carbocíclico, cicloalquilo o heterocíclico, heterocicloalquilo; Y es N o CH; además, R¹, R³ y R⁴ pueden ser H; y R² puede estar ausente.

10

En donde R⁵, R⁶, R⁸ y R¹⁰ son independientemente H, C₁~C₄ de alquilo o heteroalquilo.

15

En donde R⁷ se selecciona independientemente de H, R¹⁴ o -R¹⁴C(=O)X¹R¹⁵ o -R¹⁴X¹R¹⁵, en donde R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan independientemente de C₁~C₈ de alquilo o heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino; heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo; C₃~C₈ de arilo, heterocicloalquilo, heteroalquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; X¹ se selecciona de O, S, S-S, NH o NR¹⁴.

20

En donde R⁹ es independientemente H, -O-, -OR¹⁴-, -OC(=O)R¹⁴-, -OC(=O)NHR¹⁴-, -OC(=O)R¹⁴SSR¹⁵-, OP(=O)(OR¹⁴)-, o OR¹⁴OP(=O)(OR¹⁵), en donde R¹⁴, R¹⁵ son independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo.

25

En donde R¹¹ es independientemente H, R¹⁴, -R¹⁴C(=O)R¹⁶-, -R¹⁴X²R¹⁶-, -R¹⁴C(=O)X², en donde X² es -O-, -S-, -NH-, -N(R¹⁴)-, -O-R¹⁴-, -S-R¹⁴-, -S(=O)-R¹⁴-, o -NHR¹⁴-; R¹⁴ es C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo; R¹⁶ es H, OH, R¹⁴ o de una a cuatro unidades de aminoácidos;

30

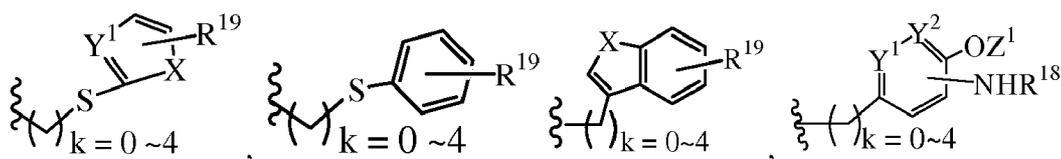
Donde R¹² es independientemente R¹⁴, -O-, -S-, -N-, =N-, =NNH-, -NH(R¹⁴)-, -OR¹⁴-, -C(O)O-, -C(O)OR¹⁶-, C(O)NH-, C(O)NHR¹⁴-, -SR¹⁴-, -S(=O)R¹⁴-, -P(=O)(OR¹⁶)-, -OP(=O)(OR¹⁶)-, -CH₂OP(=O)(OR¹⁶)-, -SO₂R¹⁶-. R¹⁴ es independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo. R¹⁶ es H, OH, R¹⁴ o de una a cuatro unidades de aminoácidos;

35

En donde R¹³ es C₁~C₁₀ de alquilo, heteroalquilo, alquilácido, alquilamida, alquilamina o Ar; Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de cuatro a diez carbonos, preferiblemente de cuatro a seis átomos de carbono. El término de grupo heteroaromático se refiere a uno o varios carbonos en un grupo aromático, preferentemente uno, dos o tres átomos de carbono se reemplazan por O, N, Si, Se, P o S, preferentemente O, S, N. El término arilo o Ar también se refiere a un grupo aromático, en donde uno o varios átomos de H se reemplazan independientemente por R¹⁷, F, Cl, Br, I, OR¹⁶, SR¹⁶, NR¹⁶R¹⁷, N=NR¹⁶, N=R¹⁶, NR¹⁶R¹⁷, NO₂, SO₂R¹⁶, SO₃R¹⁶, OSO₃R¹⁶, PR¹⁶R¹⁷, POR¹⁶R¹⁷, PO₂R¹⁶R¹⁷, OP(O)(OR¹⁷)₂, OCH₂OP(O)(OR¹⁷)₂, PO(OR¹⁶)(OR¹⁷), OC(O)OP(O)(OR¹⁷)₂, OP(O)(OR¹⁷)OP(O)(OR¹⁷)₂, OC(O)R¹⁷ u OC(O)NHR¹⁷, en donde R¹⁶, R¹⁷ son independientemente H, C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo o glucósidos C₄~C₁₂, o sales farmacéuticas.

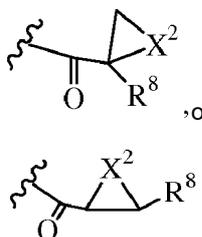
40

Además, R¹² puede ser H cuando R¹⁰ no es H, o cuando R¹³ es:



5 en donde Z¹ es H, CH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, PO(OR¹⁸)₂, C(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, C(O)R₁₈, C(O)NHR¹⁸, SO₂(OR¹⁸), glucósidos C₄~C₁₂ o C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, heterocíclico; R¹⁸ es H, C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alquenilo, alquinilo, heterocíclico; C₃~C₈ de arilo, alquilcarbonilo; R¹⁹ es H, OH, NH₂, OSO₂(OR¹⁸), XCH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, XPO(OR¹⁸)₂, XC(O)R¹⁸, XC(O)NHR¹⁸ C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, derivado de ácido carboxílico; C₂~C₈ de alquenilo, alquinilo, heterocíclico; C₃~C₈ de arilo, alquilcarbonilo; o sales farmacéuticas; X es O, S, NH; Y¹ e Y² son N o CH respectivamente.

O R¹² puede ser H cuando R¹¹ es:



10

X² es O, S, N-R⁸; R⁸ es H, C₁~C₆ de alquilo o heteroalquilo.

15 En otra realización, el conector L de los potentes conjugados de molécula de unión a agente antimitótico tiene la fórmula: --Ww-(Aa)r--Vv--; en donde: --W-- es una unidad de estiramiento; w es 0 o 1; cada --Aa-- es independientemente una unidad de aminoácidos; r es independientemente un número entero que varía de 0 a 12; --V-- es una unidad espaciadora; y v es 0, 1 o 2. La unidad de estiramiento W puede contener independientemente un separador autoinmolativo, unidades de peptidilo, un enlace de hidrazona, enlaces disulfuro o tioéter.

20 En otra realización, la molécula T de unión a la superficie celular puede ser de cualquier tipo actualmente conocida, o que se convierta en ligandos de unión celular conocidos, tales como péptidos y no péptidos. Generalmente la molécula de unión T es un anticuerpo; un anticuerpo de cadena sencilla; un fragmento de anticuerpo que se une a la célula objetivo; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla; o un fragmento de anticuerpo monoclonal que se une a la célula objetivo; un anticuerpo quimérico; un fragmento de anticuerpo quimérico que se une a la célula objetivo; un anticuerpo de dominio; un fragmento de anticuerpo de dominio que se une a la célula objetivo; adnectinas que imitan anticuerpos; DARPs; una linfoquina; una hormona una vitamina un factor de crecimiento; un factor estimulante de colonias; o una molécula de transporte de nutrientes (una transferrina); un péptido o proteína de unión, o anticuerpo, o molécula pequeña unida a albúmina, polímeros, dendrímeros, liposomas, nanopartículas, vesículas, cápsidas (virales). Preferiblemente, la molécula de unión T es un anticuerpo monoclonal.

25 En otro aspecto más, un compuesto de fórmula I-VII o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo se usa para tratar cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en un humano o un animal.

4. Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1 muestra la síntesis de enlazadores ramificados para la conjugación de fármacos con agentes de unión celular.

La Figura 2 muestra la síntesis de enlazadores maleimida y su uso para la conjugación de moléculas de unión a fármacos.

35 La Figura 3 muestra la síntesis de enlazadores de bromomaleimida y dibromomaleimida y sus usos para la conjugación de moléculas de unión a fármacos.

La Figura 4 muestra la síntesis de enlazadores de aminoácidos (Val-Cit) para los agentes antimitóticos de conjugación con un ligando de unión a la superficie celular.

La Figura 5 muestra la síntesis del componente Tuv de los agentes antimitóticos.

La Figura 6 muestra la síntesis de los componentes Tuv de los agentes antimitóticos.

40 La Figura 7 muestra la síntesis de unidades estructurales Boc-Tuv y un agente antimitótico conjugable.

La Figura 8 muestra la síntesis de las unidades estructurales Tuv, Ile-Tuv y Mep-Ile-Tuv de los agentes antimitóticos.

- La Figura 9 muestra la síntesis de unidades estructurales Ile-Tuv, Mep-Leu-Tuv, Val-Ile-Tuv y Val-Ile-Tuv (O-alquil) de los agentes antimetabólicos.
- La figura 10 muestra la síntesis de un agente antimetabólico conjugable y su conjugación con un anticuerpo.
- 5 La Figura 11 muestra la síntesis de enlazadores de aminoácidos (Phe-(D)Lys) para la conjugación de los agentes antimetabólicos.
- La Figura 12 muestra la síntesis de conjugados anticuerpo-agente antimetabólico.
- La Figura 13 muestra la síntesis de conjugados anticuerpo-agente antimetabólico.
- La Figura 14 muestra la síntesis de los conjugados molécula de unión-agente antimetabólico.
- La Figura 15 muestra la síntesis de un conjugado de molécula de unión-agente antimetabólico.
- 10 La Figura 16 muestra la síntesis de un conjugado anticuerpo-agente antimetabólico.
- La Figura 17 muestra la síntesis de un conjugado de anticuerpo-agente antimetabólico.
- La Figura 18 muestra la síntesis de análogos hidrófilos de Tut para la síntesis de los agentes antimetabólicos hidrófilos (profármacos de fosfato)
- La Figura 19 muestra la síntesis de los conjugados de los agentes antimetabólicos con un anticuerpo.
- 15 La Figura 20 muestra la síntesis en fase sólida de Boc de los agentes antimetabólicos conjugables.
- La Figura 21 muestra la síntesis en fase sólida de Fmoc de los agentes antimetabólicos conjugables.
- La Figura 22 muestra la síntesis de los fármacos antimetabólicos hidrófilos y sus conjugados con un anticuerpo.
- La Figura 23 muestra la síntesis de derivados de Tuv y la síntesis en fase sólida de componentes de Mep-Ile-Tuv y NMe₂-Val-Ile-Tuv.
- 20 La Figura 24 muestra la síntesis de los agentes antimetabólicos y su conjugación con un anticuerpo.
- La Figura 25 muestra la síntesis en fase sólida de agentes antimetabólicos y sus conjugados con un anticuerpo.
- La Figura 26 muestra la síntesis en fase sólida de fármacos antimetabólicos y sus conjugados con un anticuerpo.
- La Figura 27 muestra la síntesis de trans-2-arilciclopropilaminas, ácidos trans-2-arilciclopropil-carboxílicos y ácidos trans-2-ariletilepoxidilcarboxílicos.
- 25 La Figura 28 muestra la síntesis de aminoácidos alquenos y aminoácidos alquil epoxidílicos.
- La Figura 29 muestra la síntesis de análogos hidrófilos de Tut para la síntesis de profármacos hidrófilos de agentes antimetabólicos.
- La Figura 30 muestra la síntesis de los profármacos hidrófilos de agentes antimetabólicos para la conjugación con un agente de unión celular.
- 30 La Figura 31 muestra la síntesis de los profármacos hidrófilos de agentes antimetabólicos para la conjugación con un anticuerpo.
- La Figura 32 muestra la síntesis de los profármacos hidrófilos de agentes antimetabólicos para la conjugación con un anticuerpo.
- 35 La Figura 33 muestra los efectos citotóxicos in vitro de conjugados de anticuerpo antiCD22-agente antimetabólico (TZ01~TZ09) con relación fármaco/anticuerpo (D/A) 3.0~4.3 en Ramos (línea celular de linfoma de Burkitt). Las células se incubaron con los conjugados durante 5 días y los valores de IC₅₀ se indican en la figura.
- La Figura 34 muestra los efectos citotóxicos de los conjugados de agente antimetabólico trastuzumab (TZ03, TZ04 y TZ07) con relación fármaco/anticuerpo (DAR) 3.5~4.0 en KPL-4 (línea celular de cáncer de mama). También muestra que el conjugado Trastuzumab-TZ03 induce un efecto antiproliferativo específicamente potente, con IC₅₀ = 90 pM en ausencia de Trastuzumab no conjugado e IC₅₀ >20 nM en presencia de una concentración de 1 micromol de Trastuzumab (para saturar la unión al antígeno) respectivamente. La ventana de especificidad es >222 (IC₅₀ = 20 nM/IC₅₀ = 0.09 nM)
- 40 La Figura 35 muestra los efectos citotóxicos de los conjugados del agente antimetabólico anticuerpo antiCD22 (TZ03, TZ04 y TZ07) con la relación fármaco/anticuerpo (D/A) 3.8~4.2 y del anticuerpo CD22 no conjugado así como del anticuerpo CD20 (Rituximab) en BJAB (Línea celular de linfoma de Burkitt). Muestra que el conjugado induce un efecto antiproliferativo mucho más potente, con IC₅₀ = 5~19 pM que los anticuerpos no conjugados con IC₅₀ >20 nM. Las
- 45

ventanas de especificidad cuando se usa una concentración de 1 micromol de anticuerpo CD22 no conjugado para saturar la unión al antígeno son >660 ($IC_{50} = 3.3 \text{ nM}/IC_{50} = 0.005 \text{ nM}$) para el conjugado huCD22-TZ03 y >790 ($IC_{50} = 15 \text{ nM}/IC_{50} = 0.019 \text{ nM}$) para el conjugado huCD-TZ07.

5 La Tabla 1 muestra la estructura de los fármacos antimitóticos elaborados mediante síntesis en fase sólida y su ion molecular de los espectros de masas y la citotoxicidad in vitro de estos fármacos contra la célula de Ramos (ATCC, una célula de linfoma de Burkitt humano).

La Tabla 2 muestra las estructuras de algunos conjugados experimentales de anticuerpo-agente antimitótico.

5. Descripción detallada

5.1 Definiciones

10

"Alquilo" significa un grupo hidrocarbonado alifático que puede ser lineal o ramificado que tiene de 1 a 8 átomos de carbono en la cadena o cíclico. "Ramificado" significa que uno o más grupos alquilo inferior tales como metilo, etilo o propilo están unidos a una cadena de alquilo lineal. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, 3-pentilo, octilo, nonilo, decilo, ciclopentilo, ciclohexilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 2,3,4-trimetilpentilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilhexilo, 2,4-dimetilhexilo, 2,5-dimetilhexilo, 3,5-dimetilhexilo, 2,4-dimetilpentilo, 2-metilheptilo, 3-metilheptilo, n-heptilo, isoheptilo, n-octilo e isoctilo. Un grupo alquilo C_1-C_8 puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo C_1-C_8 , -O-(alquilo C_1-C_8), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno (F, Cl, Br o I), -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de -C₁~C₈ alquilo y arilo.

15

20

Un "carbociclo $C_3\sim C_8$ " significa un anillo carbocíclico no aromático saturado o insaturado de 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-miembros. Los carbociclos $C_3\sim C_8$ representativos incluyen, pero no se limitan a, -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -ciclopentadienilo, -ciclohexilo, -ciclohexenilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -cicloheptilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo, -ciclooctilo y -ciclooctadienilo. Un grupo carbociclo $C_3\sim C_8$ puede estar no sustituido o sustituido con uno o más grupos que incluyen, pero no se limitan a, -alquilo $C_1\sim C_8$, -O-(alquilo $C_1\sim C_8$), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -halógeno, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN; donde cada R' se selecciona independientemente de -C₁~C₈ alquilo y arilo.

25

Un "carbociclo $C_3\sim C_8$ " se refiere a un grupo carbociclo $C_3\sim C_8$ definido anteriormente en donde uno de los átomos de hidrógeno en el carbociclo se reemplaza con un enlace.

30

"Alquenilo" significa un grupo hidrocarbonado alifático que contiene un doble enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado con 2 a 8 átomos de carbono en la cadena. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen etenilo, propenilo, n-butenilo, i-butenilo, 3-metilbut-2-enilo, n-pentenilo, hexilenilo, heptenilo, octenilo.

35

"Alquinilo" significa un grupo hidrocarbonado alifático que contiene un triple enlace carbono-carbono y que puede ser lineal o ramificado con 2 a 8 átomos de carbono en la cadena. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen etinilo, propinilo, n-butinilo, 2-butinilo, 3-metilbutinilo, pentinilo, n-pentinilo, hexilinilo, heptinilo y octinilo.

40

"Heteroalquilo" es alquilo $C_2\sim C_8$ en donde uno a cuatro átomos de carbono se reemplazan independientemente con un heteroátomo del grupo que consiste en O, S y N. "Ariilo" o Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto por uno o varios anillos, que comprende de tres a catorce átomos de carbono, preferentemente de seis a diez átomos de carbono. El término de grupo heteroaromático se refiere a uno o varios carbonos en un grupo aromático, preferentemente uno, dos, tres o cuatro átomos de carbono se sustituyen por O, N, Si, Se, P o S, preferentemente por O, S y N. El término arilo o Ar también se refiere a un grupo aromático, en donde uno o varios átomos de H se reemplazan independientemente por R¹³, F, Cl, Br, I, OR¹³ o SR¹³, NR¹³R¹⁴, N=NR¹³, N=R¹³, NR¹³R¹⁴, NO₂, SOR¹³R¹⁴, SO₂R¹³, SO₃R¹³, OSO₃R¹³, PR¹³R¹⁴, POR¹³R¹⁴, PO₂R¹³R¹⁴, OPO₃R¹³R¹⁴ o PO₃R¹³R¹⁴ en donde R¹³, R¹⁴ son independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, arilo, arilalquilo, carbonilo o sales farmacéuticas.

45

"Átomo de halógeno" se refiere a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo; preferiblemente átomo de flúor y cloro.

50

"Heterociclo" se refiere a un heterociclo $C_2\sim C_8$ aromático o no aromático en donde uno a cuatro de los átomos de carbono del anillo se reemplazan independientemente con un heteroátomo del grupo de O, N, S Se y P. Los heteroátomos preferibles son oxígeno, nitrógeno y azufre. Los heterociclos adecuados también se describen en The Handbook of Chemistry and Physics, 78ª edición, CRC Press, Inc., 1997-1998, p. 2-25 a 2-26. Los heterocíclicos no aromáticos preferidos incluyen, pero no se limitan a, epoxi, aziridinilo, tiranilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, oxiranilo, tetrahidrofurano, dioxolano, tetrahidropirano, dioxano, dioxolano, piperidilo, piperazinilo, morfolinilo, piranilo, imidazolinilo, pirrolinilo, pirazolinilo, tiazolidinilo, tetrahidrotiopirano, ditianilo, tiomorfolinilo, dihidropirano, tetrahidropirano, dihidropirano, tetrahidropiridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridinilo, dihidrotiopirano, azepanilo, así como los sistemas fusionados resultantes de la condensación con un grupo fenilo.

55

El término "heteroarilo" o heterociclos aromáticos se refiere a un anillo hetero, mono, bi- o multicíclico aromático de 5 a 14, preferiblemente de 5 a 10 miembros. Los ejemplos incluyen pirrolilo, piridilo, pirazolilo, tienilo, pirimidinilo, pirazinilo, tetrazolilo, indolilo, quinolinilo, purinilo, imidazolilo, tienilo, tiazolilo, benzotiazolilo, furanilo, benzofuranilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isotiazolilo, triazoilo, tetrazolilo, isoquinolilo, benzotienilo, isobenzofurilo, pirazolilo, carbazolilo, bencimidazolilo, isoxazolilo, piridil-N-óxido, así como los sistemas fusionados resultantes de la condensación con un grupo fenilo.

"Alquilo", "cicloalquilo", "alqueno", "alquino", "arilo", "heteroarilo", "heterociclo" y similares se refieren también al correspondiente "alquileo", "cicloalquileo", "alqueno", "alquino", "arileno", "heteroarileno", "heterocicleno" y similares que se forman mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un animal o un ser humano, según corresponda.

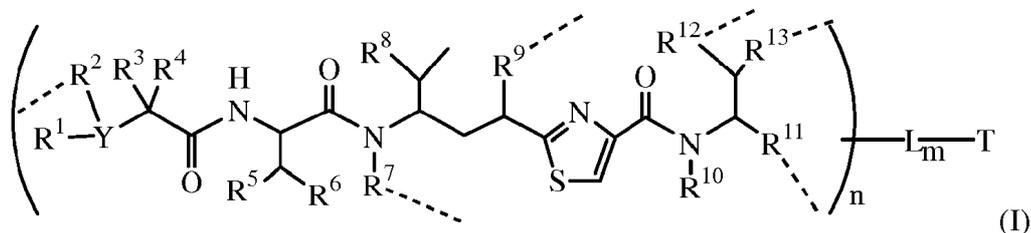
"Excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualesquiera portadores, diluyentes, adyuvantes o vehículos, como agentes conservantes o antioxidantes, rellenos, agentes desintegrantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, isotónicos y agentes de retardo de absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Los ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar a las composiciones como combinaciones terapéuticas adecuadas.

Como se usa en el presente documento, "sales farmacéuticas" se refieren a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica haciendo sales de ácido o base del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, bencenosulfónico, glucurónico, glutámico, benzoico, salicílico, toluenosulfónico, oxálico, fumárico, maleico, láctico y similares. Otras sales de adición incluyen sales de amonio tales como trometamina, meglumina, epolamina, etc., sales metálicas como sodio, potasio, calcio, zinc o magnesio.

Las sales farmacéuticas de la presente divulgación se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene una unidad estructural ácida o básica mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar por reacción de las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418.

5.2 Conjugados de ligando de unión a fármaco-ligante

Como se indicó anteriormente, esta divulgación proporciona una molécula de unión a la superficie celular-agente antimetabólico conjugado de fórmula (I):



y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos

En donde T es un ligando de direccionamiento o de unión; L es un enlazador liberable; ---- es un enlace que L se conecta a una molécula dentro del soporte de forma independiente; n es 1~20 y m es 1~10.

Dentro del corchete redondo hay un potente agente/fármaco antimetabólico en donde R¹, R², R³ y R⁴ son independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de heterocíclico, carbocíclico, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, C₃~C₈ de arilo, Ar-alquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; o dos R, tales como R¹R², R²R³, R³R⁴, R⁵R⁶ y R¹²R¹³ pueden ser 3~7 miembros de un sistema de anillo carbocíclico, cicloalquilo o heterocíclico, heterocicloalquilo; Y es N o CH; Además, R¹, R³ y R⁴ pueden ser H; y R² puede estar ausente.

En donde R⁵, R⁶, R⁸ y R¹⁰ son independientemente H, C₁~C₄ de alquilo o heteroalquilo.

En donde R⁷ se selecciona independientemente de H, R¹⁴ o -R¹⁴C(=O)X¹R¹⁵ o -R¹⁴X¹R¹⁵, en donde R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan independientemente de C₁~C₈ de alquilo o heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino; heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo; C₃~C₈ de arilo, heterocicloalquilo, heteroalquilo, heteroalquilocicloalquilo, alquilcarbonilo; X¹ se selecciona de O, S, S-S, NH o NR¹⁴

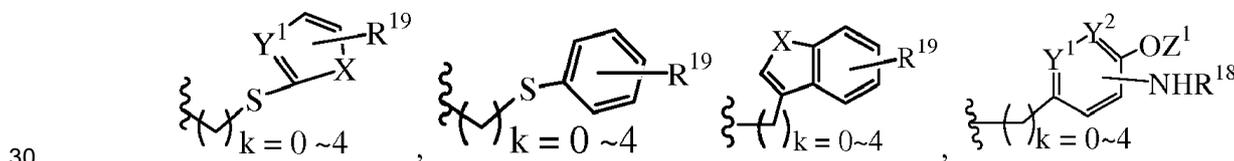
5 Donde R⁹ es independientemente H, -O-, -OR¹⁴-, -OC(=O)R¹⁴-, -OC(=O)NHR¹⁴-, -OC(=O)R¹⁴SSR¹⁵-, OP(=O)(OR¹⁴)-, o OR¹⁴OP(=O)(OR¹⁵), en donde R¹⁴, R¹⁵ son independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilocicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilocicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo.

10 En donde R¹¹ es independientemente H, R¹⁴, -R¹⁴C(=O)R¹⁶-, -R¹⁴X²R¹⁶-, -R¹⁴C(=O)X², en donde X² es -O-, -S-, -NH-, -N(R¹⁴)-, -O-R¹⁴-, -S-R¹⁴-, -S(=O)-R¹⁴-, o -NHR¹⁴-; R¹⁴ es C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilocicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilocicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo; R¹⁶ es H, OH, R¹⁴ o de una a cuatro unidades de aminoácidos;

15 En donde R¹² es independientemente R¹⁴, -O-, -S-, -N-, =N-, =NNH-, -NH(R¹⁴)-, -OR¹⁴-, -C(O)O-, -C(O)OR¹⁶-, C(O)NH-, C(O)NHR¹⁴-, -SR¹⁴-, -S(=O)R¹⁴-, -P(=O)(OR¹⁶)-, -OP(=O)(OR¹⁶)-, -CH₂OP(=O)(OR¹⁶)-, -C(O)OP(=O)(OR¹⁶)-, -SO₂R¹⁶-. R¹⁴ es independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilocicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilo, heteroalquilocicloalquilo, alquilcarbonilo. R¹⁶ es H, OH, R¹⁴ o de una a cuatro unidades de aminoácidos;

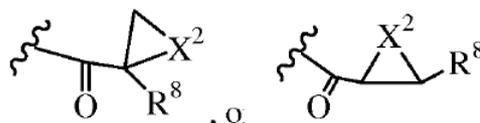
20 En donde R¹³ es C₁~C₁₀ de alquilo, heteroalquilo, alquilácido, alquilamida, alquilamina o Ar; Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de cuatro a diez carbonos, preferiblemente de cuatro a seis átomos de carbono. El término de grupo heteroaromático se refiere a uno o varios carbonos en un grupo aromático, preferentemente uno, dos o tres átomos de carbono se reemplazan por O, N, Si, Se, P o S, preferentemente O, S, N. El término arilo o Ar también se refiere a un grupo aromático, en donde uno o varios átomos de H se reemplazan independientemente por R¹⁷, F, Cl, Br, I, OR¹⁶, SR¹⁶, NR¹⁶R¹⁷, N=NR¹⁶, N=R¹⁶, NR¹⁶R¹⁷, NO₂, SOR¹⁶R¹⁷, SO₂R¹⁶, SO₃R¹⁶, OSO₃R¹⁶, PR¹⁶R¹⁷, POR¹⁶R¹⁷, PO₂R¹⁶R¹⁷, OP(O)(OR¹⁷)₂, OCH₂OP(O)(OR¹⁷)₂, OC(O)OP(O)(OR¹⁷)₂, PO(OR¹⁶)(OR¹⁷), OP(O)(OR¹⁶)OP(O)(OR¹⁷)₂, OC(O)R¹⁷ u OC(O)NHR¹⁷, en donde R¹⁶, R¹⁷ son independientemente H, C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilocicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilocicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo o glucósidos C₄~C₁₂, o sales farmacéuticas.

Además, R¹² puede ser H cuando R¹⁰ no es H, o cuando R¹³ es:



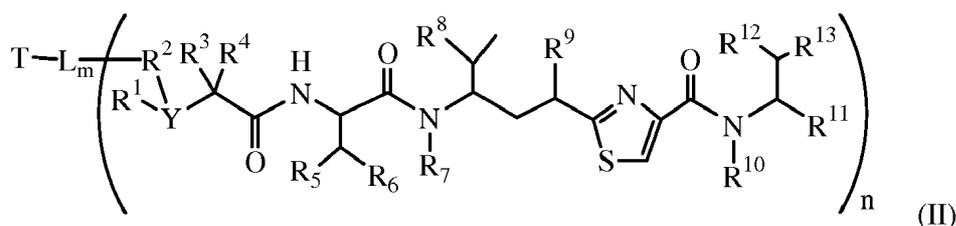
35 en donde Z¹ es H, CH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, C(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, PO(OR¹⁸)₂, C(O)R¹⁸, C(O)NHR¹⁸, SO₂(OR¹⁸), glucósidos C₄~C₁₂ o C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, heterocíclico; R¹⁸ es H, C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico; C₃~C₈ de arilo, alquilcarbonilo; R¹⁹ es H, OH, NH₂, OSO₂(OR¹⁸), XCH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, XPO(OR¹⁸)₂, XC(O)R¹⁸, XC(O)NHR¹⁸, C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, ácido carboxílico derivado; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico; C₃~C₈ de arilo, alquilcarbonilo; o sales farmacéuticas; X es O, S, NH; Y¹ e Y² son N o CH respectivamente.

O R¹² puede ser H cuando R¹¹ es:



X² es O, S, N-R⁸; R⁸ es H, C₁~C₆ de alquilo o heteroalquilo

40 En una realización, los conjugados de agentes antimetabólicos tienen la fórmula (II)



y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos

En donde T es un ligando de direccionamiento o de unión; L es un enlazador liberable; ---- es un enlace que L se conecta a una molécula dentro del soporte de forma independiente; n es 1~20 y m es 1~10.

5 Dentro del corchete redondo hay un potente agente/fármaco antimitótico en donde R¹, R², R³ y R⁴ son independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de heterocíclico, carbocíclico, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, C₃~C₈ de arilo, Ar-alquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; o dos R, tales como R¹R², R²R³, R³R⁴, R⁵R⁶ y R¹²R¹³ pueden ser 3~7 miembros de un sistema de anillo carbocíclico, cicloalquilo o heterocíclico, heterocicloalquilo; Y es N o CH; Además, R¹, R³ y R⁴ pueden ser H; y R² puede estar ausente.

10 En donde R⁵, R⁶, R⁸ y R¹⁰ son independientemente H, C₁~C₄ de alquilo o heteroalquilo.

En donde R⁷ se selecciona independientemente de H, R¹⁴, o -R¹⁴C(=O)X¹R¹⁵ o -R¹⁴X¹R¹⁵, en donde R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan independientemente de C₁~C₈ de alquilo o heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquinilo; heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo; C₃~C₈ de arilo, heterocicloalquilo, heteroalquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; X¹ se selecciona de O, S, S-S, NH o NR¹⁴.

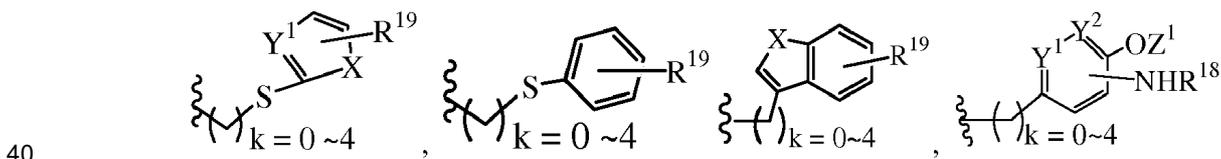
15 Donde R⁹ es independientemente H, -O-, -OR¹⁴, -OC(=O)R¹⁴, -OC(=O)NHR¹⁴, -OC(=O)R¹⁴SSR¹⁵, OP(=O)(OR¹⁴), o OR¹⁴OP(=O)(OR¹⁵), en donde R¹⁴, R¹⁵ son independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquinilo, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo.

20 En donde R¹¹ es independientemente H, R¹⁴, -R¹⁴C(=O)R¹⁶, -R¹⁴X²R¹⁶, -R¹⁴C(=O)X², en donde X² es -O-, -S-, -NH-, -N(R¹⁴)-, -O-R¹⁴-, -S-R¹⁴-, -S(=O)-R¹⁴-, o -NHR¹⁴-; R¹⁴ es C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquinilo, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo; R¹⁶ es H, OH, R¹⁴ o de una a cuatro unidades de aminoácidos;

25 En donde R¹² es independientemente R¹⁴, -OH, -SH, -NH₂, =NH, =NNH₂, -NH(R¹⁴), -OR¹⁴, COR¹⁶, COOR¹⁴, C(O)NH₂, C(O)NHR¹⁴, -SR¹⁴, -S(=O)R¹⁴, -P(=O)(OR¹⁶)₂, -OP(=O)(OR¹⁶)₂, -CH₂OP(=O)(OR¹⁶)₂, -SO₂R¹⁶. R¹⁴ es independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquinilo, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo. R¹⁶ es H, OH, R¹⁴ o de una a cuatro unidades de aminoácidos;

30 En donde R¹³ es C₁~C₁₀ de alquilo, heteroalquilo, alquilácido, alquilamida, alquilamina o Ar; Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de cuatro a diez carbonos, preferiblemente de cuatro a seis átomos de carbono. El término de grupo heteroaromático se refiere a uno o varios carbonos en un grupo aromático, preferentemente uno, dos o tres átomos de carbono se reemplazan por O, N, Si, Se, P o S, preferentemente O, S, N. El término arilo o Ar también se refiere a un grupo aromático, en donde uno o varios átomos de H se reemplazan independientemente por R¹⁷, F, Cl, Br, I, OR¹⁶, SR¹⁶, NR¹⁶R¹⁷, N=NR¹⁶, N=R¹⁶, NR¹⁶R¹⁷, NO₂, SOR¹⁶R¹⁷, SO₂R¹⁶, SO₃R¹⁶, OSO₃R¹⁶, PR¹⁶R¹⁷, POR¹⁶R¹⁷, PO₂R¹⁶R¹⁷, OP(O)(OR¹⁷)₂, OCH₂OP(O)(OR¹⁷)₂, OC(O)OP(O)(OR¹⁷)₂, PO(OR¹⁶)(OR¹⁷), OPO(OR¹⁶)OPO(OR¹⁶)(OR¹⁷), OC(O)R¹⁷ u OC(O)NHR¹⁷, en donde R¹⁶, R¹⁷ son independientemente H, C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquinilo, heterocíclico, carbocíclico; C₃~C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo o glucósidos C₄~C₁₂, o sales farmacéuticas.

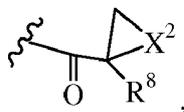
Además, R¹² puede ser H cuando R¹⁰ no es H, o cuando R¹³ es:



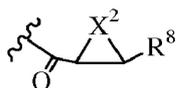
en donde Z¹ es H, CH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, C(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, PO(OR¹⁸)₂, C(O)R¹⁸, C(O)NHR¹⁸, SO₂(OR¹⁸), glucósidos C₄~C₁₂ o C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, heterocíclico; R¹⁸ es H, C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquinilo, heterocíclico; C₃~C₈ de arilo, alquilcarbonilo; R¹⁹ es H, OH, NH₂, OSO₂(OR¹⁸), XCH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, XC(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, XPO(OR¹⁸)₂, XC(O)R¹⁸, XC(O)NHR¹⁸ C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo,

derivado de ácido carboxílico; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico; C₃~C₈ de arilo, alquilcarbonilo; o sales farmacéuticas; X es O, S, NH; Y¹ e Y² son N o CH respectivamente.

o R¹² puede ser H cuando R¹¹ es:

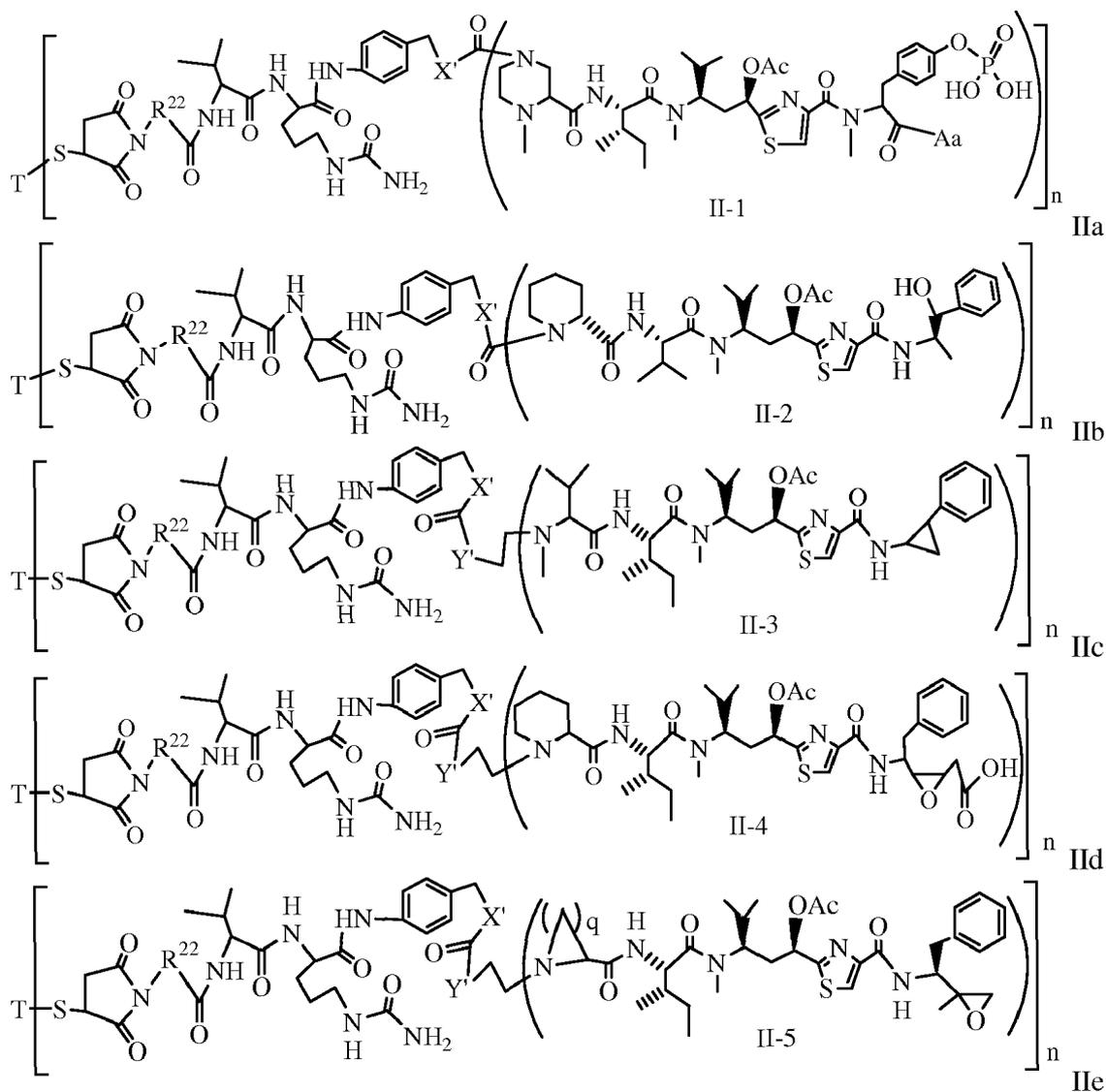


5 o

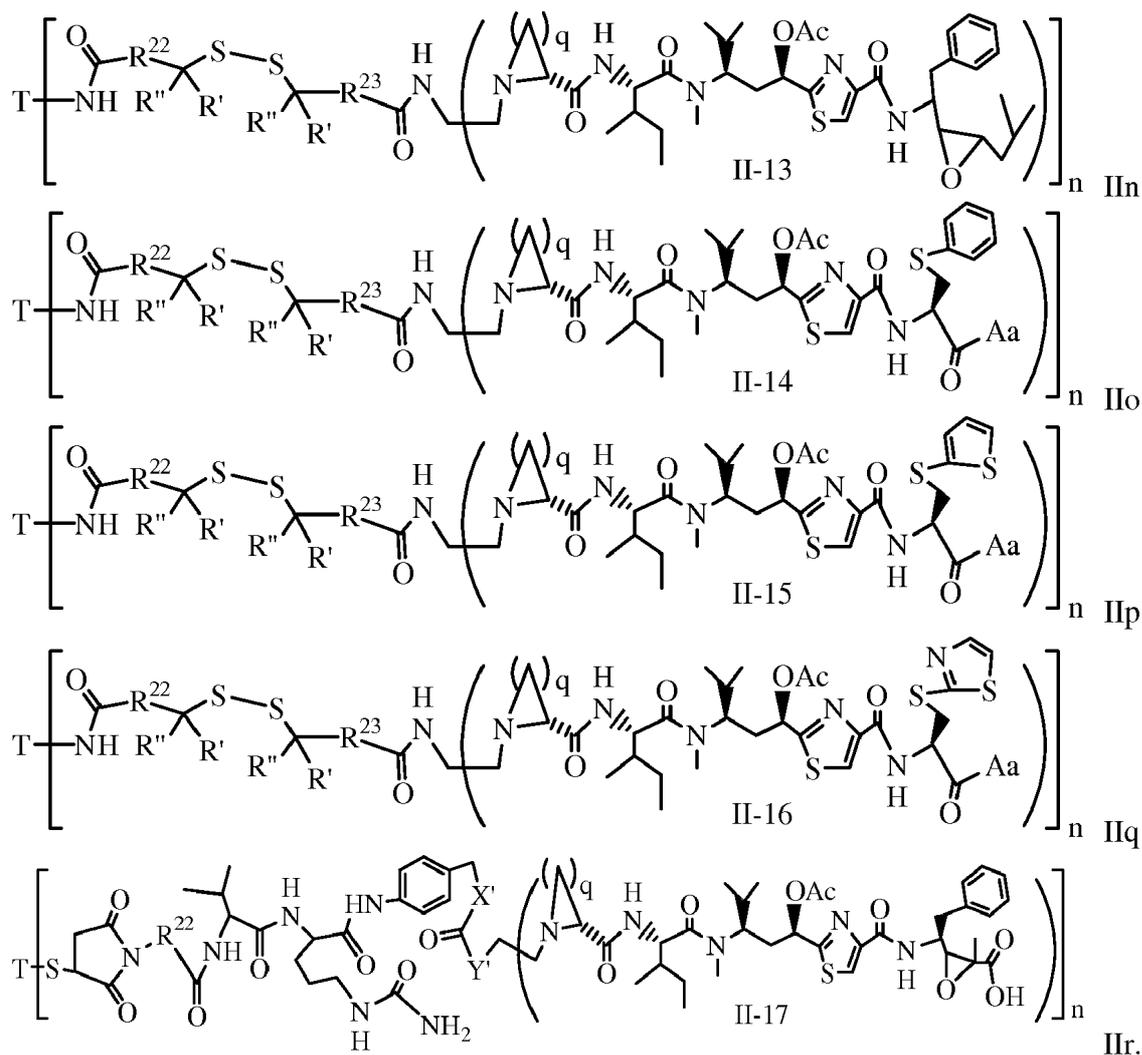


X² es O, S, N-R⁸; R⁸ es H, C₁~C₆ de alquilo o heteroalquilo

Clases ilustrativas de compuestos de fórmula II tienen las estructuras:



10

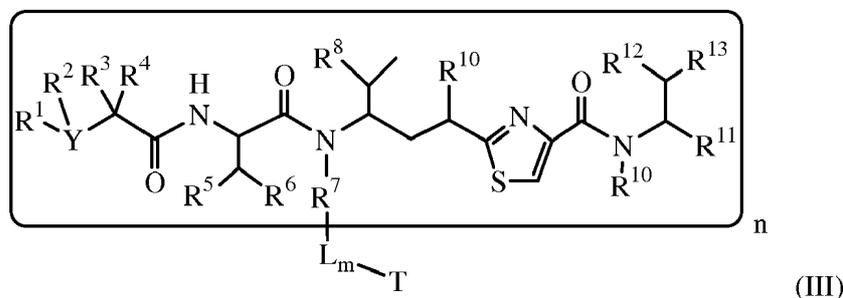


5

en donde Aa es un aminoácido natural o no natural; n es 1~20; q = 1~5; X', Y' y Z 'son independientemente CH, O, S, NH o NR²²; R²² y R²³ son independientemente C₁~C₈ de alquilo; C₂~C₈ de alquenoilo, alquinoilo, heteroalquilo; C₃~C₈ de arilo, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, Ar-alquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroaralquilo, o -(OCH₂CH₂)_n-; R' y R'' son independientemente H o CH₃. Dentro de los corchetes están los medicamentos antimitóticos y los corchetes cuadrados son el medicamento antimitótico con enlazadores.

10

En otra realización, un conjugado de un agente antimitótico de molécula de unión celular tiene la fórmula (III):

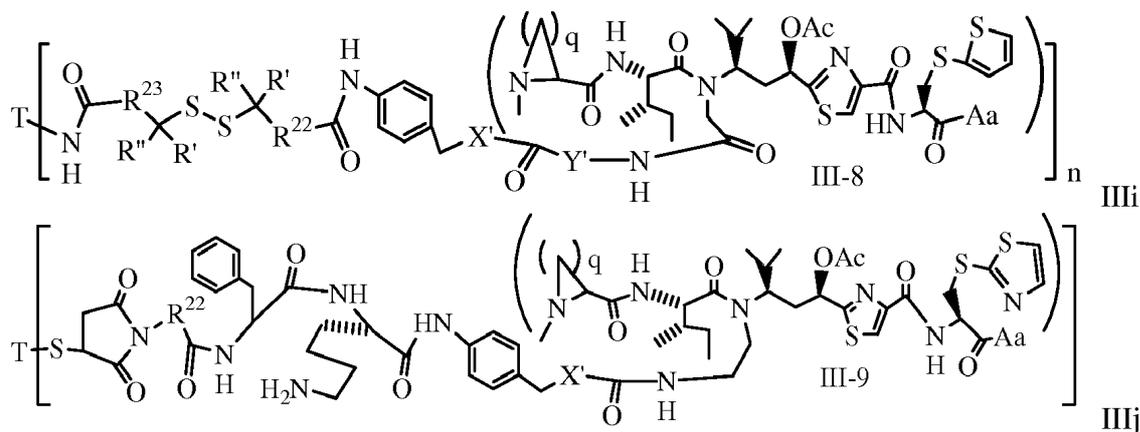


en donde T, L, m, Y, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³ y n se definen igual que en la fórmula (II).

15

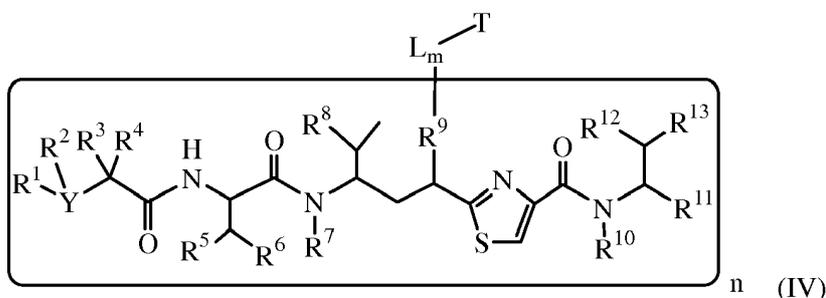
Donde R⁷ se selecciona independientemente de R¹⁴ o -R¹⁴C(=O)X¹R¹⁵- o -R¹⁴X¹R¹⁵-. R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan independientemente de C₁~C₈ de alquilo o heteroalquilo; C₂~C₈ de alquenoilo, alquinoilo; heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo; C₃~C₈ de arilo, heterocicloalquilo, heteroaralquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; X¹ se selecciona de O, S, S-S, NH o NR¹⁴.

Los ejemplos ilustrativos de compuestos de fórmula (III) tienen las estructuras:



En donde Ar, n, q, X', Y', Z', R²², R²³, R' y R'' se definen de la misma manera que para la fórmula IIa~IIr.

En otra realización, un conjugado de molécula de unión-agente antimitótico tiene la fórmula (IV)

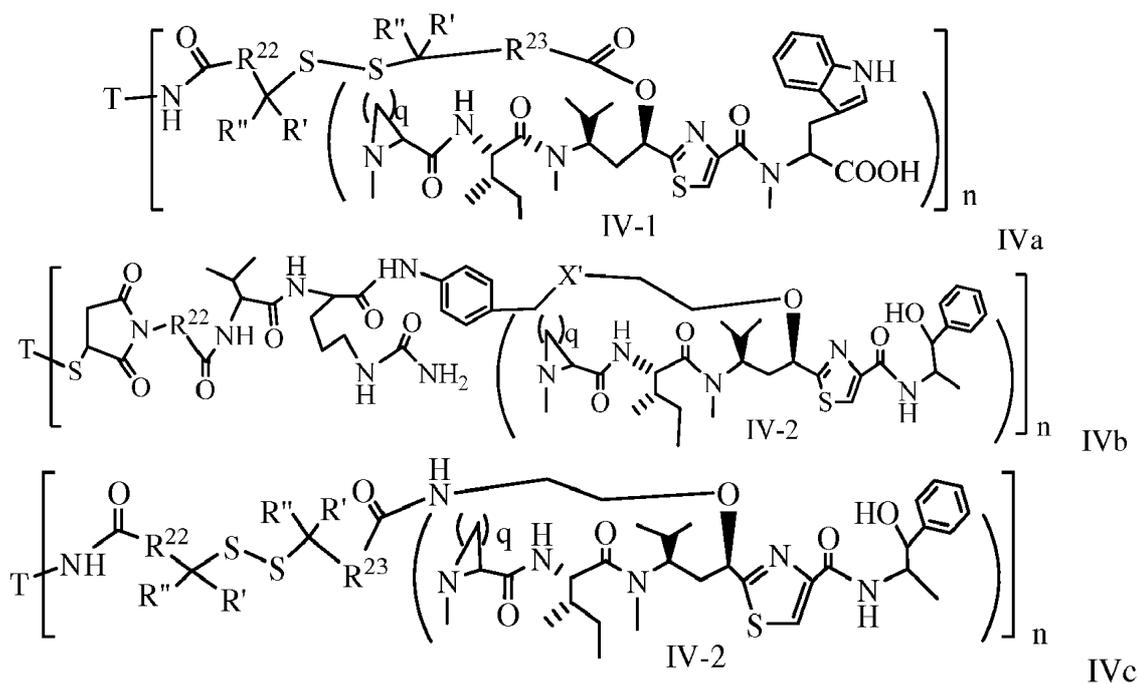


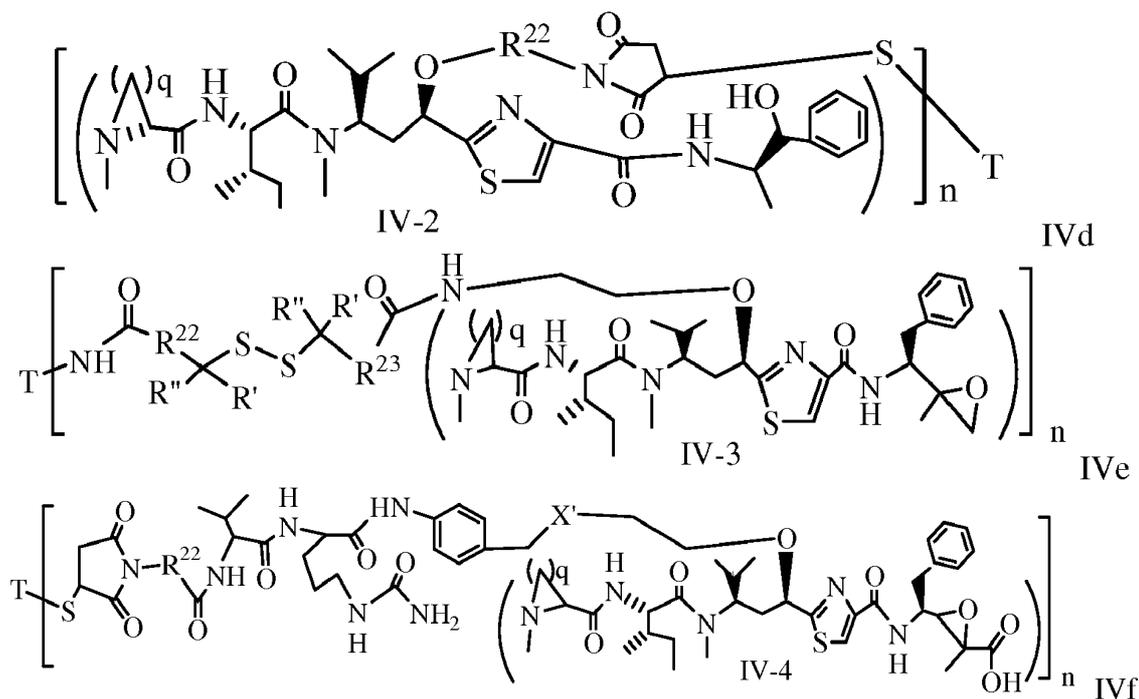
5

en donde T, L, m, Y, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³ y n se definen de la misma manera que en la fórmula (II).

10 Donde R⁹ es independientemente, -O-, -OR¹⁴-, -OC(=O)R¹⁴-, -OC(=O)NHR¹⁴-, -OC(=O)R¹⁴SSR¹⁵-, -OP(=O)(OR¹⁴)O-, en donde R¹⁴, R¹⁵ son independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₃~C₈ de arilo, heteroarilo, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroaralquilo, alquilcarbonilo o sales farmacéuticas. Además, R⁹ puede estar ausente.

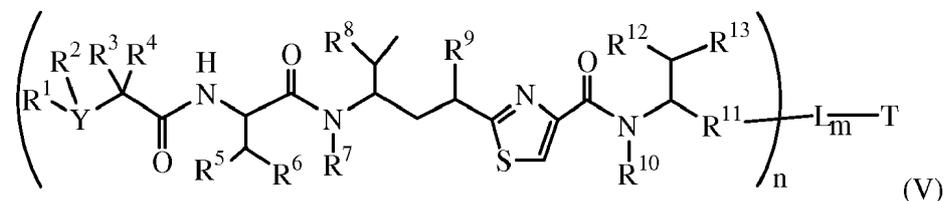
Ejemplos ilustrativos de compuestos de fórmula (IV) tienen las estructuras:





5 en donde Ar, Aa, n, q, X', Y', R²², R²³, R' y R'' se definen de la misma manera que para la fórmula IIa~IIr.

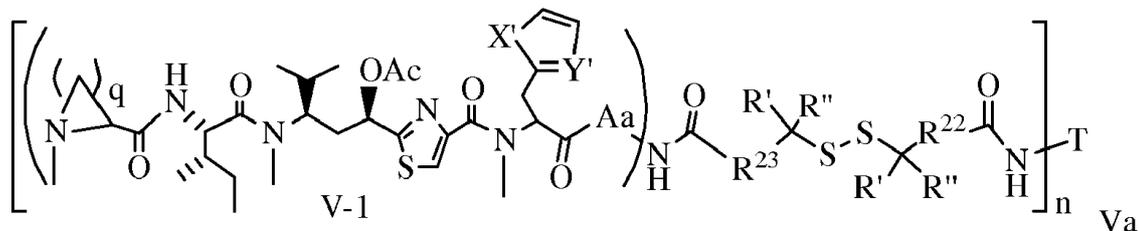
Además, según la descripción, un conjugado de molécula de unión-agente antimetabólico tiene la fórmula (V)

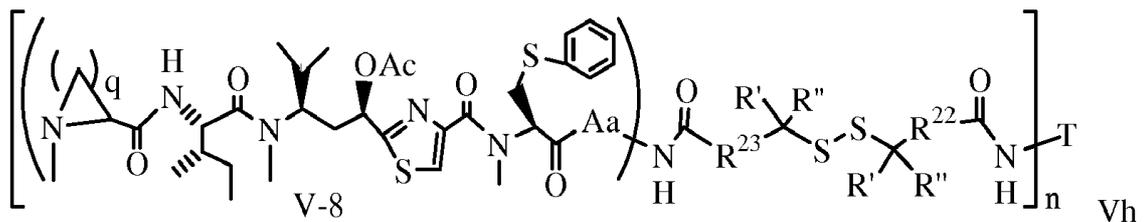
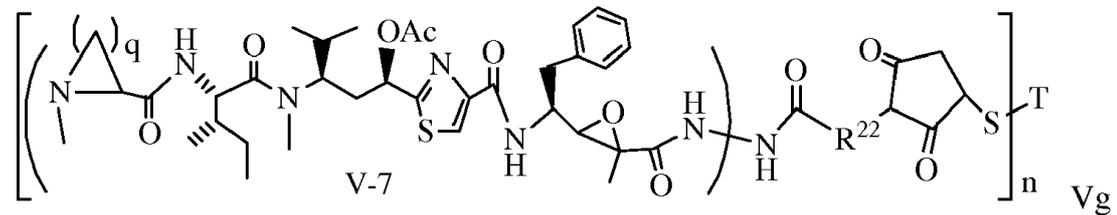
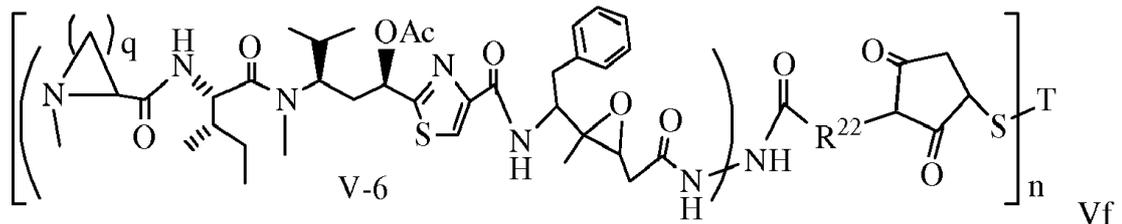
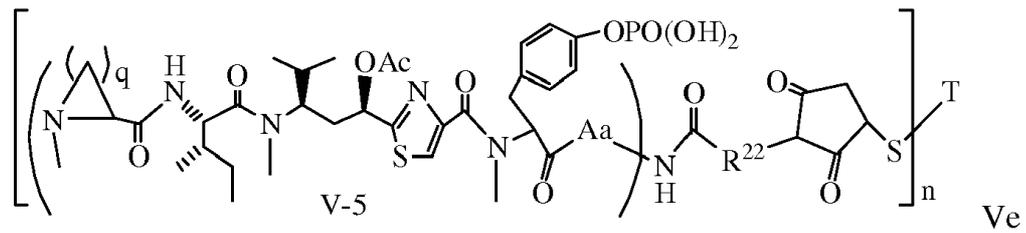
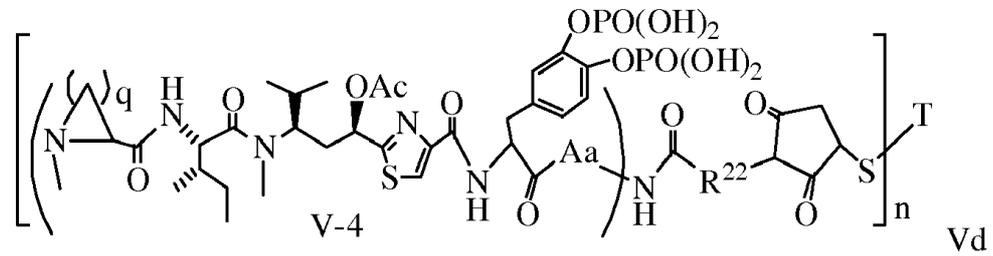
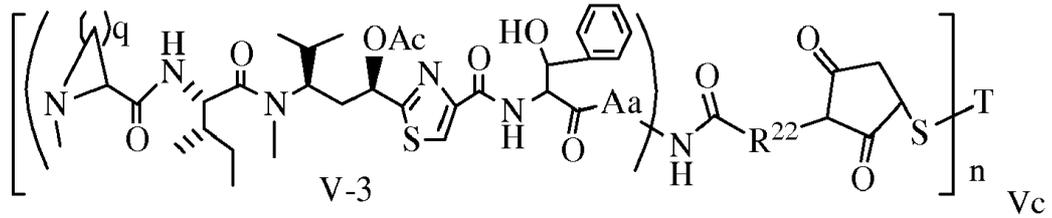
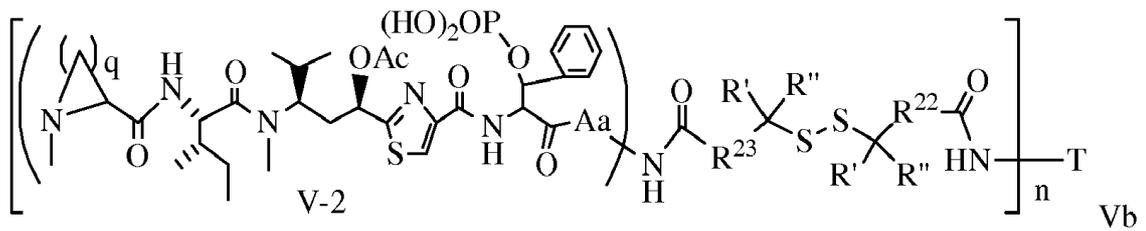


en donde T, L, m, Y, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹², R¹³ y n se definen igual que en la fórmula (II).

10 En donde R¹¹ es independientemente -R¹⁴-, -R¹⁴C(=O)R¹⁷-, -R¹⁴X²R¹⁷-, -R¹⁴C(=O)X²-, en donde R¹⁷ es independientemente H, OH, C₁~C₈ de alquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heteroalquilo; C₃~C₈ de arilo, arileno, heterocíclico, carbocíclico, heterocicloalquilo; o un aminoácido, o dos unidades de aminoácidos; X² es -O-, -S-, -NH-, -N(R¹⁴)-, -O-R¹⁴-, -S-R¹⁴-, -S(=O)-R¹⁴-, o -NHR¹⁴-; R¹⁴ es C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino; C₃~C₈ de arilo, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo, alquilocicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilocicloalquilo, heteroaralquilo, alquilcarbonilo.

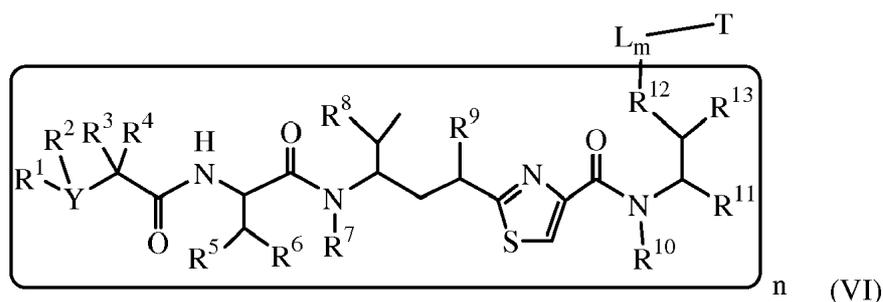
15 Ejemplos ilustrativos de compuestos de fórmula (V) tienen las estructuras:





En donde Ar, Aa, n, q, X', R²², R²³, R' y R'' se definen de la misma manera que para la fórmula IIa~IIr.

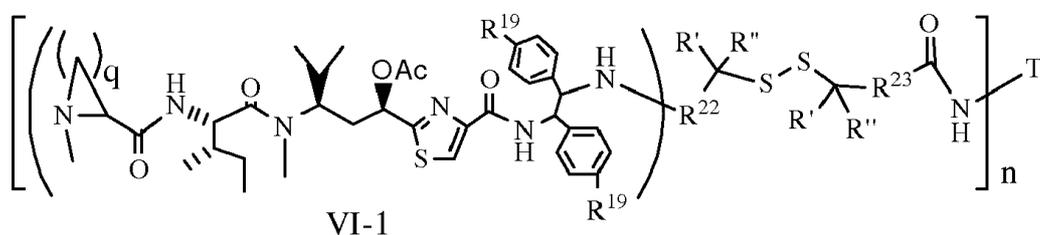
También según la descripción, los conjugados de un agente antimetabólico de unión celular tienen la fórmula (VI)



en donde T, L, m, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹¹, R¹³ y n se definen de la misma manera que en la fórmula (II).

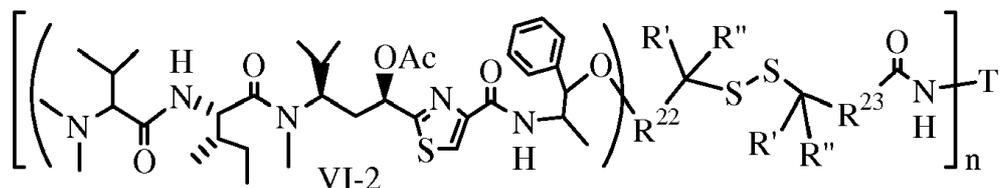
5 En donde R¹² es independientemente R¹⁴, -O-, -S-, -NH-, =N-, =NNH-, -N(R¹⁴)-, -OR¹⁴-, C(O)O-, C(O)NH-, C(O)NR¹⁴-, -SR¹⁴-, -S(=O)R¹⁴-, -NHR¹⁴-, -CH₂OP(=O)(OR¹⁵)-, -P(=O)(OR¹⁵)-, -OP(=O)(OR¹⁵)O-, -SO₂R¹⁴. R¹⁴, R¹⁵ son independientemente C₁~C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alquenilo, alquinilo; C₃~C₈ de arilo, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroaralquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo.

Ejemplos ilustrativos de compuestos de fórmula VI tienen las siguientes estructuras:



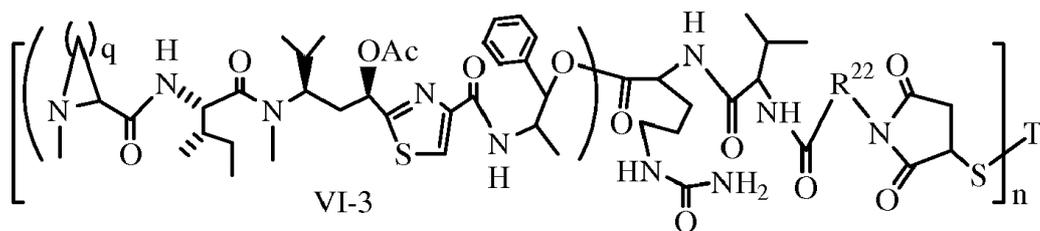
VI-1

VIa



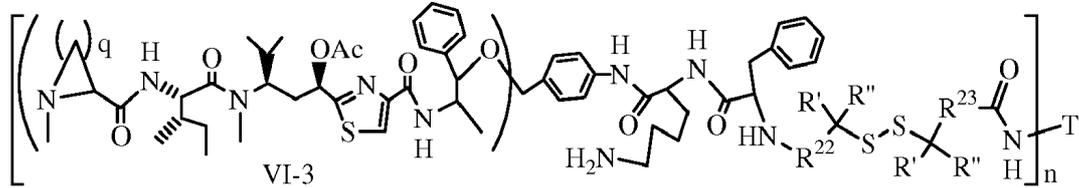
VI-2

VIb



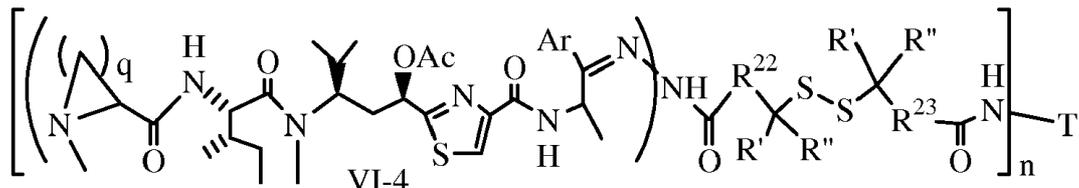
VI-3

VIc



VI-3

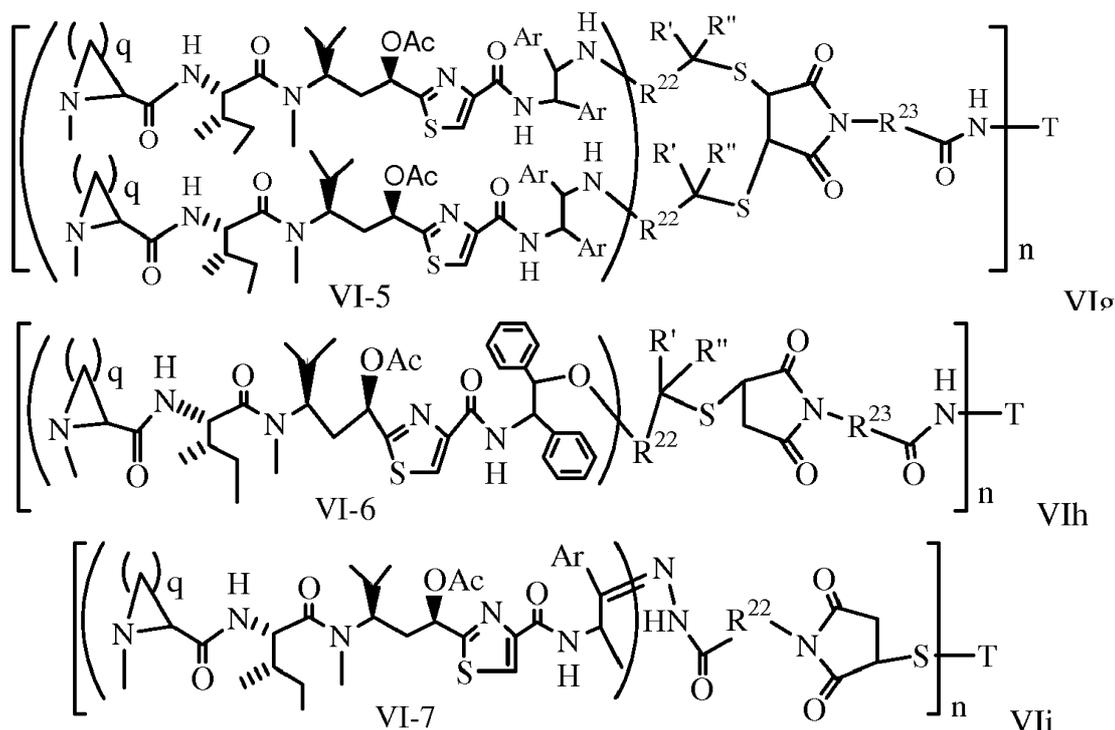
VIId



VI-4

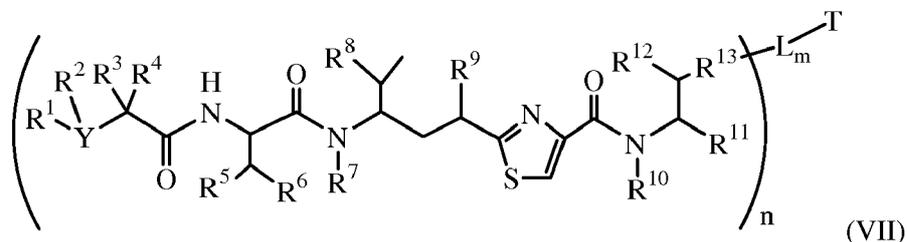
VIIf

10



En donde Ar, Aa, n, q, X', R²², R²³, R' y R'' se definen de la misma manera que para la fórmula IIa~IIr.

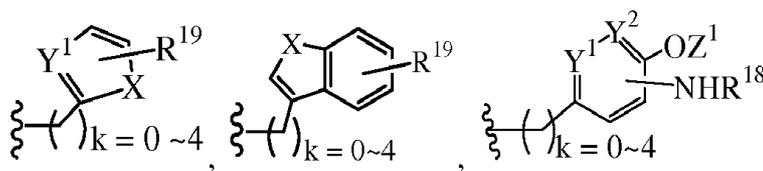
- 5 También según la descripción, los conjugados de los agentes antimitóticos de molécula de unión a la superficie celular tienen la fórmula (VII)



en donde T, L, m, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₁, R₁₂ y n se definen de la misma manera que en la fórmula (II).

- 10 En donde R¹³ es C₁~C₁₀ de alquilo, heteroalquilo, alquilácido, alquilamida, alquilamina o Ar; Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de cuatro a diez carbonos, preferiblemente de cuatro a seis átomos de carbono. El término de grupo heteroaromático se refiere a uno o varios carbonos en un grupo aromático, preferentemente uno, dos o tres átomos de carbono se reemplazan por O, N, Si, Se, P o S, preferentemente O, S, N. El término arilo o Ar también se refiere a un grupo aromático, en donde uno o varios átomos de H se reemplazan independientemente por R¹⁸, F, Cl, Br, I, OR¹⁶, SR¹⁶, NR¹⁶R¹⁸, N=NR¹⁶, N=R¹⁶, NR¹⁶R¹⁸, NO₂, SOR¹⁶R¹⁸, SO₂R¹⁶, SO₃R¹⁶, OSO₃R¹⁶, PR¹⁶R¹⁸, POR¹⁶R¹⁸, PO₂R¹⁶R¹⁸, OPO₃R¹⁶R¹⁸, OPO₂R¹⁶OPO₃R¹⁶R¹⁸ o PO₃R¹⁶R¹⁸ en donde R¹⁶, R¹⁸ son independientemente H, C₁~C₈ de alquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heteroalquilo; C₃~C₈ de arilo, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo, alquilocicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroaralquilo, heteroalquilocicloalquilo, alquilcarbonilo; o glucósidos C₄~C₁₂; o sales farmacéuticas.
- 15

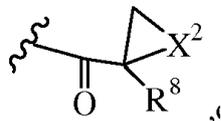
Además, R¹² puede ser H cuando R¹⁰ no es H, o cuando R¹³ es:



- 20 en donde Z¹ es H, CH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, C(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, PO(OR¹⁸)₂, PO(OR¹⁸)OPO(OR¹⁸)₂, C(O)R¹⁸, C(O)NHR¹⁸, SO₂(OR¹⁸), glucósidos C₄~C₁₂ o C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, heterocíclico; R¹⁸ es H, C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, heteroalquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico; C₃~C₈ de arilo, alquilcarbonilo; R¹⁹ es H, OH,

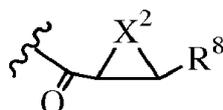
NH₂, OSO₂(OR¹⁸), XCH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, XC(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, XPO(OR¹⁸)₂, XC(O)R¹⁸, XC(O)NHR¹⁸, C₁~C₈ de alquilo, carboxialquilo, derivado de ácido carboxílico; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico; C₃~C₈ de arilo, alquilcarbonilo; o sales farmacéuticas; X es O, S, NH; Y¹ e Y² son N o CH respectivamente.

o R¹² puede ser H cuando R¹¹ es:

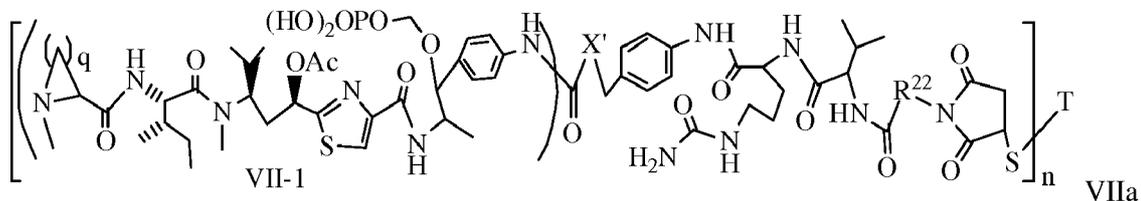


5

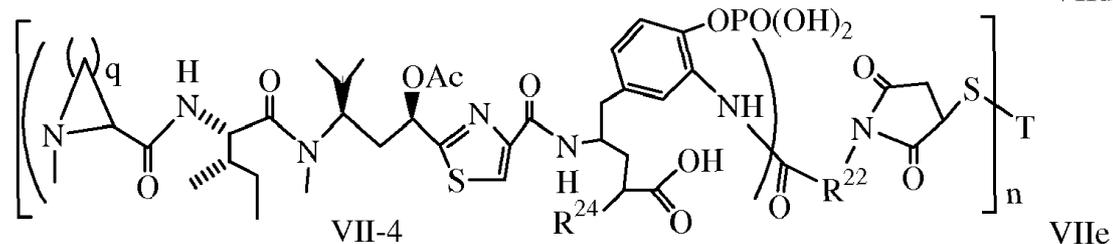
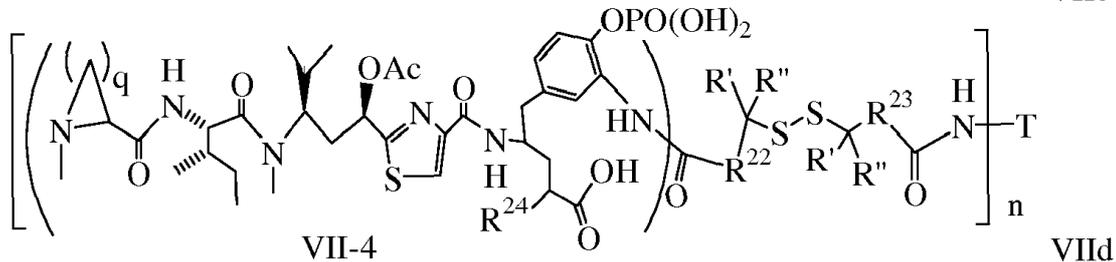
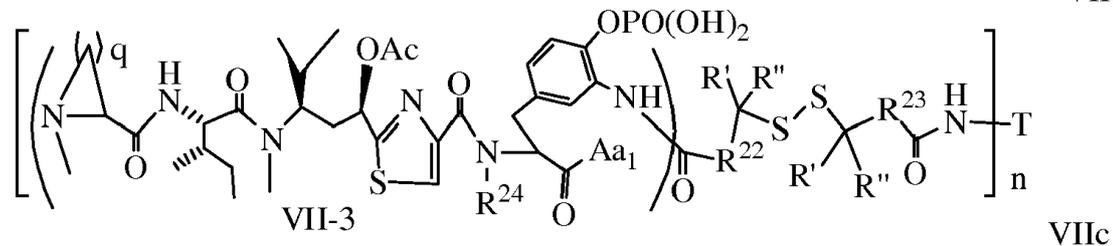
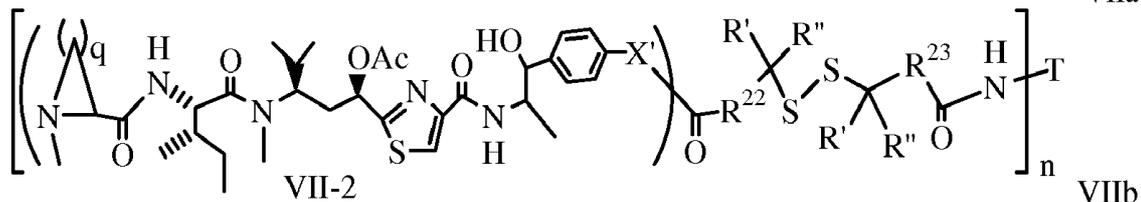
o



X² es O, S, N-R⁸; R⁸ es H, C₁~C₄ de alquilo o heteroalquilo. Los ejemplos ilustrativos de compuestos de fórmula VII tienen las siguientes estructuras:



10

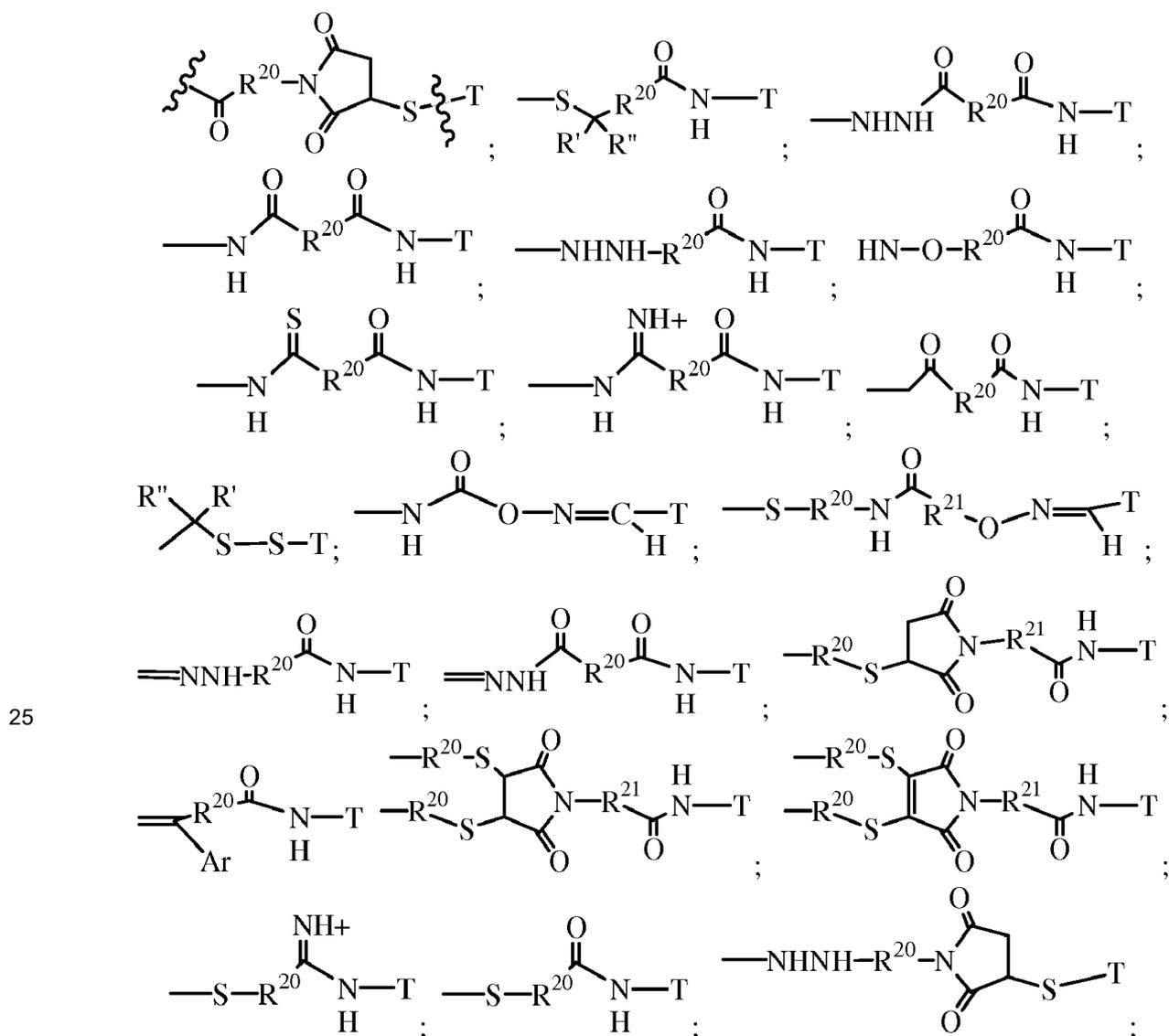


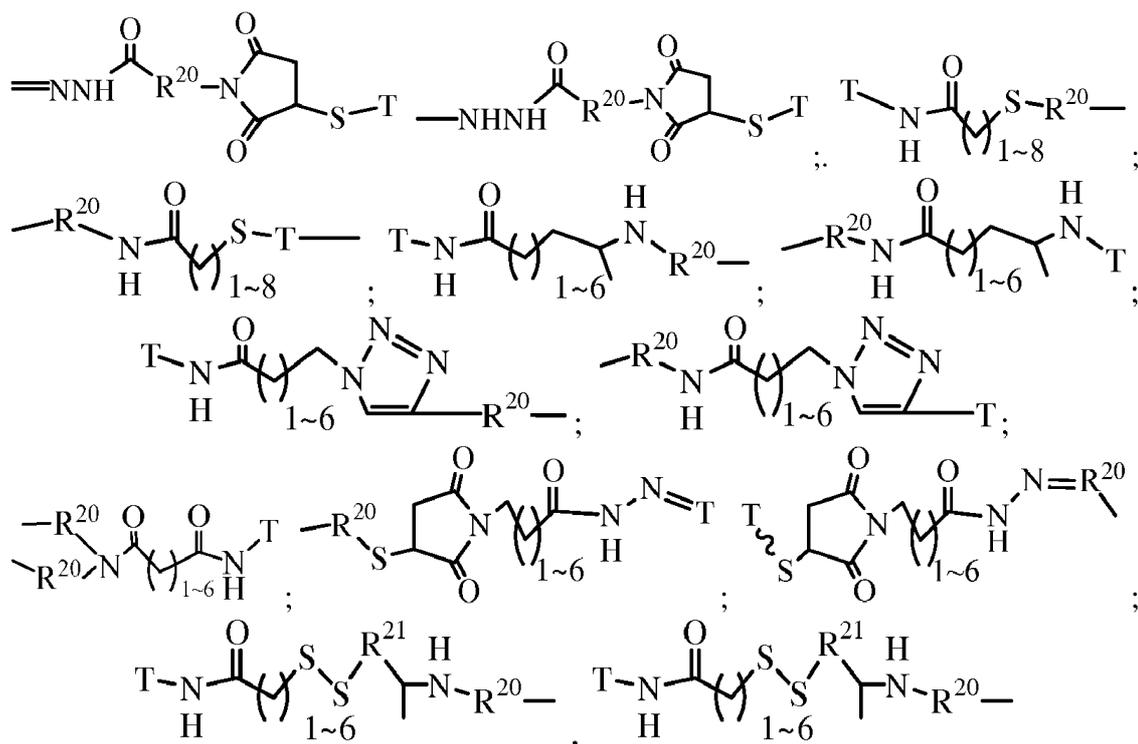
en la ruptura de enlaces no necesariamente incluyen un proceso biológico o metabólico, y en su lugar pueden incluir una reacción química estándar, como una reacción de hidrólisis o sustitución, por ejemplo, un endosoma que tiene un pH más bajo que el pH citosólico y/o reacción de intercambio de enlaces disulfuro con un tiol intracelular, tal como un rango milimolar de glutatión abundante dentro de las células malignas.

- 5 El enlazador liberable L de los conjugados puede tener la fórmula: --Ww-(Aa)r--Vv-- en donde: --W-- es una unidad de Estiramiento; w es 0 o 1; cada --Aa-- es independientemente una unidad de aminoácidos; r es independientemente un número entero que varía de 0 a 12; --V-- es una unidad espaciadora; y v es 0, 1 o 2.

La unidad de Estiramiento (--W--), cuando está presente, une una unidad molecular de unión dirigida (T) a una unidad de aminoácidos (--Aa--), o une V cuando un Aa no está presente. La unidad de Estiramiento W puede contener independientemente un separador autoinmolativo, unidades peptídico, un enlace hidrazona, enlaces disulfuro o tioéter. A este respecto, una unión molecular (T) tiene un grupo funcional que puede formar un enlace con un grupo funcional de Estiramiento. Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en una unión molecular, ya sea de forma natural o mediante manipulación química incluyen, pero no se limitan a, sulfhidrilo (--SH), amino, hidroxilo, carbonilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato y carboxilo. Los grupos funcionales preferidos son sulfhidrilo, carboxi y amino. Los grupos sulfhidrilo se pueden generar mediante la reducción de un enlace disulfuro intramolecular de un ligando de unión, como el de un anticuerpo. Alternativamente, los grupos sulfhidrilo se pueden generar por reacción de un grupo amino de una unidad estructural de lisina de una molécula de unión usando 2-iminotiolano (reactivo de Traut) o tiolactona u otro reactivo generador de sulfhidrilo, tal que modifica T con un conector de enlace disulfuro, o un tiol éster seguido por reducción o hidrólisis respectivamente.

- 20 Ejemplos ilustrativos de W unidos a T tienen las estructuras:

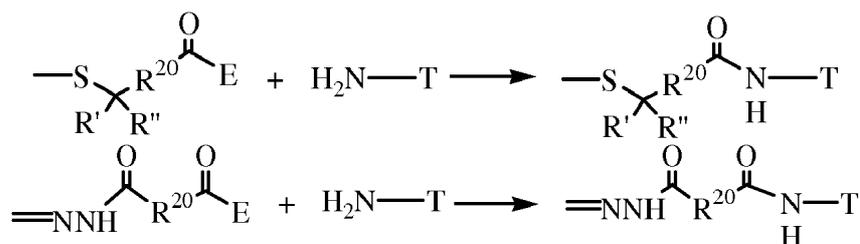




en donde R²⁰ y R²¹ se seleccionan de -alquileo C₁-C₉-, -ciclociclo C₁~C₇-, -o-(alquilo C₁~C₈)-, -arileno-, -alquileo C₁-C₉-arileno-, -arileno-, -C₁~C₉ alquileo-, -C₁~C₉ alquileo-(C₁~C₈ carbociclo)-, -(C₃~C₇ carbociclo)-C₁~C₉ alquileo-, -C₃~C₈ heterociclo-, -C₁~C₁₀ alquileo-(C₃~C₈ heterociclo)-, -(C₃~C₈ heterociclo)-C₁~C₉ alquileo-, -(CH₂CH₂O)_k-, -(CH(CH₃)CH₂O)_k-, y -(CH₂CH₂O)_k-CH₂-; k es un número entero que va de 1 a 20; R' y R'' son independientemente H o CH₃.

En otra realización, la conjugación de W a T covalentemente como se ilustra arriba puede ser a través de diversas reacciones químicas.

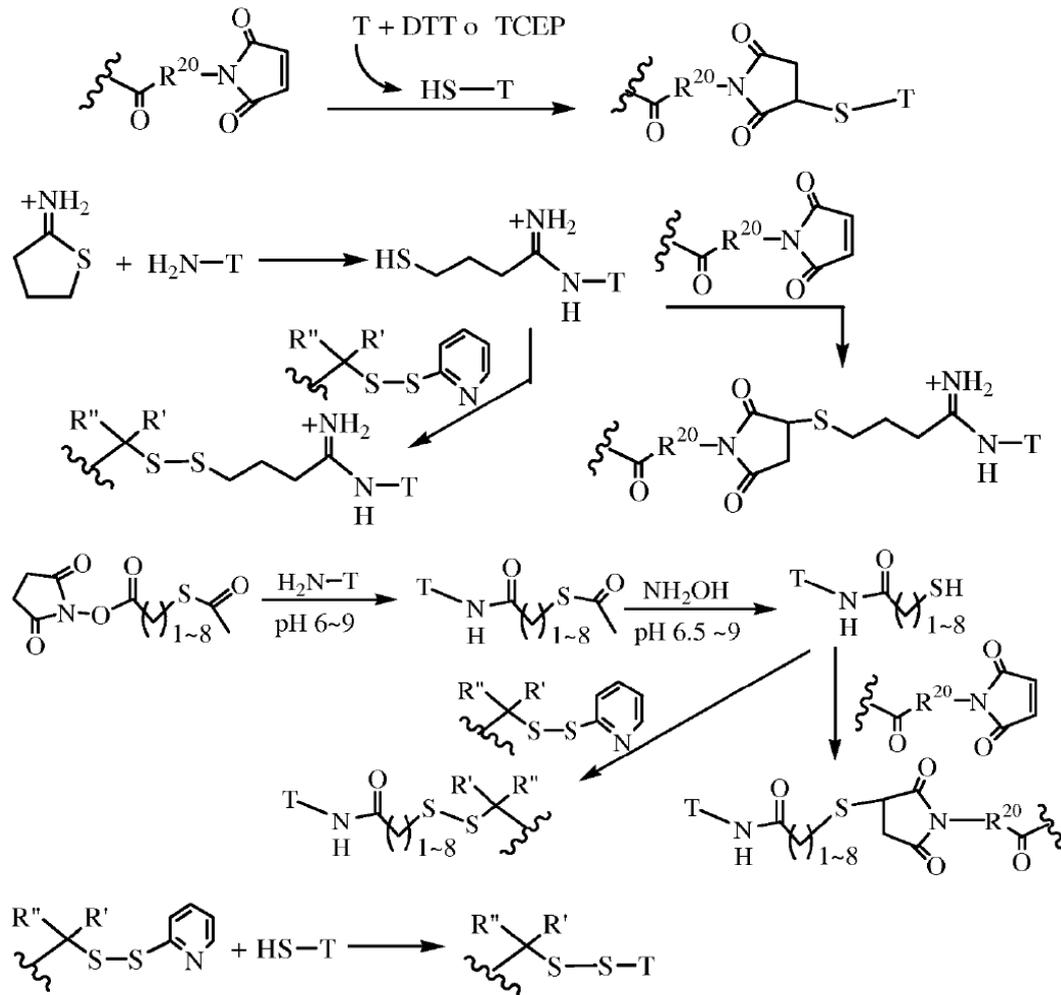
Ejemplos de la formación de enlaces amida:



En donde la unidad de Estiramiento contiene un sitio reactivo de E, que puede formar un enlace amida con un grupo amino primario o secundario de una molécula de unión. El ejemplo del E reactivo incluye, pero no se limita a, tales como ésteres de hidroxisuccinimidilo (NHS, Sulfo-NHS, etc.), ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo (incluye sulfo-tetrafluorofenilo), anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos.

Ejemplos de enlaces de tiol éter o enlace disulfuro:

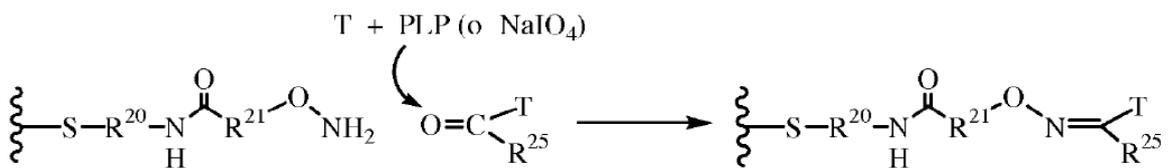
20

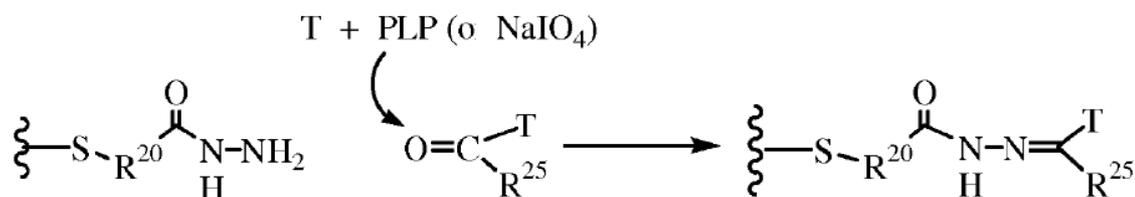


En donde la unidad de Estiramiento contiene un sitio reactivo con sulfhidrilo, que puede formar un enlace tior éter o disulfuro con un grupo tior que se genera por reducción de un enlace disulfuro intramolecular del ligando de unión T, o generado por una modificación química en el ligando de unión T.

- 5 En otro aspecto más de la descripción, el grupo reactivo de Estiramiento contiene un sitio reactivo que es reactivo a un grupo aldehído (-CHO) o una cetona (-C(=O)R) que puede modificarse químicamente en una T molecular de unión. Por ejemplo, un carbohidrato en una T molecular de unión puede oxidarse ligeramente usando un reactivo tal como peryodato de sodio para generar un grupo aldehído o una cetona (-C(=O)R); o una amina en un aminoácido en el extremo N de los anticuerpos (o proteínas o péptidos) puede reaccionar con piridoxal 5'-fosfato (PLP) en una solución reguladora para introducir grupos cetona. La unidad resultante (-C=O) se puede condensar con el de Estiramiento que contiene una funcionalidad como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina y una arilhidrazida.
- 10

Ejemplos de la conjugación de la hidrazona, o los enlaces oxima o imina:

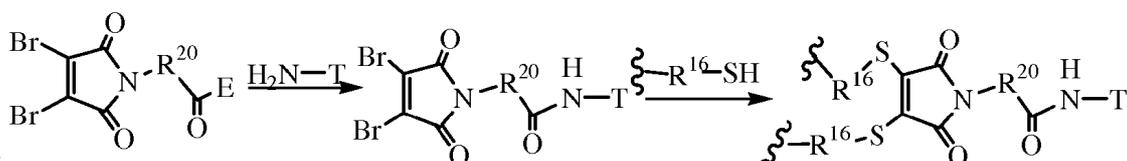
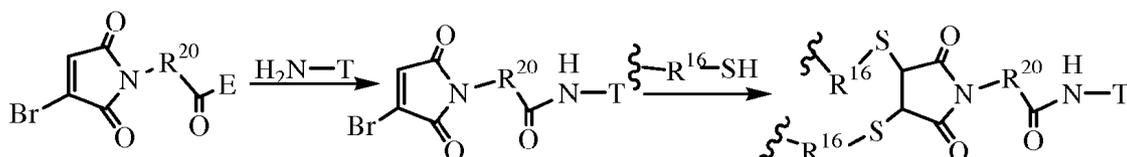
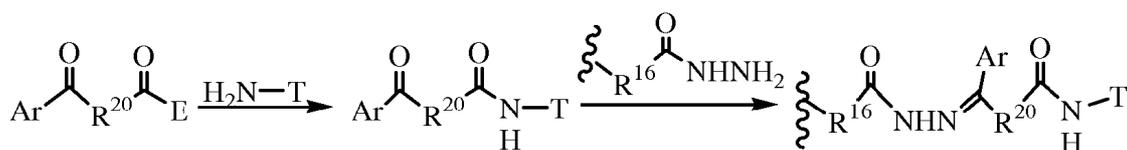
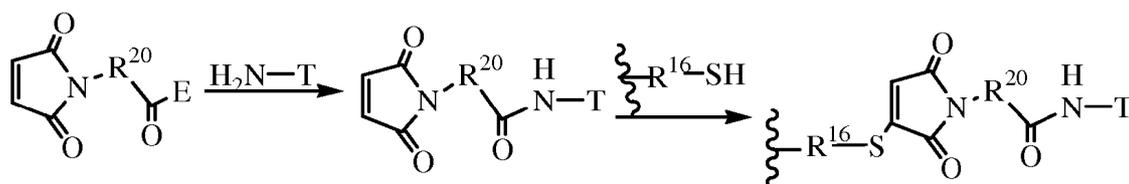
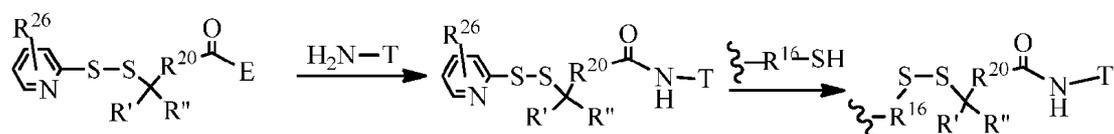




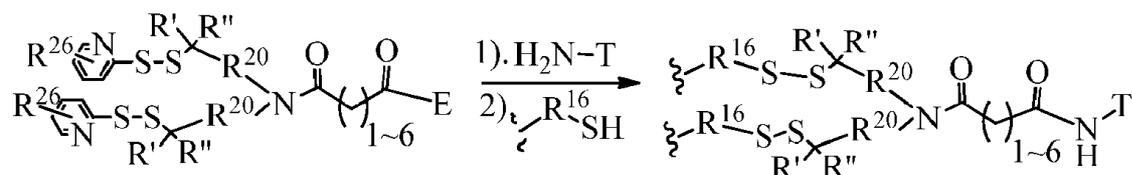
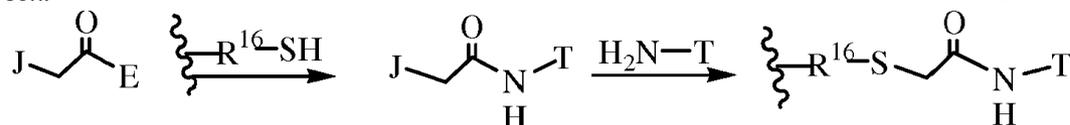
en donde

R²⁰ y R²¹ se describen anteriormente, R²⁵ es un sustituyente orgánico de un aminoácido.

- 5 En otro aspecto de la divulgación los grupos de Estiramiento (que pueden contener un espaciador V y/o un aminoácido) pueden unirse a las moléculas de unión (T), seguido de la conjugación de un potente agente antimitótico a la unidad estructural de moléculas de unión en una solución acuosa regulada. Los ejemplos de estas conjugaciones de dos pasos (aquí se omite un fármaco citotóxico enlazado a R¹⁶)

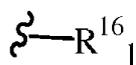


son:

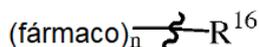


- 10 en donde E incluye, pero no se limita a, como ésteres de hidroxisuccinimido (NHS, Sulfo-NHS, etc.), ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, tetrafluorofenilo (incluye sulfo-tetrafluorofenilo) ésteres, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. R' y R'' son independientemente H o CH₃; R²⁰, R¹⁶ y Ar se

definen en varias formas de realización a lo largo de esta divulgación; R²⁶ es H o F, o NO₂ independientemente; J es F, Cl, Br, I, tosilato (TsO) o mesilato (MsO) independientemente y en donde

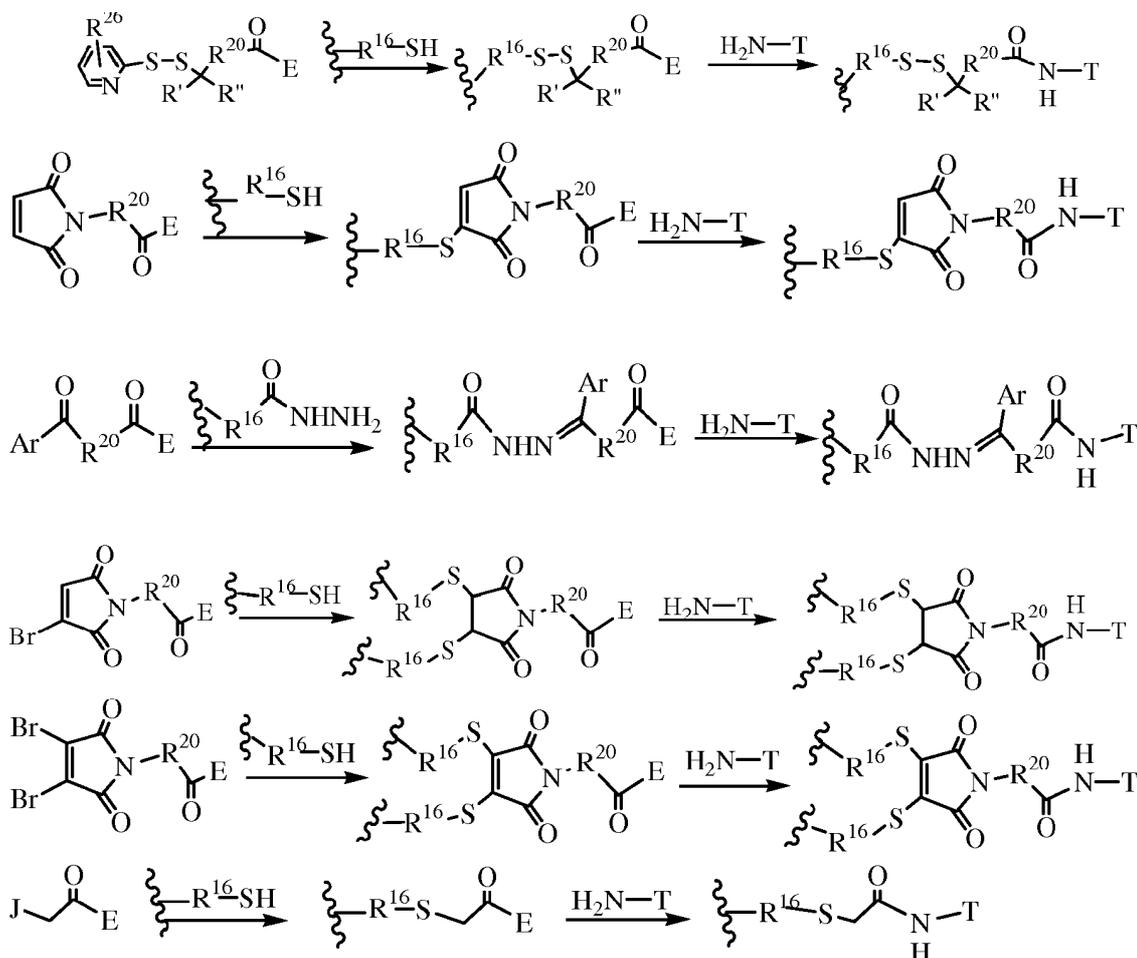


lleva al menos un agente/fármaco antimetabólico como



5

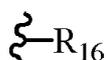
En otro aspecto de la divulgación los grupos de Estiramiento se pueden unir primero a un potente agente antimetabólico, seguido de la conjugación de las moléculas de unión (T) en una solución regulada acuosa de pH 3~10 (preferiblemente pH 5~8.5) que contiene al 50% de codisolventes orgánicos. Ejemplos de este tipo de conjugaciones de dos pasos:



10

en donde E incluye, pero no se limita a, como ésteres de hidroxisuccinimido (NHS, Sulfo-NHS, etc.), ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, tetrafluorofenilo (incluye sulfo-tetrafluorofenilo) ésteres, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. R' y R'' son independientemente H o CH₃; R¹⁶, R²⁰ y Ar se definen en varias formas de realización a lo largo de esta divulgación; R²⁶ es H o F, o NO₂ independientemente; J es F, Cl, Br, I, tosilato (TsO) o mesilato (MsO) independientemente y en donde

15



porta al menos un agente/fármaco antimetabólico

La unidad Aminoácido (--Aa--), cuando está presente, enlaza la unidad de Estiramiento a la unidad Espaciadora si la unidad Espaciadora está presente, enlaza la unidad de Estiramiento a la unidad de agente antimetabólico si la unidad Espaciadora está ausente, y une la unidad de molécula de unión (T) a la unidad de agente antimetabólico si la unidad de Estiramiento y la unidad Espaciadora están ausentes. --(Aa)r-- es un aminoácido natural o no natural, dipéptido,

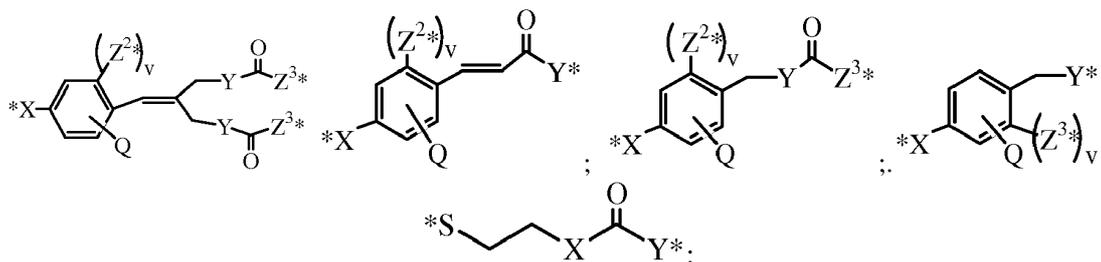
20

tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o unidad dodecapeptídica, y r es un número entero que varía de 0 a 12. El término aminoácido como se usa en el presente documento se refiere generalmente a aminoalquilcarboxilato, donde el radical alquilo está opcionalmente sustituido, tal como con alquilo, acilo, hidroxialquilo, sulfhidrilalquilo, aminoalquilo, carboxialquilo y similares, las estructuras de los aminoácidos naturales y no naturales y los péptidos se describen en el libro: G.C. Barrett and D.T. Elmore, "Amino Acid and Peptide", Cambridge University Press, 2004. Además, el aminoácido se refiere a beta, gamma y aminoácidos más largos con cadena interna que contiene metilo, bencilo, hidroximetilo, tiometilo, carboxilo, carboxilmetilo, guanidinopropilo y similares. Más preferiblemente, el aminoácido se selecciona de arginina, asparagina, ácido aspártico, citrulina, cisteína, glicina, ácido glutámico, leucina, lisina, ácido glutámico, glutamina, serina, ornitina, fenilalanina, treonina, tirosina, valina y similares.

La unidad de aminoácidos utilizada en esta divulgación se puede escindir enzimáticamente mediante una o más enzimas, que incluyen una proteasa asociada a tumores, para liberar el agente antimitótico, que en una realización se protona in vivo tras la liberación para proporcionar un agente antimitótico.

La unidad espaciadora (--V--), cuando está presente, une una unidad de aminoácidos con el agente antimitótico cuando está presente una unidad de aminoácidos. Alternativamente, la unidad espaciadora une la unidad del estirador con el agente antimitótico cuando la unidad de aminoácidos está ausente. La unidad espaciadora también une el agente antimitótico a la molécula de unión (T) cuando tanto la unidad de aminoácidos como la unidad de estiramiento están ausentes. Los enlazadores espaciadores pueden contener grupos funcionales que aumentan sustancialmente la solubilidad en agua, el transporte biológico, la eliminación renal preferencial, el consumo, la absorción, la biodistribución y/o la biodisponibilidad del conjugado que se describen en el presente documento. Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: autoinmolativas y no autoinmolativas. Una unidad espaciadora no autoinmolativa es aquella en la que parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida al agente antimitótico después de la escisión, particularmente enzimática, de una unidad de aminoácidos del conjugado de la molécula de unión de agente antimitótico-enlazador o el compuesto de agente antimitótico-enlazador.

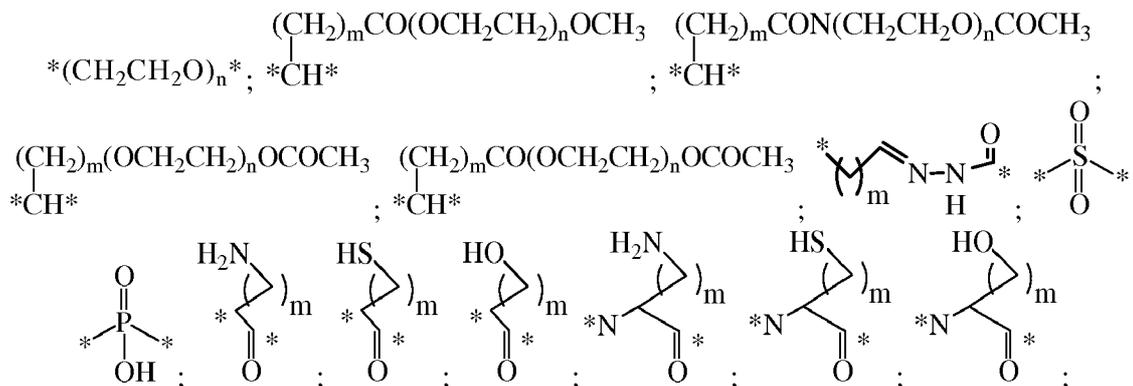
Ejemplos de los enlazadores separadores autoinmolativos:

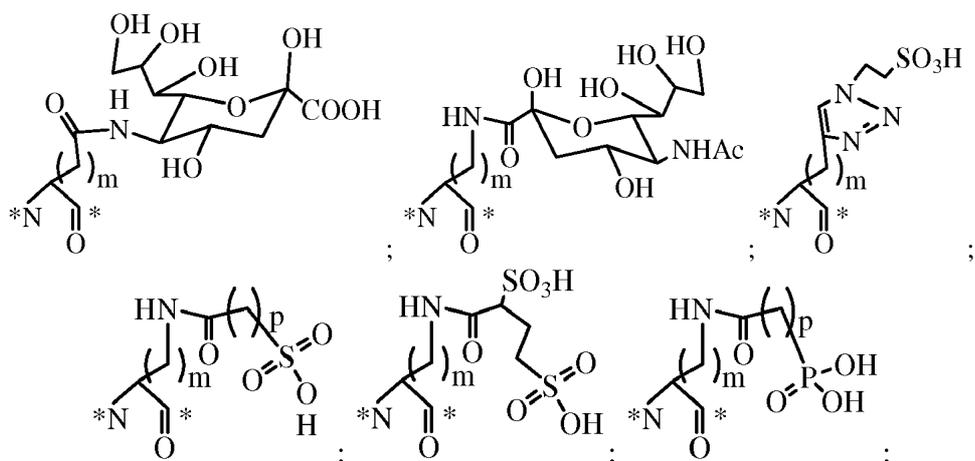


en donde el átomo (*) es el punto de unión de unidades espaciadoras adicionales o unidades enlazadoras liberables, el agente antimitótico y/o la molécula de unión (T); X, Y y Z³ son independientemente NH, O u S; Z² es H, NH, O o S independientemente, v es 0 o 1; Q es independientemente H, OH, alquilo C₁~C₆, (OCH₂CH₂) F, Cl, Br, I, OR¹⁷, o SR¹⁷, NR¹⁷R¹⁸, N=NR¹⁷, N=R¹⁷, NR¹⁷R¹⁸, NO₂, SOR¹⁷R¹⁸, SO₂R¹⁷, SO₃R¹⁷, OSO₃R¹⁷, PR¹⁷R¹⁸, POR¹⁷R¹⁸, PO₂R¹⁷R¹⁸, OPO(OR¹⁷)(OR¹⁸), OC(O)PO(OR¹⁷(OR¹⁸) o OCH₂PO(OR¹⁷(OR¹⁸) en donde R¹⁷, R¹⁸

en donde R¹⁷, R¹⁸ son independientemente H, C₁~C₈ de alquilo; C₂~C₈ de alqueno, alquino, heteroalquilo; C₃~C₈ de arilo, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroaralquilo, alquilcarbonilo, o sales de cationes farmacéuticos.

Ejemplos de enlazadores espaciadores no autoinmolativos:





5 Cuando el átomo (*) es el punto de unión de separadores adicionales o enlazadores liberables, los agentes antimetabólicos y/o las moléculas de unión; m es 1~10; n es 1-20.

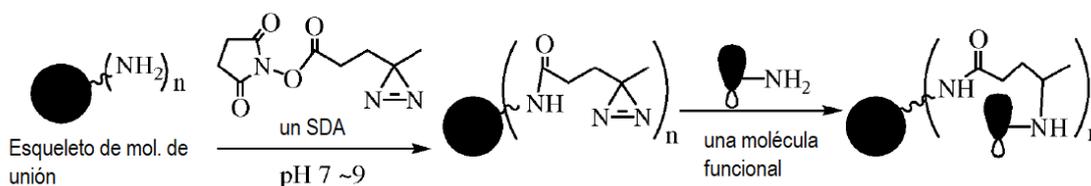
La molécula de unión (T) puede ser de cualquier tipo actualmente conocido, o que se conoce, molécula que se une a complejos con o reacciona con una unidad estructural de una población celular que se busca modificar terapéuticamente o biológicamente. La unidad de molécula de unión actúa para administrar los agentes antimetabólicos a la población de células diana particular con la que reacciona la molécula de unión (T).

10 Los agentes de unión celular incluyen, pero no se limitan a, proteínas de gran peso molecular tales como, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa (anticuerpos policlonales y monoclonales); anticuerpos de cadena sencilla; fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, [Parham, J. Immunol. 131, 2895-2902 (1983)], fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), CDR y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores que se unen inespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos virales o antígenos microbianos; interferones (como el tipo I, II, III); péptidos; linfoquinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, GM-CSF, interferón-gamma (IFN-γ); hormonas tales como insulina, TRH (hormonas liberadoras de tirotrópina), MSH (hormona estimulante de melanocitos), hormonas esteroides, tales como andrógenos y estrógenos, hormona estimulante de melanocitos (MSH); factores de crecimiento y factores estimulantes de colonias como factores de crecimiento epidérmico (EGF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factores de crecimiento transformadores (TGF), como TGFα, TGFβ, insulina e factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I, IGF-II) G-CSF, M-CSF y GM-CSF [Burgess, Immunology Today, 5, 155-158 (1984)]; factores de crecimiento de vaccinia (VGF); factores de crecimiento de fibroblastos (FGF); proteínas de menor peso molecular, polipéptidos, péptidos y hormonas peptídicas, tales como bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina; factores de crecimiento derivados de plaquetas; interleucina y citoquinas, tales como interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factores 15 inhibidores de la leucemia, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); vitaminas, como el folato; apoproteínas y glicoproteínas, tales como transferrina [O'Keefe et al, 260 J. Biol. Chem 932-937 (1985)]; proteínas o lipoproteínas de unión al azúcar, tales como lectinas; moléculas de transporte de nutrientes celulares; e inhibidores moleculares pequeños, tales como inhibidores de antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) e inhibidores de tirosina quinasa molecular pequeña (TKI), no péptidos o cualquier otra molécula o sustancia de unión 20 celular, como polímeros bioactivos [Dhar, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 2008, 105, 17356-61]; dendrímeros [Lee, et al, Nat. Biotechnol. 2005, 23, 1517-26; Almutairi, et al; Proc. Natl. Acad. Sci. 2009, 106, 685-90]; nanopartículas [Liong, et al, ACS Nano, 2008, 19, 1309-12; Medarova, et al, Nat. Med. 2007, 13, 372-7; Javier, et al, Bioconjugate Chem. 2008, 19, 1309-12]; liposomas [Medinai, et al., Curr. Phar. Des. 2004, 10, 2981-9]; cápsidas virales [Flenniken, et al, Viruses Nanotechnol. 2009, 327, 71-93]. En general, se prefieren los anticuerpos monoclonales como agente de unión 35 a la superficie celular si está disponible uno apropiado.

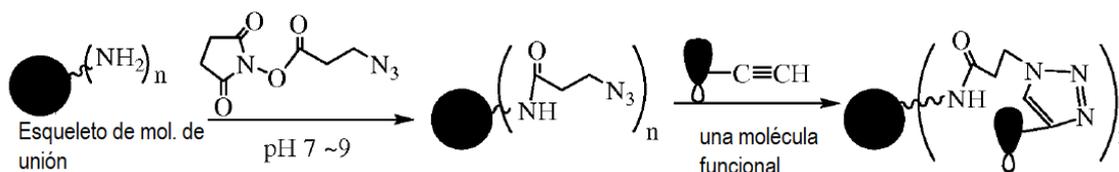
Antes de conjugar con los agentes antimetabólicos de esta divulgación, las moléculas de unión pueden modificarse mediante la unión de un péptido, una proteína o un fármaco más específico, o las otras moléculas funcionales con un agente de reticulación heterobifuncional tal como con conectores de amina a no selectiva (succinimidil(NHS)-diazirina (SDA), éster/azida de NHS), amina a sulfhidrilo (éster/maleimida de NHS, éster/piridilditiol de NHS, ésteres/haloacetilo 40 de NHS), sulfhidrilo a carbohidrato (Maleimida/Ilidrazida, Piridilditiol/Ilidrazida), Ilidroxil-a-sulfhidrilo (Isocianato/Maleimida), amina a ADN (éster NHS/Psoraleno), amina a carboxilo (Carbodiimida).

En la modificación del enlace SDA, el éster NHS de un conector SDA reacciona con un grupo amina primario de una cadena principal de molécula de unión en regulador de pH 6-9 para formar un enlace amida estable tras la liberación de NHS. Luego, la fotoactivación de la diazirina con luz UV de onda larga (330-370 nm) crea un intermedio de carbeno reactivo que puede reaccionar con un grupo amina de un péptido más específico o una proteína u otra molécula 45 funcional. El orden de estos dos pasos puede ser diferente de la siguiente manera: un grupo amina de una molécula

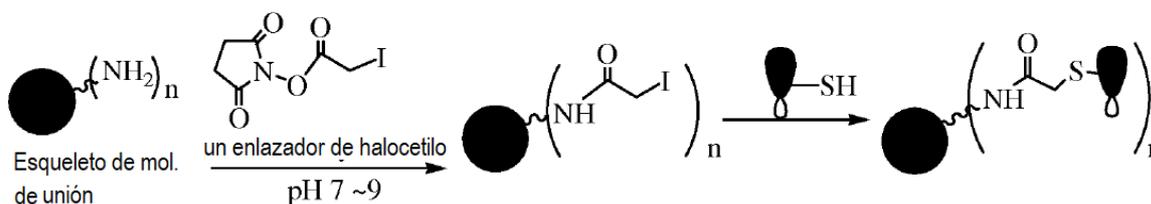
funcional reacciona con un conector SDA primero y luego por reacción fotoactiva de una molécula de unión con luz UV de onda larga (330-370 nm). Los reticuladores SDA pueden ser escindibles (con un enlace disulfuro en el interior, como un conector SDAD).



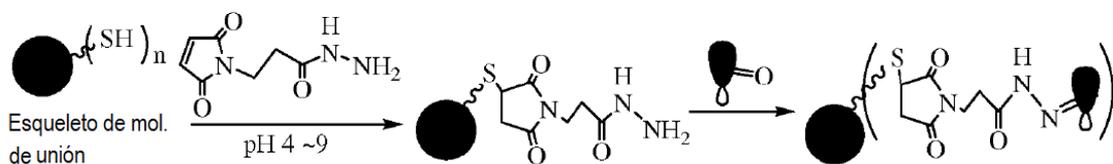
- 5 En la modificación del enlace éster/azida de NHS, el éster NHS del conector reacciona con un grupo amina primaria de una cadena principal de molécula de unión en regulador de pH 6-9 para formar una amida estable. Luego, un grupo alquínilo en un péptido más específico o una proteína u otra molécula funcional reacciona a la azida en el otro lado del conector a través de la cicloadición Azida-Alquino de Huisgen para formar un enlace 1,2,3-triazol (química de clic). Además, el éster NHS del enlazador reacciona con un grupo amina primario de una molécula funcional en regulador de pH 6-9 para formar una amida estable. Luego, un grupo alquínilo que se une en una molécula de unión reacciona a la azida en el otro lado del conector a través de la cicloadición Azida-Alquino de Huisgen para formar un enlace 1,2,3-triazol.



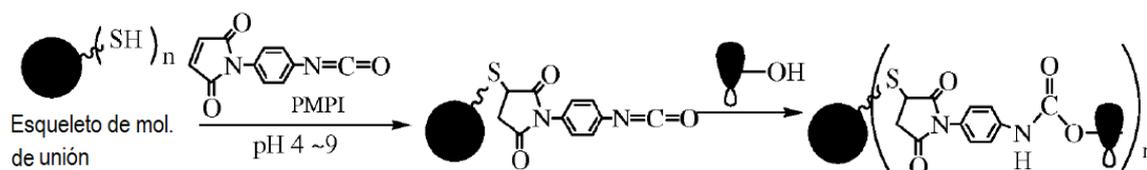
- 15 En la modificación del enlace amina a sulfhidrilo, el éster NHS del enlazador reacciona con un grupo amina primaria de una cadena principal de molécula de unión en regulador de pH 6-9 para formar un enlace amida estable. Luego, un sulfhidrilo en un péptido más específico o una proteína u otra molécula funcional reacciona a la maleimida, o piridilditiol, o haloacetilo en el otro lado del conector de amina a sulfhidrilo a pH 4.5~8.5 para formar un tioéter o un enlace disulfuro. La conjugación con el enlazador de amina a sulfhidrilo puede ser de diferentes órdenes. Por ejemplo, un grupo amina de una molécula funcional se puede hacer reaccionar con el enlazador para formar un enlace amida primero, luego mediante reacción con un sulfhidrilo en una molécula de unión. También se puede hacer reaccionar un grupo sulfhidrilo de una molécula funcional con el enlazador para formar un tioéter o un enlace disulfuro a un pH de 4.5~7 primero, luego mediante reacción con un grupo amina en una molécula de unión a pH 6~9 para formar un enlace amida.



- 25 En la modificación del enlace sulfhidrilo a carbohidrato, el grupo sulfhidrilo de una molécula de unión se puede hacer reaccionar con la maleimida o el piridilditiol en el conector para formar un tioéter o un enlace disulfuro a pH 4.5~8 primero, luego un carbonilo (aldehído/cetona) en una molécula funcional reacciona con la hidrazida para formar un enlace de hidrazona. Además, el grupo sulfhidrilo en una molécula funcional puede reaccionar con el enlazador para formar un tioéter o un enlace disulfuro a pH 4.5~8 primero, luego por reacción con un carbohidrato, o un carbohidrato oxidado, o un grupo carbonilo (aldehído/cetona) en una molécula de unión forma un enlace de hidrazona.



En la modificación del enlace de hidroxilo a sulfhidrilo, el grupo sulfhidrilo de una molécula de unión se puede hacer reaccionar con la maleimida o el piridilditiol en el conector para formar un enlace tioéter o disulfuro a pH 6~8 primero, luego un grupo hidroxilo en una molécula funcional reacciona con el isocianato en el conector para formar un enlace carbamato a pH 8~9. Además, el grupo sulfhidrilo en una molécula funcional puede reaccionar con el conector para formar un tioéter o un enlace disulfuro a pH 6~8 primero, luego, por reacción con un hidroxilo en una molécula de unión, formar un enlace carbamato a pH 8 ~9.



En otro aspecto más de la divulgación, la producción de anticuerpos usados en la presente divulgación implica procedimientos in vivo o in vitro o combinaciones de los mismos. Los métodos para producir anticuerpos anti-péptidos policlonales anti-receptores son bien conocidos en la técnica, como en la Patente de los Estados Unidos No.4,493,795 (a Nestor et al). Un anticuerpo monoclonal se produce típicamente fusionando células de mieloma con las células del bazo de un ratón que ha sido inmunizado con el antígeno deseado (Köhler, G.; Milstein, C. (1975). Nature 256: 495-497). Los procedimientos detallados se describen en "Antibodies--A Laboratory Manual", Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1988). Particularmente, los anticuerpos monoclonales se producen inmunizando ratones, ratas, hámsteres o cualquier otro mamífero con el antígeno de interés, como la célula objetivo intacta, los antígenos aislados de la célula objetivo, el virus completo, el virus completo atenuado y las proteínas virales. Los esplenocitos se fusionan típicamente con células de mieloma usando polietilenglicol (PEG) 6000. Los híbridos fusionados se seleccionan por su sensibilidad a HAT (hipoxantina-aminopterina-timina). Los híbridos que producen un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de esta divulgación se identifican por su capacidad para inmunorreaccionar con receptores específicos o inhibir la actividad del receptor en las células diana.

Se puede producir un anticuerpo monoclonal usado en la presente divulgación iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutriente que contiene un hibridoma que secreta moléculas de anticuerpo de la especificidad de antígeno apropiada. El cultivo se mantiene en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para que el hibridoma secrete las moléculas de anticuerpo en el medio. Luego se recoge el medio que contiene el anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo pueden aislarse luego mediante técnicas bien conocidas, tales como el uso de cromatografía de afinidad de proteína A; cromatografías aniónicas, catiónicas, hidrofóbicas o de tamaño exclusivo (particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A y cromatografía en columna de tamaño); centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

Los medios útiles para la preparación de estas composiciones son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente e incluyen medios de cultivo sintéticos. Un medio sintético ejemplar es el medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco et al., Virol. 8: 396 (1959)) suplementado con 4.5 gm/l de glucosa, 20 mm de glutamina, suero de ternera fetal al 20% y con un agente antiespumante, tal como copolímero de bloque de polioxi-etileno-polioxi-propileno.

Además, también se pueden crear líneas celulares productoras de anticuerpos mediante técnicas distintas a la fusión, como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico o la transfección con un oncovirus, como el virus de Epstein-Barr (EBV, también llamado herpesvirus 4 humano (HHV-4)) o herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV). Ver, Pat. Nos. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,451,570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; 4,493,890. También se puede producir un anticuerpo monoclonal a través de un péptido o péptidos antirreceptor que contiene el terminal carboxilo como se describe bien conocido en la técnica. Véase Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 80: 4949-4953 (1983); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 82: 178-182 (1985); Lei et al. Biochemistry 34(20): 6675-6688, (1995). Típicamente, el péptido antirreceptor o un análogo peptídico se usa solo o conjugado con un vehículo inmunogénico, como el inmunógeno para producir anticuerpos monoclonales de péptido antirreceptor.

También hay una serie de otras técnicas bien conocidas para hacer anticuerpos monoclonales como moléculas de unión en esta divulgación. Particularmente útiles son los métodos para fabricar anticuerpos completamente humanos. Un método es la tecnología de visualización de fagos que puede usarse para seleccionar un rango de anticuerpos humanos que se unen específicamente al antígeno usando métodos de enriquecimiento de afinidad. La presentación de fagos se ha descrito a fondo en la literatura y la construcción y selección de bibliotecas de presentación de fagos son bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, Dente et al, Gene. 148(1): 7-13 (1994); Little et al., Biotechnol Adv. 12(3): 539-55 (1994); Clackson et al., Nature 352: 264-628 (1991); Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989).

Los anticuerpos monoclonales derivados por la técnica de hibridoma de otra especie que no sea humana, como el ratón, pueden humanizarse para evitar anticuerpos humanos anti-ratón cuando se infunden en humanos. Entre los métodos más comunes de humanización de los anticuerpos se encuentran el injerto de región determinante de complementariedad y la reaparición en superficie. Estos métodos se han descrito ampliamente, Véase por ejemplo.

Pat. 5,859,205 y 6,797,492; Liu et al., *Immunol Rev.* 222: 9-27 (2008); Almagro et al., *Front Biosci.* 1; 13: 1619-33 (2008); Lazar et al., *Mol Immunol.* 44(8): 1986-98 (2007); Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos.* 103(10): 3557-62 (2006).

5 Los anticuerpos completamente humanos también se pueden preparar inmunizando ratones transgénicos, conejos, monos u otros mamíferos, que transportan grandes porciones de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina humana, con un inmunógeno. Ejemplos de tales ratones son: el Xenomouse (Abgenix, Inc.), el HuMAb-Mouse (Medarex/BMS), el VelociMouse (Regeneron), Véase también las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,596,541, 6,207,418, 6,150,584, 6,111,166, 6,075,181, 5,922,545, 5,661,016, 5,545,806, 5,436,149 y 5,569,825. En la terapia humana, las regiones variables murinas y las regiones constantes humanas también pueden fusionarse para construir
10 llamados "anticuerpos quiméricos" que son considerablemente menos inmunogénicos en el hombre que los mAbs murinos (Kipriyanov et al, *Mol Biotechnol.* 26: 39-60 (2004); Houdebine, *Curr Opin Biotechnol.* 13: 625-9 (2002)). Además, la mutagénesis dirigida al sitio en la región variable de un anticuerpo puede dar como resultado un anticuerpo con mayor afinidad y especificidad por su antígeno (Brannigan et al., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3: 964-70, (2002)); Adams et al., *J. Immunol Methods.* 231: 249-60 (1999)) y el intercambio de regiones constantes de un mAb puede mejorar su capacidad para mediar en las funciones efectoras de unión y citotoxicidad.

Los anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de células malignas también pueden obtenerse comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica los anticuerpos inmuno-específicos para un antígeno de células malignas puede obtenerse comercialmente, por ejemplo, de la base de datos GenBank o una base de datos similar, las publicaciones de la literatura, o mediante clonación y secuenciación de rutina.

Además de un anticuerpo, un péptido o proteína que se une/bloquea/direcciona o de alguna otra manera interactúa con los epítomos o receptores correspondientes en una célula objetivo puede usarse como molécula de unión. Estos péptidos o proteínas podrían ser cualquier péptido o proteína aleatorio que tenga afinidad por los epítomos o los receptores correspondientes y no necesariamente tienen que ser de la familia de las inmunoglobulinas. Estos péptidos pueden aislarse mediante técnicas similares a las de los anticuerpos frente a fagos (Szardenings, *J Recept Signal Transduct Res.* 2003; 23(4): 307-49). El uso de péptidos de tales bibliotecas de péptidos aleatorios puede ser similar a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Las moléculas de unión de péptidos o proteínas pueden conjugarse o unirse a moléculas o materiales grandes, tales como, pero sin limitación, una albúmina, un polímero, un liposoma, una nanopartícula, dendrímeros, siempre que dicha unión permita péptido o proteína para retener su especificidad de unión a antígeno.

Ejemplos de anticuerpos utilizados para la conjugación de agentes antimitóticos en esta prevención para el tratamiento del cáncer, las enfermedades autoinmunes y las enfermedades infecciosas incluyen, entre otros, 3F8 (anti-GD2), Abagovomab (anti CA-125), Abciximab (anti CD41 (integrina alfa-IIb), Adalimumab (anti-TNF-a), Adecatumumab (anti-EpCAM, CD326), Afelimomab (anti-TNF-a); Afutuzumab (anti-CD20), Alacizumab pegol (anti-VEGFR2), ALD518 (anti-IL-6), Alemtuzumab (Campath, MabCampath, anti-CD52), Altumomab (anti-CEA), Anatumomab (anti-TAG-72), Anrukinzumab (IMA-638, anti-IL-13), Apolizumab (anti-HLA-DR), Arcitumomab (anti-CEA), Aselizumab (anti-L-selectina (CD62L), Atlizumab (tocilizumab, Actemra, RoActemra, receptor anti-IL-6), Atorolimumab (factor anti-Rhesus), Bapineuzumab (anti-beta amiloide), Basiliximab (Simulect, antiCD25 (cadena α del receptor de IL-2), Bavixumab (anti-fosfatidilserina), Bectumomab (LymphoScan, anti-CD22), Belimumab (Benlysta, LymphoStat-B, anti-BAFF), Benralizumab (anti-CD125), Bertilimumab (anti-CCL11 (eotaxin-1)), Besilesomab (Scintimun, antígeno relacionado con CEA), Bevacizumab (Avastin, anti-VEGF-A), Biciromab (FibriScint, cadena beta anti-fibrina II), Bivatuzumab (anti -CD44 v6), Bliatumomab (BiTE, anti-CD19), Brentuximab (cAC10, anti-CD30 TNFRSF8), Briakinumab (anti-IL-12, IL-23) Canakinumab (Ilaris, anti-IL-1), Cantuzumab (C242 , anti-CanAg), Capromab, Catumaxomab (Removab, anti-EpCAM, anti-CD3), CC49 (anti-TAG-72), Cedelizumab (anti-CD4), Certolizumab pegol (Cimzia anti-TNF-a), Cetuximab (Erbix, IMC-C225, anti-EGFR), Citatuzumab bogatox (anti-EpCAM), Cixutumumab (anti-IGF-1), Clenoliximab (anti-CD4), Clivatuzumab (anti-MUCI), Conatumumab (anti-TRAIL-R2), CR6261 (hemaglutinina anti-influenza A), Dacetuzumab (anti-CD40), Daclizumab (Zenapax, anti-CD25 (cadena α del receptor de IL-2)), Daratumumab (anti-CD38 (ADP ribosa hidrolasa cíclica), Denosumab (Prolia, anti-RANKL), Detumomab (célula anti-linfoma B), Dorlimomab, Dorlixizumab, Ecomeximab (gangliósido anti-GD3), Eculizumab (Soliris, anti-C5), Edobacomab (anti-endotoxina), Edrecolomab (Panorex, MAb17-1A, anti-EpCAM), Efalizumab (Raptiva, anti-LFA-1 (CD11a), Efungumab (Mycograb, anti-Hsp90), Elotuzumab (anti-SLAMF7), Elsilimomab (anti-IL-6), Enlimomab pegol (anti-ICAM-1 (CD54)), Epitumomab (anti-episialin), Epratuzumab (anti-CD22), Erlizumab (anti-ITGB2 (CD18)), Ertumaxomab (Rexomon, anti-HER2/neu, CD3), Etaracizumab (Abegrin, anti-integrina $\alpha_v\beta_3$), Exbivirumab (antígeno de superficie anti-hepatitis B), Fanolesomab (NeutroSpec, anti-CD15), Faralimomab (anti-receptor de interferón), Farletuzumab (receptor 1 anti-folato), Felvizumab (virus sincicial respiratorio), Fezakinumab (anti-IL-22), Figitumumab (receptor anti-IGF-1), Fontolizumab (anti-IFN- γ), Foravirumab (glucoproteína contra el virus de la rabia), Fresolimumab (anti-TGF- β), Galiximab (anti-CD80), Gantenerumab (anti-beta amiloide), Gavilimomab (anti-CD147 (basigin)), Gemtuzumab (anti-CD33), Girentuximab (anhidrasa anticarbónica 9), Glembatumumab (CR011, anti-GPNMB), Golimumab (Simponi, anti-TNF- α), Gomiliximab (anti-CD23 (receptor de IgE)), Ibalizumab (anti-CD4), Ibritumomab (anti -CD20), Igovomab (Indimacis-125, anti-CA-125), Imciromab (Mioscint, miosina anti-cardíaca), Infiximab (Remicade, anti-TNF-a), Intetumumab (anti-CD51), Inolimomab (anti-CD25 (cadena α del receptor de IL-2)), Inotuzumab (anti-CD22), Ipilimumab (anti-CD152), Iratumumab (anti-CD30 (TNFRSF8)), Keliximab (anti-CD4), Labetuzumab (CEA-Cide, anti- CEA), Lebrizumab (anti-IL-13), Lemalesomab (anti-NCA-90 (antígeno de

- granulocitos), Lerdelimumab (anti-TGF beta 2), Lexatumumab (anti-TRAIL-R2), Libivirumab (superficie anti-hepatitis B antígeno), Lintuzumab (anti-CD33), Lucatumumab (anti-CD40), Lumiliximab (anti-CD23 (receptor de IgE), Mapatumumab (anti-TRAIL-R1), Maslimomab (anti-receptor de células T), Matuzumab (anti-EGFR), Mepolizumab (Bosatria, anti-IL-5), Metelimumab (anti-TGF beta 1), Milatuzumab (anti- CD74), Minretumomab (anti-TAG-72),
- 5 Mitumomab (BEC-2, anti-GD3 gangliósido), Morolimumab (factor anti-Rhesus), Motavizumab (Numax, virus sincial antirrespiratorio), Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3, anti-CD3), Nacolomab (anti-C242), Naptumomab (anti-5T4), Natalizumab (Tysabri, anti-integrina α_4), Nebacumab (anti-endotoxina), Necitumumab (anti-EGFR), Nerelimomab (anti-TNF-a), Nimotuzumab (Theracim, Theraloc, anti-EGFR), Nofetumomab, Ocrelizumab (anti-CD20), Odulimomab (Afolimomab, anti-LFA-1 (CD11a)), Ofatumumab (Arzerra, anti-CD20), Olaratumab (anti-PDGF)-R α), Omalizumab (Xolair, región Fc anti-IgE), Oportuzumab (anti-EpCAM), Oregovomab (OvaRex, anti-CA-125), Otelixizumab (anti-CD3), Pagibaximab (ácido anti-lipoteicoico), Palivizumab (Synagis, Abbosynagis, virus sincial antirrespiratorio), Panitumumab (Vectibix, ABX-EGF, anti-EGFR), Panobacumab (anti-Pseudomonas aeruginosa), Pascolizumab (anti-IL-4), Pemtumomab (Theragyn, anti-MUCI), Pertuzumab (Omnitarg, 2C4, anti-HER2/neu), Pexelizumab (anti-C5), Pintumomab (antígeno de adenocarcinoma), Priliximab (anti-CD4), Pritumumab (anti-vimentina), PRO 140 (anti-CCR5), Racotumomab (1E10, ácido anti-(N-glicolilneuramínico) (NeuGc, NGNA)-gangliósidos GM3)), Rafivirumab (glucoproteína contra el virus de la rabia), Ramucirumab (anti-VEGFR2), Ranibizumab (Lucentis, anti-VEGF-A), Raxibacumab (toxina anti-ántrax, antígeno protector), Regavirumab (glucoproteína B anti-citomegalovirus), Reslizumab (anti-IL-5), Rilotumumab (anti-HGF), Rituximab (MabThera, Rituxanmab, anti-CD20), Robatumumab (receptor anti-IGF-1), Rontalizumab (anti-IFN-a), Rovelizumab (LeukArrest , anti-CD11, CD18), Ruplizumab (Antova, anti-CD154 (CD40L)), Satumomab (anti-TAG-72), Sevirumab (anti-citomegalovirus), Sibrotuzumab (anti-FAP), Sifalimomab (anti-IFN-a), Siltuximab (anti-IL-6), Siplizumab (anti-CD2), (Smart) MI95 (anti-CD33), Solanezumab (anti-beta amiloide), Sonpecizumab (anti-esfingosina-1-fosfato), Sontuzumab (anti-episialina), Stamulumab (anti-miostatina), Sulesomab (LeukoScan, (anti-NCA-90 (antígeno de granulocitos), Tacatuzumab (anti-alfa-fetoproteína), Tadocizumab (anti-integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), Talizumab (anti-IgE), Tanezumab (anti-NGF), Taplitumomab (anti-CD19),
- 25 Tefibazumab (Aurexis, (anti- factor de agrupamiento A), Telimomab, Tenatumomab (anti-tenascina C), Teneliximab (anti-CD40), Teplizumab (anti-CD3), TGN1412 (anti-CD28), Ticilimumab (Tremelimumab, (anti-CTLA-4), Tigatuzumab (anti-TRAIL-R2), TNX-650 (anti-IL-13), Tocilizumab (Atlizumab, Actemra, RoActemra, (receptor anti-IL-6), Toralizumab (anti-CD154 (CD40L)), Tositumomab (anti-CD20), Trastuzumab (Herceptin, (anti-HER2/neu), Tremelimumab (anti-CTLA-4), Tucotuzumab celmoleucina (anti-EpCAM), Tuvirumab (anti-hepatitis B virus),
- 30 Urtoxazumab (anti-Escherichia coli), Ustekinumab (Stelara, anti-IL-12, IL-23), Vapaliximab (anti-AOC3 (VAP-1)), Vedolizumab, (anti-integrina $\alpha_4\beta_7$), Veltuzumab (anti-CD20), Vepalimomab (anti-AOC3 (VAP-1), Visilizumab (Nuvion, anti-CD3), Vitaxin (integrina anti-vascular avb3), Volociximab (anti-integrina $\alpha_5\beta_1$), Votumumab (HumaSPECT, antígeno antitumoral CTAA16.88), Zalutumumab (HuMax-EGFr, (anti-EGFR), Zanolimumab (HuMax-CD4, anti-CD4), Ziralimumab (anti-CD147 (basigina)), Zolimumab (anti-CD5), Etanercept (Enbrel®), Alefacept (Amevive®), Abatacept (Orencia®), Rilonacept (Arcalyst), 14F7 [anti-IRP-2 (Proteína reguladora de hierro 2)], 14G2a (gangliósido anti-CD2 , de Nat. Cancer Inst. para melanoma y tumores sólidos), J591 (anti-PSMA, Weill Cornell Medical School para cánceres de próstata), 225.28S [anti-HMW-MAA (antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular), Sorin Radiofarmaci S.R.L. (Milán, Italia) para melanoma], COL-1 (anti-CEACAM3, CGM1, de Nat. Cancer Inst. USA para cáncer colorrectal y gástrico), CYT-356 (Oncoltad®, para cáncer de próstata), HNK20 (OraVax Inc. para el virus sincial respiratorio),
- 40 ImmuRAIT (de Immunomedics for NHL), Lym-1 (anti-HLA-DRIO, Peregrine Pharm. For Cancer), MAK-195F [anti-TNF (factor de necrosis tumoral; TNFA, TNF-alfa; TNFSF2), de Abbott/Knoll para shock tóxico por sepsis], MEDI-500 [T10B9, anti-CD3, TP $\alpha\beta$ (receptor de células T alfa/beta), complejo, de MedImmune Inc para la enfermedad de injerto contra huésped], RING SCAN [anti-TAG 72 (tumor asociado glicoproteína 72), de Neoprobe Corp. para cánceres de mama, colon y recto], avidicina (anti-EPCAM (molécula de adhesión de células epiteliales), anti-TACSTD1 (transductor de señal de calcio asociado a tumor 1), anti-GA733-2 (tumor gastrointestinal -asociada 2), anti-EGP-2 (glicoproteína epitelial 2), anti-KSA; antígeno KS1/4; M4S; antígeno tumoral 17-1A; CD326, de NeoRx Corp. para cáncer de colon, ovario, próstata y NHL] ; LymphoCide (Immunomedics, NJ), Smart ID10 (Protein Design Labs), Oncolym (Techniclone Inc, CA), Allomune (BioTransplant, CA), anti-VEGF (Genentech, CA); CEAcide (Immunomedics, NJ), IMC-1C11 (Sistemas ImClone, NJ) y Cetuximab (ImClone, NJ).
- 50 Otros anticuerpos como ligandos de unión incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra los siguientes antígenos: aminopeptidasa N (CD13), anexina A1, B7-H3 (CD276, varios tipos de cáncer), CA125, CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), alfafetoproteína (carcinomas), CA242, fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), antígeno prostático específico (próstata), fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de crecimiento epidérmico (carcinomas), CD2 (enfermedad de Hodgkin, linfoma de NHL, mieloma múltiple), CD3 épsilon (linfoma de células T, pulmón, mama, gástrico, cánceres de ovario, enfermedades autoinmunes, ascitis maligna), CD19 (célula B tumores malignos), CD20 (linfoma no Hodgkin), CD22 (leucemia, linfoma, mieloma múltiple, LES), CD30, CD33, CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma, mieloma múltiple, leucemia), CD51 (melanoma metastásico, sarcoma), CD52, CD56 (cánceres de pulmón de células pequeñas, cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel y el tumor líquido, mieloma múltiple), CD66e (cánceres), CD70 (carcinoma metastásico de células renales y linfoma no Hodgkin), CD74 (mieloma múltiple), CD80 (linfoma), CD98 (cánceres), mucina (carcinomas), CD221 (tumores sólidos), CD227 (mama, cáncer de ovario), CD262 (NSCLC y otros cánceres), CD309 (cáncer de ovario), CD326 (tumores sólidos), CEACAM3 (colorrectal, cáncer gástrico), CEACAM5 (antígeno carcinoembrionario; CEA, CD66e) (cáncer de mama, colorrectal y de pulmón), DLL4 (Δ -like-4), EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidérmico, varios tipos de cáncer), CTLA4 (melanoma), CXCR4 (CD184, Hemooncología, tumores sólidos),
- 65 Endoglina (CD105, tumores sólidos), EPCAM (molécula de adhesión de células epiteliales, vejiga, cabeza, cuello,

colon, próstata de NHL y cánceres de ovario), ERBB2 (receptor de factor de crecimiento epidérmico 2; pulmón, mama, cánceres de próstata), FCGR1 (autoinmune enfermedades), FOLR (receptor de folato, cánceres de ovario), gangliósido GD2 (cánceres), G-28 (un antígeno de superficie celular gluvolípidio, melanoma), idiotipo GD3 (cánceres), proteínas de choque térmico (cánceres), HER1 (cáncer de pulmón, cáncer de estómago), HER2 (cánceres de mama, pulmón y ovario), FILA-DR10 (NHL), HLA-DRB (NHL, leucemia de células B), gonadotropina coriónica humana (carcinoma), IGF1R (receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina, tumores sólidos, cánceres de sangre), receptor de IL-2 (receptor de interleucina 2, leucemia de células T y linfomas), IL-6R (receptor de interleucina 6, mieloma múltiple, AR, enfermedad de Castleman, IL6 tumor dependiente), Integrinas ($\alpha\beta3$, $\alpha5\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha11\beta3$, $\alpha5\beta5$, $\alpha\nu\beta5$, para varios tipos de cáncer), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE 4 (carcinomas), receptor anti-transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MS4A1 (miembro 1 de la subfamilia A de 4 dominios que abarca la membrana, linfoma de células B no Hodgkin, leucemia), MUC1 o MUC1-KLH (mama, ovario, cuello uterino, bronquio y cáncer gastrointestinal), MUC16 (CA125) (cánceres de ovario), CEA (colorrectal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), MPG (melanoma), MS4A1 (subfamilia A de 4 dominios que abarca la membrana, cánceres de pulmón de células pequeñas, NHL), Nucleolina, Producto oncogénico neu (carcinomas), P21 (carcinomas), Paratope de anti-(ácido N-glicolilneuramínico, cáncer de mama, Melanoma), Fosfatasa alcalina testicular tipo PLAP (cáncer de ovario, testicular), PSMA (tumores de próstata), PSA (próstata), ROBO4, TAG 72 (glicoproteína 72 asociada a tumor, AML, gástrico, colorrectal, cáncer de ovario), proteína transmembrana de células T (cáncer), Tie (CD202b), TNFRSF10B (miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 10B, cánceres), TNFRSF13B (miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 13B, mieloma múltiple, NHL, otros cánceres, AR y LES), TPBG (glucoproteína trofoblástica, carcinoma de células renales), TRAIL-R1 (Receptor 1 de ligando inductor de necrosis tumoral, linfoma, NHL, colorrectal, cáncer de pulmón), VCAM-1 (CD106, melanoma), VEGF, VEGF-A, VEGF-2 (CD309) (varios tipos de cáncer). Se han revisado algunos otros antígenos asociados a tumores reconocidos por anticuerpos (Gerber, et al, mAbs 1:3, 247-253 (2009); Novellino et al, Cancer Immunol Immunother. 54(3), 187-207 (2005). Franke, et al, Cancer Biother Radiopharm. 2000, 15, 459-76). Muchos otros antígenos son: muchos otros grupos de diferenciaciones (CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD12w, CD14, CD15, CD16, CDw17, CD18, CD21, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD31, CD32, CD34, CD35, CD36, CD37, CD41, CD42, CD43, CD44, CD45, CD46, CD47, CD48, CD49b, CD49c, CD53, CD54, CD55, CD58, CD59, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD68, CD69, CD71, CD72, CD79, CD79a, CD79b, CD81, CD82, CD83, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD95, CD96, CD100, CD103, CD105, CD106, CD109, CD117, CD120, CD127, CD133, CD134, CD135, CD138, CD141, CD142, CD143, CD144, CD147, CD151, CD152, CD154, CD156, CD158, CD163, CD166, CD168, CD184, CDw186, CD195, CD202 (a, b), CD209, CD235a, CD271, CD303, CD304), Apo2, ASLG659, BMPR1B(receptor de proteína morfogenética ósea), CRIPTO, anexina A1, nucleocolina, endoglina (CD105), ROBO4, amino-peptidasa N, 4 tipo Δ (DLL4), VEGFR-2 (CD309), CXCR4 9CD184), Tie2, B7-H3, WT1, MUC1, LMP2, HPV E6 E7, EGFRVIII, HER-2/neu, Idiotipo, MAGE A3, p53 no mutante, NY-ESO-1, GD2, CEA, MelanA/MART1, Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia de portadores de solutos 34, miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b), mutante Ras, gp100, mutante p53, proteinasa 3 (PR1), bcr-abl, factores de crecimiento derivados del tetracarcinoma), receptores EphA, receptores EphB, EGFr, EGFRVIII, ETBR (Endotelina), HER2/neu, HER3, HLA-DOB (antígeno de la molécula la del MHC clase II), integrinas, IRTA2, MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina), cripto, Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm42015, SEMA5B, SEMAG, semaforina 5 bHlog, dominio de sdema, siete repeticiones de trombospondina, dominio citoplasmático), PSCA, STEAP1 (seis antígenos epiteliales de transmembrana de próstata) y STEAP2 (HGNC 8639, IPCA-1, PCANP1, STAMP1, STEAP2, STMP, próstata) Tirosinasa, Survivina, hTERT, puntos de ruptura de la translocación del sarcoma, EphA2, PAP, ML-IAP, AFP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisialico, MYCN, RhoC, TRP-2, GD3, Fucosil GM1, Mesotelina, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, anhidrasa carbónica IX, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, Legumaína, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR- β , MAD-CT-2, antígeno relacionado con Fos 1.

En otra realización específica, los conjugados de molécula de unión a agente antimitótico de la divulgación se usan de acuerdo con las composiciones y métodos de la divulgación para el tratamiento de cánceres. Los cánceres incluyen, entre otros, carcinoma adrenocortical, cáncer anal, cáncer de vejiga, tumor cerebral (adulto, glioma del tronco encefálico, infancia, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primarios supratentoriales y pineales, vía visual e hipotálamo Glioma), cáncer de mama, tumor carcinoide, gastrointestinal, carcinoma de primario desconocido, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de conducto biliar extrahepático, familia de tumores de Ewings (PNET), tumor extracraneal de células germinales, cáncer ocular, melanoma intraocular, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor de células germinales, tumor trofoblástico extragonadal, gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hipofaringe, carcinoma de células de islote, cáncer de riñón (cáncer de células renales), cáncer de laringe, leucemia (linfoblástica aguda, mielóide aguda, linfocítico crónico, mielógeno crónico, células pilosas), cáncer de labio y cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (células no pequeñas, células pequeñas, linfoma (relacionado con el SIDA, sistema nervioso central, células T cutáneas, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin, mesotelioma maligno, melanoma, carcinoma de células de Merkel, cáncer de cuello escamoso metastásico con tumor primario oculto, mieloma múltiple y otras neoplasias celulares del plasma, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, trastornos mieloproliferativos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer ovárico (tumor epitelial de células germinales, tumor de bajo potencial maligno), cáncer de páncreas (carcinoma exocrino de células de los islotes), cáncer de seno paranasal y cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene,

cáncer de feocromocitoma, cáncer de hipófisis, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, rabdomiosarcoma, cáncer de recto, cáncer de células renales (cáncer de riñón), pelvis renal y uréter (células transicionales), cáncer de glándula salival, Síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de piel (linfoma cutáneo de células T, sarcoma de Kaposi, melanoma), cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, cáncer de estómago, cáncer de testículo, timoma (maligno), cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer de útero (sarcoma), cáncer inusual de la infancia, cáncer vaginal, cáncer de vulva, tumor de Wilms.

En otra realización específica, los conjugados de molécula de unión a agente antimitótico de la divulgación se usan de acuerdo con las composiciones y métodos de la divulgación para el tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmune. Las enfermedades autoinmunes incluyen, pero no están limitadas, Aclorhidra Autoinmune Activa, hepatitis crónica, Encefalomiелitis diseminada aguda, leucoencefalitis hemorrágica aguda, Enfermedad de Addison, Agammaglobulinemia, Alopecia areata, Esclerosis lateral amiotrófica, espondilitis anquilosante, Nefritis anti-GBM/TBM, Síndrome antifosfolípido, Síndrome antisintetasa, Artritis, Alergia atópica, Dermatitis atópica, Anemia aplásica autoinmune, miocardiopatía autoinmune, Anemia hemolítica autoinmune, Hepatitis autoinmune, Enfermedad autoinmune del oído interno, Síndrome linfoproliferativo autoinmune, neuropatía periférica autoinmune, pancreatitis autoinmune, síndrome poliendocrino autoinmune tipos I, II y III, dermatitis autoinmune por progesterona, púrpura trombocitopénica autoinmune, uveítis autoinmune, enfermedad de Balo/esclerosis concéntrica de Balo, síndrome de Bechets, enfermedad de Berger, encefalitis de Bickerstaff, síndrome de Blau, penfigoide ampollar, enfermedad de Castleman, enfermedad de Chagas, síndrome de disfunción inmune por fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, ostiomielitis multifocal crónica recurrente, enfermedad de Lyme crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, enfermedad celíaca, síndrome de Cogan, Enfermedad de aglutinina fría, deficiencia del componente 2 del complemento, arteritis craneal, síndrome CREST, Enfermedad de Crohn (un tipo de enfermedad intestinal inflamatoria idiopática), Síndrome de Cushing, Angiitis leucocitoclástica cutánea, Enfermedad de Deigo, Enfermedad de Dercum, Dermatitis herpetiforme, Dermatomiositis, Diabetes mellitus tipo 1, Esclerosis sistémica cutánea difusa, Síndrome de Dressler, Lupus eritematoso discoide, Eczema, Endometriosis, Artritis relacionada con entesitis, Fascitis eosinofílica, Epidermólisis ampollosa adquirida, Eritema nodoso, Crioglobulinemia mixta esencial, Síndrome de Evan's, Fibrodisplasia osificante progresiva, Fibromialgia, Fibromiositis, Alveolitis fibrosante, gastritis, penfigoide gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestacional, Hidradenitis supurativa, síndrome de Hughes (ver síndrome antifosfolípido), Hipogammaglobulinemia, enfermedades desmielinizantes inflamatorias idiopáticas, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ver púrpura trombocitopénica autoinmune), nefropatía por IgA (también enfermedad de Berger), miositis por cuerpos de inclusión, polineuropatía desmielinizante inflamatoria, cistitis intersticial, Síndrome del intestino irritable, artritis idiopática juvenil, artritis asociado juvenil, enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad de IgA lineal (LAD), enfermedad de Lou Gehrig (también esclerosis lateral amiotrófica), hepatitis lupoidea, lupus eritematoso, síndrome de Majeed, enfermedad de Ménière, poliangeítis microscópica, síndrome de Miller-Fisher, Enfermedad mixta del tejido conectivo, morfea, enfermedad de Mucha-Habermann, síndrome de Muckle-Wells, mieloma múltiple, esclerosis múltiple, miastenia gravis, miositis, narcolepsia, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), neuromiotonía, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de opoclonio mioclono, tiroides Ord, Reumatismo palindrómico, PANDAS (Trastornos neuropsiquiátricos autoinmunes pediátricos asociados con estreptococo), degeneración cerebelosa paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, pars planitis, pénfigo, pénfigo vulgaris, anemia perniciosa, Encefalomiелitis perivenosa, síndrome POEMS, poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, Polimiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, neuropatía inflamatoria progresiva, psoriasis, artritis psoriásica, pioderma gangrenoso, aplasia pura de glóbulos rojos, encefalitis de Rasmussen, fenómeno de Raynaud, policondritis recurrente, síndrome de Reiter, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retriperitoneal, artritis reumática, Fiebre reumatoide, Sarcoidosis, Esquizofrenia, Síndrome de Schmidt, Síndrome de Schnitzler, Escleritis, Esclerodermia, Síndrome de Sjögren, Espondiloartropatía, Síndrome de sangre pegajosa, Enfermedad de Still, Síndrome de persona rígida, Endocarditis bacteriana subaguda, Síndrome de Susac, Síndrome de Sweet, corea de Sydenham, oftalmia simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal (arteritis de células gigantes), síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa (un tipo de enfermedades inflamatorias intestinales idiopáticas), enfermedad del tejido conectivo indiferenciado, espondiloartropatía indiferenciada, vasculitis, Vitiligo, Granulomatosis de Wegener, síndrome de Wilson, síndrome de Wiskott-Aldrich.

En otra realización específica, una molécula de unión usada para el conjugado para el tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmune incluye, pero no se limita a, anticuerpo anti-elastina; Abys contra el anticuerpo de células epiteliales; colágeno de membrana anti-sótano, Anticuerpo de proteína tipo IV; Anticuerpo antinuclear; ADN anti ds; Anti ss DNA, Anti Cardiolipin Anticuerpo IgM, IgG; anticuerpo anticeliaco; Anticuerpo anti-fosfolípido IgK, IgG; anticuerpo anti SM; Anticuerpo Anti Mitocondrial; Anticuerpo de tiroides; Anticuerpo microsomal, anticuerpo de células T; Anticuerpo de tiroglobulina, Anti SCL-70; Anti-Jo; Anti-U.1RNP; Anti-La/SSB; Anti SSA; Anti SSB; Anticuerpo Anti Células Peritales; Anti histonas; Anti RNP; C-ANCA; P-ANCA; Anti-centrómero; Anti-Fibrillarina, y anticuerpo Anti-GBM, Anticuerpo anti-ganglioside; Anticuerpo anti-desmogeína 3; Anticuerpo anti-p62; Anticuerpo anti-splOO; Anticuerpo anti-mitocondrial (M2); Anticuerpo del factor reumatoide; Anticuerpo anti-MCV; Anticuerpo anti-topoisomerasa; Anticuerpo citoplasmático antineutrófilo (cANCA).

En ciertas realizaciones preferidas, la molécula de unión para el conjugado en la presente divulgación, puede unirse a un receptor o un complejo de receptor expresado en un linfocito activado que está asociado con una enfermedad autoinmune. El receptor o complejo receptor puede comprender un miembro de la superfamilia del gen de inmunoglobulina (por ejemplo, CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1 o ICOS), una superfamilia de receptores de miembro TNF (por ejemplo, CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, INF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 y APO-3), una integrina, un receptor de citoquinas, un receptor de quimioquinas, una proteína de histocompatibilidad principal, una lectina (tipo C, tipo S o tipo I) o una proteína de control del complemento.

En otra realización específica, los ligandos de unión útiles que son inmunoespecíficos para un antígeno viral o microbiano son anticuerpos monoclonales humanizados o humanos. Como se usa en el presente documento, el término "antígeno viral" incluye, pero no se limita a, cualquier péptido viral, proteína de polipéptido (por ejemplo, gp120 de VIH, nef de VIH, glucoproteína RSV F, neuraminidasa del virus de la gripe, hemaglutinina del virus de la gripe, HTLVtax, glicoproteína del virus del herpes simple (por ejemplo, gB, gC, gD y gE) y antígeno de superficie de la hepatitis B) que es capaz de provocar una respuesta inmune. Como se usa en el presente documento, el término "antígeno microbiano" incluye, pero no se limita a, cualquier péptido, polipéptido, proteína, sacárido, polisacárido o molécula lipídica microbiana (por ejemplo, una bacteria, hongos, protozoos patógenos o polipéptidos de levadura que incluyen, por ejemplo, LPS y polisacárido capsular 5/8) que es capaz de provocar una respuesta inmune. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para la infección viral o microbiana incluyen, pero no se limitan a, Palivizumab, que es un anticuerpo monoclonal de virus sincicial anti-respiratorio humanizado para el tratamiento de la infección por VSR; PRO542, que es un anticuerpo de fusión CD4 para el tratamiento de la infección por VIH; Ostavir, que es un anticuerpo humano para el tratamiento del virus de la hepatitis B; PROTVIR, que es un anticuerpo IgG1 humanizado para el tratamiento del citomegalovirus; y anticuerpos anti-LPS.

Las conjugados de moléculas de unión-agente antimicrobiano de esta divulgación pueden usarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Estas enfermedades infecciosas incluyen, entre otras, infecciones por *Acinetobacter*, actinomicosis, enfermedad del sueño africana (tripanosomiasis africana), SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), amebiasis, anaplasmosis, ántrax, infección por *Arcanobacterium haemolyticum*, fiebre hemorrágica argentina, ascariasis, aspergilosis, Infección por astrovirus, babesiosis, infección por *Bacillus cereus*, neumonía bacteriana, vaginosis bacteriana, infección por *Bacteroides*, balantidiasis, infección por *Baylisascaris*, infección por el virus BK, piedra negra, infección por *Blastocystis hominis*, blastomicosis, fiebre hemorrágica boliviana, infección por *Borrelia*, botulismo (y botulismo infantil) Fiebre hemorrágica brasileña, brucelosis, infección por *Burkholderia*, úlcera de Buruli, infección por calicivirus (norovirus y sapovirus), campilobacteriosis, candidiasis (moniliasis; aftas), enfermedad por arañazo de gato, celulitis, enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), chancroide, varicela, clamidia, Infección por *Chlamydomydia pneumoniae*, cólera, cromoblastomicosis, clonorquiasis, infección por *Clostridium difficile*, coccidioidomicosis, fiebre por garrapatas de Colorado, resfriado común (rinofaringitis viral aguda; coryza aguda), Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Criptococosis, Criptosporidiosis, Larva migratoria cutánea, Ciclosporiosis, Cisticercosis, Infección de citomegalovirus, fiebre del dengue, Dientamoebiasis, Difteria, Difilobotriasis, Dracunculosis, fiebre hemorrágica del Ébola, equinococosis, erliquiosis, enterobiasis (infección por lombrices intestinales), infección por enterococos, infección por enterovirus, tífus epidémico, eritema infeccioso (quinta enfermedad), exantema subitum, fasciolopsiasis, fasciolosis, insomnio familiar fatal, filariasis, intoxicación alimentaria por *Clostridium perfringens*, infección amebiana de vida libre, infección por *Fusobacterium*, gangrena gaseosa, (mionecrosis clostridial), geotricosis, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, giardiasis, muermo, gnatostomiasis, gonorrea, granuloma inguinal (donovanosis), infección estreptocócica del grupo A, infección estreptocócica del grupo B, infección por *Haemophilus influenzae*, infección de manos y pies HFMD), Síndrome Pulmonar por Hantavirus, infección por *Helicobacter pylori*, síndrome urémico hemolítico, fiebre hemorrágica con síndrome renal, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, hepatitis E, herpes simple, histoplasmosis, infección por anquilostoma, infección por bocavirus humano, ehrlichiosis ewingii humana, anaplasmosis granulocítica humana, Infección por metapneumovirus humano, Ehrlichiosis monocítica humana, Infección por virus del papiloma humano, Infección por el virus de la parainfluenza humana, Himenolepiasis, Mononucleosis infecciosa del virus de Epstein-Barr (Mono), Influenza, Isosporiasis, enfermedad de Kawasaki, queratitis, infección por *Kingella kingae*, Kuru, fiebre de Lassa, legionelosis (enfermedad del legionario), legionelosis (fiebre de Pontiac), leishmaniasis, lepra, leptospirosis, listeriosis, enfermedad de Lyme (borreliosis de Lyme), filariasis linfática (Elefantiasis), Coriomeningitis linfocítica, malaria, fiebre hemorrágica de Marburgo, sarampión, melioidosis (enfermedad de Whitmore), meningitis, enfermedad meningocócica, metagonimiasis, microsporidiosis, molusco contagioso, paperas, tífus murino (tífus endémico), neumonía por micoplasma, Micetoma, miasis, conjuntivitis neonatal (oftalmia neonatorum), (Nueva) variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD, nvCJD), nocardiosis, oncocercosis (ceguera de los ríos), paracoccidioidomicosis (blastomicosis sudamericana), paragonimiasis, pasteurellosis, pediculosis capitis (piojos), pediculosis corporis (piojos del cuerpo), piojos del pubis (piojos púbicos, piojos del cangrejo), enfermedad inflamatoria pélvica, tosferina (tosferina), peste, infección neumocócica, Neumonía por *Pneumocystis*, neumonía, poliomielitis, infección por *Prevotella*, meningoencefalitis amebiana primaria, leucoencefalopatía multifocal progresiva, psitacosis, fiebre Q, rabia, fiebre por mordedura de rata, infección por el virus respiratorio sincicial, rinosporidiosis, infección por rinovirus, infección por *Rickettsia*, viruela *Rickettsial*, fiebre del valle del Rift, fiebre manchada de montaña, infección por rotavirus, rubéola, salmonelosis, SARS (síndrome respiratorio agudo severo), sarna, esquistosomiasis, sepsis, shigelosis (disentería bacilar), culebrilla (herpes zoster), viruela (variola), esporotricosis, intoxicación alimentaria estafilococos, infección por estafilococos, Estrongiloidiasis, sífilis,

teniasis, tétanos (mandíbula), tiña de la barba (picazón de barbero), tiña de la cabeza (tiña del cuero cabelludo), tiña del cuerpo (tiña del cuerpo), tiña de la nuca (tiña inguinal), tiña manuum, tiña nigra, Tiña del pie (pie de atleta), Tiña ungueal (Onicomia-cosis), Tiña versicolor (Pitiriasis versicolor), Toxocariasis (Larva migratoria ocular), Toxocariasis (Larva migratoria visceral), Toxoplasmosis, Triquinosis, Tricomoniasis, Tricuriasis (infección por Whipworm),
 5 Tuberculosis, Tularemia, infección por *Ureaplasma urealyticum*, Encefalitis equina venezolana, Fiebre hemorrágica venezolana, Neumonía vírica, Fiebre del Nilo Occidental, piedra blanca (Tinea blanca), Infección por *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersiniosis*, Fiebre amarilla, Cigomicosis.

Las moléculas de unión, los anticuerpos preferibles descritos en esta patente que están en contra de cepas patógenas incluyen, pero no están limitadas, *Acinetobacter baumannii*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces gerencseriae* y
 10 *Propionibacterium propionicum*, *Trypanosoma brucei*, VIH (virus de inmunodeficiencia humana), *Entamoeba histolytica*, *Anaplasma* genus, *Bacillus anthracis*, *Arcanobacterium haemolyticum*, virus Junin, *Ascaris lumbricoides*, *Aspergillus*, genus, familia *Astroviridae*, *Babesia* genus, *Bacillus cereus*, múltiples bacterias, *Bacteroides* genus, *Balantidium coli*, *Baylisascaris* genus, Virus BK, *Piedraia hortae*, *Blastocystis hominis*, *Blastomyces dermatitidis*, Virus Machupo, *Borrelia* genus, *Clostridium botulinum*, *Sabia*, *Brucella* genus, generalmente *Burkholderia cepacia* y otras especies de
 15 *Burkholderia*, *Mycobacterium ulcerans*, familia *Caliciviridae*, *Campylobacter* genus, generalmente *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, *Bartonella henselae*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* del grupo A, *Trypanosoma cruzi*, *Haemophilus ducreyi*, virus de *Varicella zoster* (VZV), *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomyces pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Clonorchis sinensis*, *Clostridium difficile*, *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*, virus de la fiebre de las garrapatas de Colorado, rinovirus, coronavirus, CJD prion, virus de la fiebre hemorrágica de
 20 Crimea-Congo, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium* genus, *Ancylostoma braziliense*; múltiples parásitos, *Cyclospora cayentanensis*, *Taenia solium*, citomegalovirus, virus del dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) - flavivirus, *Dientamoeba fragilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Diphyllobothrium*, *Dracunculus medinensis*, virus del Ébola, *Echinococcus* genus, *Ehrlichia* genus *Enterobius vermicularis*, *Enterococcus* genus, *Enterovirus* genus, *Rickettsia prowazekii*, *Parvovirus B19*, herpesvirus humano 6 y herpesvirus humano 7, *Fasciolopsis buski*, *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*, FFI prión, superfamilia Filarioidea, *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium* genus, *Clostridium perfringens*; otras especies de *Clostridium*, *Geotrichum candidum*, GSS prion, *Giardia intestinalis*, *Burkholderia mallei*, *Gnathostoma spinigerum* y *Gnathostoma hispidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Klebsiella granulomatis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterovirus*, principalmente virus Coxsackie A y *Enterovirus 71*, virus Sin Nombre, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* O157: H7,
 25 familia *Bunyaviridae*, Virus de la hepatitis A, Virus de la hepatitis B, Virus de la hepatitis C, Virus de la hepatitis D, Virus de la hepatitis E, Virus del herpes simple 1, Virus del herpes simple 2, *Histoplasma capsulatum*, *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*, *Hemophilus influenzae*, *Bocavirus humano*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma fagocitofilo*, *metapneumovirus humano*, *Ehrlichia chaffeensis*, Virus del papiloma humano, Virus de la parainfluenza humana, *Hymenolepis nana* e *Hymenolepis diminuta*, virus de Epstein-Barr, familia de *Orthomyxoviridae*, *Isospora belli*, *Kingella kingae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenas*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, Kuru prion, Lassa virus, *Legionella pneumophila*, *Legionella pneumophila*, *Leishmania* genus, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepromatosis*, *Leptospira* genus, *Listeria monocytogenes*, *Borrelia burgdorferi* y otras especies de *Borrelia*, *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi*, virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), *Plasmodium* genus, virus de Marburg, virus del sarampión, *Burkholderia pseudomallei*, *Neisseria meningitidis*, *Metagonimus yokagawai*, *Microsporidia* phylum,
 35 *Molluscum contagiosum virus* (MCV), virus de las papeas, *Rickettsia typhi*, *Mycoplasma pneumoniae*, numerosas especies de bacterias (*Actinomycetoma*) y hongos (*Eumycetoma*), larvas de moscas dipteros parasitarias, *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, vCJD prion, *Nocardia asteroides* y otras especies de *Nocardia*, *Onchocerca volvulus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Paragonimus westermani* y otras especies de *Paragonimus*, *Pasteurella* genus, *Pediculus humanus capitis*, *Pediculus humanus corporis*, *Phthirus pubis*, *Bordetella pertussis*, *Yersinia pestis*,
 40 *Streptococcus pneumoniae*, *Pneumocystis jirovecii*, *Poliovirus*, *Prevotella* genus, *Naegleria fowleri*, virus JC, *Chlamydomyces psittaci*, *Coxiella burnetii*, virus de Rabia, *Streptobacillus moniliformis* y *Spirillum minus*, Virus sincial respiratorio, *Rhinosporeidum seeberi*, *Rhinovirus*, género *Rickettsia*, *Rickettsia akari*, virus de la fiebre del Valle del Rift, *Rickettsia rickettsii*, *Rotavirus*, virus de la rubéola, género *Salmonella*, coronavirus del SARS, *Sarcoptes scabiei*, género *Schistosoma*, género *Shigella*, virus *Varicella zoster*, *Variola major* o *Variola minor*, *Sporothrix schenckii*,
 45 *Staphylococcus* genus, *Staphylococcus* genus, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Strongyloides stercoralis*, *Treponema pallidum*, *Taenia* genus, *Clostridium tetani*, *Trichophyton* género, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton* género, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Hortaea werneckii*, *Trichophyton* genus, *Malassezia* genus, *Toxocara canis* o *Toxocara cati*,

Toxoplasma gondii, *Trichinella spiralis*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichuris trichiura*, *Mycobacterium tuberculosis*,
 55 *Francisella tularensis*, *Ureaplasma urealyticum*, virus de la encefalitis equina venezolana, *Vibrio cholerae*, virus Guanarito, virus del Nilo Occidental, *Trichosporon beigeli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, virus de la fiebre amarilla, orden de mucorales (*mucormicosis*) y orden Entomophthorales (*Entomophthoromycosis*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter fetus* (*Vibrio*), *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia pestis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pertense*, *Treponema carateneum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Pneumocystis carinii*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma* spp., *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Clamydia* spp.; hongos patógenos (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*); protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis*, *Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma rhodesiense*, *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis*, *Pneumocystis pneumonia*,

Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malaria) o Helminitos (Schistosoma japonicum, Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium y anquilostomas).

Otros anticuerpos como ligando de unión en esta divulgación para el tratamiento de la enfermedad viral incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra antígenos de virus patógenos, que incluyen como ejemplos y sin limitación: Poxviridae, Herpesviridae, Adenoviridae, Papovaviridae, Enteroviridae, Picornaviridae, Parvoviridae, Reoviridae, Retroviridae, virus de la gripe, virus de la parainfluenza, paperas, sarampión, virus sincicial respiratorio, rubéola, Arboviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, virus de la hepatitis no A/no B, Rhinoviridae, Coronaviridae, Rotoviridae, Oncovirus [como, VHB (carcinoma hepatocelular), VPH (cáncer cervical, cáncer anal), herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (sarcoma de Kaposi), virus Epstein-Barr (carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Burkitt, linfoma primario del sistema nervioso central), MCPyV (cáncer de células de Merkel), SV40 (virus Simian 40), VHC (carcinoma hepatocelular), HTLV-I (leucemia/linfoma de células T adultas)], Trastornos inmunes causados por virus: [como el virus de inmunodeficiencia humana (SIDA)]; Virus del sistema nervioso central: [como, por ejemplo, JCV (leucoencefalopatía multifocal progresiva), MeV (panencefalitis esclerosante subaguda), LCV (coriomeningitis linfocítica), encefalitis por Arbovirus, Orthomyxoviridae (probable) (Encefalitis letárgica), RV (rabia), virus de Chandipura, meningitis por virus II, síndrome de Ramsay Hunt tipo II; Poliovirus (poliomielitis, síndrome post-polio), HTLV-I (paraparesia espástica tropical)]; Citomegalovirus (retinitis por citomegalovirus, HSV (queratitis herpética)]; Virus cardiovascular [como el CBV (pericarditis, miocarditis)]; Sistema respiratorio/nasofaringitis viral aguda/neumonía viral: [virus de Epstein-Barr (infección por EBV/mononucleosis infecciosa), citomegalovirus; Coronavirus del SARS (síndrome respiratorio agudo severo) Orthomyxoviridae: virus de la influenza A/B/C (influenza/influenza aviar), paramixovirus: virus de la parainfluenza humana (parainfluenza), RSV (virus sincicial respiratorio humano), hMPV]; Virus del sistema digestivo [MuV (paperas), citomegalovirus (esofagitis por citomegalovirus); Adenovirus (infección por adenovirus); Rotavirus, norovirus, astrovirus, coronavirus; HBV (virus de la hepatitis B), CBV, HAV (virus de la hepatitis A), HCV (virus de la hepatitis C), HDV (virus de la hepatitis D), HEV (virus de la hepatitis E), HGV (virus de la hepatitis G)]; Virus urogenital [como el virus BK, MuV (paperas)].

Según un objeto adicional, la presente divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el conjugado de la divulgación junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para el tratamiento del cáncer y trastornos autoinmunes. El método para el tratamiento del cáncer y los trastornos autoinmunes se puede practicar in vitro, in vivo o ex vivo. Los ejemplos de usos in vitro incluyen tratamientos de cultivos celulares para matar todas las células, excepto las variantes deseadas que no expresan el antígeno objetivo; o para matar variantes que expresan antígeno no deseado. Los ejemplos de usos ex vivo incluyen tratamientos de células madre hematopoyéticas (HSC) antes de la realización del trasplante (HSCT) en el mismo paciente para matar células enfermas o malignas. Por ejemplo, el tratamiento clínico ex vivo para eliminar células tumorales o células linfoides de la médula ósea antes del trasplante autólogo en el tratamiento del cáncer o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, o para eliminar células T y otras células linfoides de la médula ósea o tejido alogénico antes del trasplante para prevenir la enfermedad de injerto contra huésped, se puede llevar a cabo de la siguiente manera. La médula ósea se cosecha del paciente u otro individuo y luego se incuba en un medio que contiene suero al que se agrega el conjugado de la divulgación, las concentraciones varían de aproximadamente 1 pM a 0.1 mM, durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 48 horas a aproximadamente 37°C. Los médicos expertos determinan fácilmente las condiciones exactas de concentración y el tiempo de incubación (= dosis). Después de la incubación, las células de la médula ósea se lavan con medio que contiene suero y se devuelven al paciente por i.v. Infusión según métodos conocidos. En circunstancias en las que el paciente recibe otro tratamiento, como un ciclo de quimioterapia ablativa o irradiación total del cuerpo entre el momento de la recolección de la médula y la reinfusión de las células tratadas, las células de la médula tratada se almacenan congeladas en nitrógeno líquido utilizando equipo médico estándar.

Para uso clínico in vivo, el conjugado de la divulgación se suministrará como soluciones o como un sólido liofilizado que se puede redissolver en agua estéril para inyección. Ejemplos de protocolos adecuados de administración conjugada son los siguientes. Los conjugados se administran semanalmente durante 8 semanas como un bolo i.v.. Las dosis en bolo se administran en 50 a 500 ml de solución salina normal a la que se puede agregar albúmina sérica humana (por ejemplo, 0.5 a 1 ml de una solución concentrada de albúmina sérica humana, 100 mg/ml). Las dosis serán de aproximadamente 50 µg a 20 mg/kg de peso corporal por semana, i.v. (rango de 10 µg a 200 mg/kg por inyección). 8 semanas después del tratamiento, el paciente puede recibir un segundo ciclo de tratamiento. Los clínicos expertos pueden determinar protocolos clínicos específicos con respecto a la vía de administración, excipientes, diluyentes, dosis, tiempos, etc.

Ejemplos de afecciones médicas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos in vivo o ex vivo para matar poblaciones de células seleccionadas incluyen malignidad de cualquier tipo de cáncer, enfermedades autoinmunes, rechazos de injerto e infecciones (virales, bacterianas o parásitas).

La cantidad de un conjugado que se requiere para lograr el efecto biológico deseado variará dependiendo de una serie de factores, que incluyen las características químicas, la potencia y la biodisponibilidad de los conjugados, el tipo de enfermedad, la especie a la que pertenece el paciente, el estado enfermo del paciente, la vía de administración, todos los factores que determinan las cantidades de dosis requeridas, el suministro y el régimen por administrar.

En términos generales, los conjugados de esta divulgación pueden proporcionarse en una solución reguladora fisiológica acuosa que contiene conjugados de 0.1 a 10% p/v para administración parenteral. Los rangos de dosis

típicos son de 1 µg/kg a 0.1 g/kg de peso corporal por día; un rango de dosis preferido es de 0.01 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal por día o una dosis equivalente en un niño humano. Es probable que la dosis preferida del fármaco a administrar dependa de variables tales como el tipo y el grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado general de salud del paciente en particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del compuesto, la ruta de administración (intravenosa, intramuscular u otra), las propiedades farmacocinéticas del compuesto por la ruta de administración elegida, y la velocidad (bolo o infusión continua) y el calendario de administraciones (número de repeticiones en un período de tiempo determinado).

Los conjugados de la presente divulgación también pueden administrarse en formas de dosis unitarias, en donde el término "dosis unitaria" significa una dosis única que puede administrarse a un paciente, y que puede manipularse y envasarse fácilmente, restante como una dosis unitaria física y químicamente estable que comprende el conjugado activo en sí mismo, o como una composición farmacéuticamente aceptable, como se describe más adelante. Como tal, los rangos típicos de dosis diaria total son de 0.01 a 100 mg/kg de peso corporal. A modo de orientación general, las dosis unitarias para humanos varían de 1 mg a 3000 mg por día. Preferiblemente, el rango de dosis unitaria es de 1 a 500 mg administrados de una a cuatro veces al día, y aún más preferiblemente de 10 mg a 500 mg, una vez al día. Los conjugados proporcionados en el presente documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas mezcladas con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones de dosis unitarias pueden prepararse para uso por administración oral, particularmente en forma de tabletas, cápsulas simples o cápsulas de gel blando; o intranasalmente, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles; o por vía dérmica, por ejemplo, tópicamente en pomadas, cremas, lociones, geles o aerosoles, o mediante parches transdérmicos. Las composiciones pueden administrarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2005.

Las formulaciones preferidas incluyen composiciones farmacéuticas en las que un compuesto de la presente divulgación se formula para administración oral o parenteral. Para la administración oral, las tabletas, píldoras, polvos, cápsulas, grageas y similares pueden contener uno o más de cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como celulosa microcristalina o goma de tragacanto; un diluyente tal como almidón o lactosa; un desintegrante tal como almidón y derivados de celulosa; un lubricante tal como estearato de magnesio; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante como la menta o el salicilato de metilo. Las cápsulas pueden tener la forma de una cápsula dura o una cápsula blanda, que generalmente están hechas de mezclas de gelatina opcionalmente mezcladas con plastificantes, así como una cápsula de almidón. Además, las formas de unidad de dosificación pueden contener otros materiales que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, recubrimientos de azúcar, goma laca o agentes entéricos. Otras formas de dosificación oral de jarabe o elixir pueden contener agentes edulcorantes, conservantes, tintes, colorantes y saborizantes. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de disolución rápida, liberación modificada o liberación sostenida, y en donde tales formulaciones de liberación sostenida son preferiblemente bimodales. Las tabletas preferidas contienen lactosa, almidón de maíz, silicato de magnesio, croscarmelosa de sodio, povidona, estearato de magnesio o talco en cualquier combinación.

Las preparaciones líquidas para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Las composiciones líquidas también pueden incluir aglutinantes, tampones, conservantes, agentes quelantes, agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes, y similares. Los solventes no acuosos incluyen alcoholes, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen mezclas de alcoholes y agua, medios regulados y solución salina. En particular, el polímero de lactida biocompatible, biodegradable, el copolímero de lactida/glicólido o los copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de los compuestos activos. Los vehículos intravenosos pueden incluir reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos, como los basados en la dextrosa de Ringer, y similares. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para estos compuestos activos incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas.

Los modos de administración alternativos incluyen formulaciones para inhalación, que incluyen medios tales como polvo seco, aerosol o gotas. Pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y desoxicocolato, o soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales, o como un gel para ser aplicado por vía intranasal. Las formulaciones para administración bucal incluyen, por ejemplo, pastillas para chupar o pastillas y también pueden incluir una base aromatizada, como sacarosa o acacia, y otros excipientes como el glicocolato. Las formulaciones adecuadas para la administración rectal se presentan preferiblemente como supositorios de dosis unitarias, con un vehículo de base sólida, tal como manteca de cacao, y pueden incluir un salicilato. Las formulaciones para aplicación tópica en la piel preferiblemente toman la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, aspersion, aerosol o aceite. Los portadores que pueden usarse incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes o sus combinaciones. Las formulaciones adecuadas para la administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos y pueden ser emulsiones lipofílicas o soluciones acuosas reguladas, disueltas y/o dispersas en un polímero o un adhesivo.

En una realización específica, un conjugado de la divulgación se administra simultáneamente con los otros agentes terapéuticos conocidos o que lleguen a conocer, tales como el agente quimioterapéutico, la radioterapia, los agentes de inmunoterapia, los agentes del trastorno autoinmune, los agentes antiinfecciosos u otros conjugados anticuerpo-fármaco, lo que resulta en un efecto sinérgico. En otra realización específica, los fármacos sinérgicos o la radioterapia se administran antes o después de la administración de un conjugado, en un aspecto al menos una hora, 12 horas, un día, una semana, un mes, en otros aspectos varios meses, antes o después de la administración de un conjugado de la divulgación.

En otras realizaciones, los fármacos sinérgicos incluyen, pero no se limitan a: 1). Agentes quimioterapéuticos: a). Agentes alquilantes: tales como [Mostazas nitrogenadas: (clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, mecloretamina, melfalan, trofosfamida); Nitrosoureas: (carmustina, lomustina); Alquilsulfonatos: (busulfano, treosulfán); Triazenos: (dacarbazina); Compuestos que contienen platino: (carboplatino, cisplatino, oxaliplatino)]; b). Alcaloides de plantas: tales como [Alcaloides de vinca: (vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina); Taxoides: (paclitaxel, docetaxol)]; c). Inhibidores de la topoisomerasa del ADN: tales como [epipodofilinas: (9-aminocamptotecina, camptotecina, crisnatol, etopósido, fosfato de etopósido, irinotecán, tenipósido, topotecán,); Mitomicinas: (mitomicina C)]; d). Antimetabolitos: como {[Anti-folato: inhibidores de DHFR: (metotrexato, trimetrexato); Inhibidores de la deshidrogenasa IMP: (ácido micofenólico, tiazofurina, ribavirina, EICAR); Inhibidores de la ribonucleótido reductasa: (hidroxiurea, deferoxamina)]; [Análogos de pirimidina: análogos de uracilo: (5-fluorouracilo, doxifluridina, floxuridina, ratitrexed (Tomudex)); Análogos de citosina: (citarabina, arabinósido de citosina, fludarabina); Análogos de purina: (azatioprina, mercaptopurina, tioguanina)]; e). Terapias hormonales: tales como {Antagonistas de los receptores: [Antiestrógeno: (megestrol, raloxifeno, tamoxifeno); Agonistas de la LHRH: (*goserelin*, acetato de leuprolida); Antiandrógenos: (bicalutamida, flutamida)]; Retinoides/Deltoides: [Análogos de vitamina D3: (CB 1093, EB 1089 KH 1060, colecalciferol, ergocalciferol); Terapias fotodinámicas: (verteporfina, ftalocianina, fotosensibilizador Pc4, demetoxi-hipocrelina A); Citoquinas: (interferón alfa, interferón gamma, factor de necrosis tumoral (TNF), proteínas humanas que contienen un dominio TNF)]; f). Inhibidores de la quinasa, como BIBW 2992 (anti-EGFR/Erb2), imatinib, gefitinib, pegaptanib, sorafenib, dasatinib, sunitinib, erlotinib, nilotinib, lapatinib, axitinib, pazopanib, vandetanib, E7080 (anti-VEGFR2), mubritinib, ponatinib (AP24534), bafetinib (INNO-406), bosutinib (SKI-606), cabozantinib, vismodegib, iniparib, ruxolitinib, CYT387, axitinib, tivozanib, sorafenib, bevacizumab, cetuximab, Trastuzumab, Ranibizumab, Panitumumab, ispinesib; g). Otros: como gemcitabina, epoxomicinas (por ejemplo, Carfilzomib), bortezomib, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, tosedostat, zybrestat, PLX4032, STA-9090, Stimuvax, alloectin-7, Xegeva, Provenge, Yervoy, inhibidores de isoprenilación (como una lovastatina), Neurotoxinas dopaminérgicas (como el ion 1-metil-4-fenilpiridinio), inhibidores del ciclo celular (como la estaurosporina), actinomicinas (como la actinomicina D, dactinomicina), bleomicinas (como la bleomicina A2, bleomicina B2, peplomicina), antraciclinas (tales como daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), idarrubicina, epirubicina, pirarubicina, zorrubicina, metoxantrona, inhibidores de MDR (como verapamilo), inhibidores de Ca²⁺-ATPasa (como thapsigargin), inhibidores de histona desacetilasa (Vorinostat, Romidepsin, Panobinostat, Ácido Valproico, Mocetinostat (MGCD0103), Belinostat, PCI-24781, Entinostat, SB939, Resminostat, Givinostat, AR-42, CUDC-101, sulforafano, Tricostatina A); Thapsigargin, Celecoxib, glitazones, galato de epigalocatequina, Disulfiram, Salinosporamida A. 2). Un agente contra enfermedades autoinmunes incluye, entre otros, ciclosporina, ciclosporina A, ácido aminocaproico, azatioprina, bromocriptina, clorambucilo, cloroquina, ciclofosfamida, corticosteroides (por ejemplo, amcinonida, betametasona, budesonida, hidrocortisona, flunisolida, propionato de fluticasona, flucortolona danazol, dexametasona, acetónido de triamcinolona, dipropionato de beclometasona, DHEA, enanercept, hidroxicloroquina, infliximab, meloxicam, metotrexato, mofetil, micofenilato, prednisona, sirolimus, tacrolimus.3). Un agente de enfermedad antiinfecciosa incluye, pero no se limita a, a). Aminoglucósidos: amikacina, astromicina, gentamicina (netilmicina, sisomicina, isepamicina), higromicina B, kanamicina (amikacina, arbekacina, bekanamicina, dibekacina, tobramicina), neomicina (framacetina, paromomicina, ribostamicina), netilmicina, espectinomicina, estreptomina, tobramicina, verdamicina; b). Anfencolicos: azidamfenicol, cloranfenicol, florfenicol, tiamfenicol; c). Ansamicinas: geldanamicina, herbimicina; d). Carbapenems: biapenem, doripenem, ertapenem, imipenem/cilastatina, meropenem, panipenem; e). Cefemas: carbacefem (loracarbef), cefacetilo, cefaclor, cefradina, cefadroxilo, cefalonio, cefaloridina, cefalotin o cefalotina, cefalexina, cefaloglicina, cefamandol, cefapirina, cefatrizina, cefazaflur, cefazedona, cefazolina, cefbuperazona, cefcapene, cefdaloxima, cefepima, cefminox, cefoxitina, cefprozil, cefroxadina, ceftazolidin, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefepima, cefetamet, cefmenoxima, cefodizima, cefonicid, cefoperazona, ceforanida, cefotaxima, cefotiam, ceftazolidin, cefalexina, cefpimizol, cefpiramida, cefpirome, cefpodoxima, cefprozil, cefquinome, cefsulodina, ceftazidima, cefteteram, ceftibuten, ceftioleone, ceftizoxima, ceftobiprol, ceftriaxona, cefuroxima, cefuzonam, cefamicina (cefotaxima, cefotetan, cefmetazol), oxacefem (flomoxef, latamoxef); f). Glucopéptidos: bleomicina, vancomicina (oritavancina, telavancina), teicoplanina (dalbavancina), ramoplanina, cubicina; g). Gliciliclinas: por ejemplo, tigeciclina; g). inhibidores de la β -lactamasa: penam (sulbactam, tazobactam), clavam (ácido clavulánico); i). Lincosamidas: clindamicina, lincomicina; j) Lipopéptidos: daptomicina, A54145, antibióticos dependientes de calcio (CDA); k) Macrólidos: azitromicina, cetromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, fluritromicina, josamicina, cetólido (telitromicina, cetromicina), midecamicina, miocamicina, oleandomicina, rifamicinas (rifampicina, rifampin, rifabutina, rifapentina), rokitamicina, roxitromicina, espectinomicina, espiramicina, tacrolimus (FK506), troleandomicina, telitromicina; 1) Monobactamas: aztreonam, tigemonam; m). Oxazolidinonas: linezolid; n). Penicilinas: amoxicilina, ampicilina (pivampicilina, hetacilina, bacampicilina, metampicilina, talampicilina), azidocilina, azlocilina, bencilpenicilina, bencilpenicilina benzatínica, fenoximetilpenicilina benzatínica, clometocilina, bencilpenicilina procaína, carbenicilina (carindacilina), cloxacilina, dicloxacilina, epicilina, flucloxacilina, mecilina (pivmecilina), mezlocilina, metilina, nafcilina, oxacilina, penamecilina, penicilina, feneticilina, fenoximetilpenicilina, piperacilina, propicilina,

- sulbenicilina, temocilina, ticarcilina; o). Polipéptidos: bacitracina, colistina, polimixina B; p). Quinolonas: alatrofloxacina, balofloxacina, ciprofloxacina, clinafloxacina, danofloxacina, difloxacina, enoxacina, enrofloxacina, floxacina, garenoxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, grepafloxacina, kano trovafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, marbofloxacina, moxifloxacina, nadifloxacina, norfloxacina, orbifloxacina, ofloxacina, pefloxacina, trovafloxacina, grepafloxacina, sitafloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, tosufloxacina, trovafloxacina; q). Estreptograminas: pristinamicina, quinupristina/dalfopristina); r) Sulfonamidas: mafenida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilimida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol); s) Antibacterianos esteroides: por ejemplo, ácido fusídico; t). Tetraciclinas: doxiciclina, clortetraciclina, clomociclina, demeclociclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, penimepiciclina, rolitetraciclina, tetraciclina, glicilciclinas (por ejemplo, tigeciclina); u) Otros tipos de antibióticos: anonacina, arsfenammina, inhibidores de bactoprenol (Bacitracina), inhibidores de DADAL/AR (cicloserina), dictioestatina, discodermolida, eleuterobin, epotilona, etambutol, etoposide, faropenem, ácido fusídico, furazolidona, isoniazida, laulimalida, metronidazol, mupirocina, micolactona, inhibidores de la síntesis de NAM (por ejemplo, fosfomicina), nitrofurantoína, paclitaxel, platensimicina, pirazinamida, quinupristina/dalfopristina, rifampicina (rifampim), tazobactam tinidazol, uvaricina;
- 4). Medicamentos antivirales: a). Inhibidores de entrada/fusión: aplaviroc, maraviroc, vicriviroc, gp41 (enfuvirtida), PRO 140, CD4 (ibalizumab); b). Inhibidores de la integrasa: raltegravir, elvitegravir, globoidnan A; c). Inhibidores de la maduración: bevirimat, vivecon; d). Inhibidores de la neuraminidasa: oseltamivir, zanamivir, peramivir; e). Nucleósidos y nucleótidos: abacavir, aciclovir, adefovir, amdoxovir, apricitabina, brivudina, cidofovir, clevidina, dexelvucitabina, didanosina (ddI), elvucitabina, emtricitabina (FTC), entecavir, fanciclovir-fluorouracilo-(5-FU), análogos 2',3'-didesoxinucleósidos sustituidos con 3'-fluoro (por ejemplo, 3'-fluoro-2',3'-didesoximidina (FLT) y 3'-fluoro-2',3'-didesoxiguanosina (FLG), fomivirsen, ganciclovir, idoxuridina, lamivudina (3TC), 1-nucleósidos (por ejemplo, β -1-timidina y β -1-2'-desoxicidina), penciclovir, racivir, ribavirina, estampidina, estavudina (d4T), taribavirina (viramidina), telbivudina, tenofovir, trifluridina valaciclovir, valganciclovir, zalcitabina (ddC), zidovudina (AZT); f). No nucleósidos: amantadina, ateviridina, capravirina, diarilpirimidinas (etravirina, rilpivirina), delavirdina, docosanol, emivirina, efavirenz, foscarnet (ácido fosfonofórmico), imiquimod, interferón alfa, lovirida, lodenosina, metisazona, nevirapina, NOV-205, peginterferón alfa, podofilotoxina, rifampicina, rimantadina, resiquimod (R-848), tromantadina; g). Inhibidores de la proteasa: amprenavir, atazanavir, boceprevir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, pleconaril, ritonavir, saquinavir, telaprevir (VX-950), tipranavir; h) otros tipos de medicamentos antivirales: abzima, arbidol, calanólido a, ceragenina, cianovirina-n, diarilpirimidinas, galato de epigalocatequina (EGCG), foscarnet, griffithsina, taribavirina (viramidina), hidroxuurea, KP-1461, miltefosina, pleconaril, inhibidores de portmanteau, ribavirina, seliciclib.
- 5). Otros medicamentos inmunoterapéuticos: por ejemplo, imiquimod, interferones (por ejemplo, α , β), factores estimuladores de colonias de granulocitos, citoquinas, interleucinas (IL-1~IL-35), anticuerpos (por ejemplo, trastuzumab, pertuzumab, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, infliximab, adalimumab, basiliximab, daclizumab, omalizumab), fármacos unidos a proteínas (por ejemplo, abraxane), un anticuerpo conjugado con fármacos seleccionados del derivado de caliqueamicina, derivados de maitansina (DM1 y DM4), CC-1065 y aglutinantes menores de duocarmicina, potentes derivados de taxol, doxorubicina, fármacos antimetabólicos auristatina (por ejemplo, Trastuzumab-DMI, Inotuzumab ozogamicina, Brentuximab vedotina, Glematumumab vedotina, lorvotuzumab mertansina, AN-152 LMB2, TP-38, VB4-845, Cantuzumab mertansina, AVE9633, SAR3419, CAT-8015 (anti-CD22), IMGN388, IMGN529, IMGN853, milatuzumab-doxorubicina, SGN-75 (anti-CD70), Anti-CD22-MCC-DM1).

Según otro objeto adicional, la presente divulgación también se refiere al proceso de preparación del conjugado de la divulgación. El conjugado y el proceso de la presente divulgación pueden prepararse de varias maneras bien conocidas por los expertos en la materia. Los agentes antimetabólicos utilizados en el conjugado se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante la aplicación o adaptación de los métodos descritos a continuación, o variaciones al respecto según lo apreciado por el experto en la materia. Las modificaciones y sustituciones apropiadas serán fácilmente evidentes y bien conocidas u obtenibles fácilmente de la literatura científica para los expertos en la materia. En particular, tales métodos se pueden encontrar en R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, 2ª edición, Wiley-VCH Publishers, 1999.

En las reacciones descritas a continuación, puede ser necesario proteger los grupos funcionales reactivos, por ejemplo grupos hidroxilo, amino, imino, tio o carboxilo, donde se desean en el producto final, para evitar su participación no deseada en las reacciones. Los grupos protectores convencionales pueden usarse de acuerdo con la práctica estándar, para ejemplos, Véase P. G. Wuts and T.W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience; 4a edición (2006). Algunas reacciones pueden llevarse a cabo en presencia de una base, o un ácido o en un disolvente adecuado. No existe una restricción particular sobre la naturaleza de la base, el ácido y el disolvente que se utilizarán en esta reacción, y cualquier base, ácido o disolvente que se use convencionalmente en reacciones de este tipo puede usarse igualmente aquí, siempre que no tenga ningún efecto adverso sobre otras partes de la molécula. Las reacciones pueden tener lugar en un amplio rango de temperaturas. En general, nos parece conveniente llevar a cabo la reacción a una temperatura de -80°C a 150°C (más preferiblemente de aproximadamente temperatura ambiente a 100°C). El tiempo requerido para la reacción también puede variar ampliamente, dependiendo de muchos factores, en particular la temperatura de reacción y la naturaleza de los reactivos. Sin embargo, siempre que la reacción se efectúe en las condiciones preferidas descritas anteriormente, generalmente será suficiente un período de 3 horas a 20 horas.

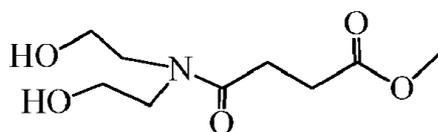
El tratamiento de la reacción puede llevarse a cabo por medios convencionales. Por ejemplo, los productos de reacción pueden recuperarse destilando el disolvente de la mezcla de reacción o, si es necesario después de destilar el disolvente de la mezcla de reacción, vertiendo el residuo en agua seguido de extracción con un disolvente orgánico inmiscible en agua y eliminando por destilación el disolvente del extracto. Además, el producto puede, si se desea, purificarse adicionalmente mediante varias técnicas bien conocidas, tales como recristalización, reprecipitación o las diversas técnicas de cromatografía, en particular la cromatografía en columna o la cromatografía preparativa en capa fina. La síntesis de los agentes antimetabólicos y sus conjugados de esta divulgación se ilustran en las figuras 1 ~28.

Los conjugados de moléculas de unión con agentes antimetabólicos potentes se ilustran adicionalmente, pero no están restringidos por la descripción en los siguientes ejemplos.

6. Materiales experimentales:

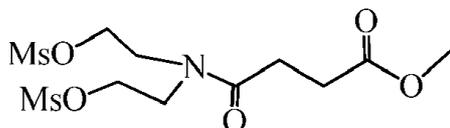
Se obtuvieron espectros de masas usando un sistema Bruker Esquire 3000. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AVANCE300. Los cambios químicos se informan en ppm en relación con TMS como un estándar interno. Los espectros ultravioleta se registraron en un espectrofotómetro Hitachi U1200. La HPLC se realizó usando un sistema HPLC Agilent 1100 equipado con un colector de fracciones y un detector de longitud de onda variable. La cromatografía en capa fina se realizó en placas TLC de gel de sílice Analtech GF. Los aminoácidos y sus derivados, así como las resinas precargadas, fueron de Merck Chemicals International Co o Synthetech Co., o Peptides International Inc o Chembridge International Co. o Sigma -Aldrich Co. Algunos de los enlazadores, enlazadores de éster/maleimida del NHS (AMAS, BMPS, GMBS, MBS, SMCC, EMCS o Sulfo-EMCS, SMPB, SMPH, LC-SMCC, Sulfo-KMUS, SM(PEG)4, SM(PEG)6, SM(PEG)8, SM(PEG)12, SM(PEG)24); NHS éster/piridiliditiol (SPDP, LC-SPDP o Sulfo-LC-SPDP, SMPT, Sulfo-LC-SMPT); ésteres de NHS/haloacetilo (SIA, SBAP, SIAB o Sulfo-SIAB); éster/diazirina del NHS (SDA o Sulfo-SDA, LC-SDA o Sulfo-LC-SDA, SDAD o Sulfo-SDAD); Maleimida/hidrazida (BMPH, EMCH, MPBH, KMH); Piridiliditiol/hidrazida (PDPH); El isocianato/maleimida (PMPI) se adquirió de Thermo Fisher Scientific Co. SPDB, los conectores SPP se hicieron de acuerdo con las referencias (Cumber, A. et al, Bioconjugate Chem., 1992, 3, 397-401). El anticuerpo humano anti-CD22 era de Santa Cruz Biotechnology, Inc. y Trastuzumab era de Genentech. Todos los demás productos químicos o disolventes anhidros fueron de Sigma-Aldrich International.

Ejemplo 1. 4-(bis(2-hidroxietil)amino)-4-oxobutanoato de metilo (3)



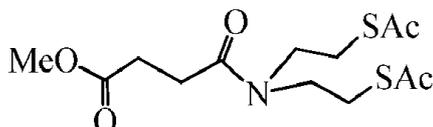
Se sometieron succinato de dimetilo (20.0 g, 136.9 mmol) y dihidroxiethylamina (7.20 g, 68.7 mmol) en mezcla de tolueno anhidro (500 ml) y piridina (50 ml) a reflujo a 150°C durante 28 h. La mezcla se concentró y se purificó en una columna de SiO₂ eluida con EtOAc/DCM (5%~25% EtOAc) para proporcionar el compuesto del título (12.5 g, 83% de rendimiento). ESI MS m/z+ para C₉H₁₇NaNO₅ (M + Na) calculado 242.2, encontrado 242.4.

Ejemplo 2. 4-(bis(2-((metilsulfonil)oxi)etil)amino)-4-oxobutanoato de metilo (4)



A 4-(bis(2-hidroxietil)amino)-4-oxobutanoato de metilo (12.0 g, 49.56 mmol) en piridina anhidra (350 ml) se añadió cloruro de metanosulfonilo (20.0 g, 175.4 mmol). Después de agitar durante la noche, la mezcla se concentró, se diluyó con EtOAc (350 ml), se lavó con NaH₂PO₄ 1 M frío (2 x 300 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó para proporcionar el producto crudo (~18.8 g, rendimiento del 101%). El producto crudo se usó para el siguiente paso sin purificación adicional. ESI MS m/z+ para C₁₁H₂₁NaNO₉S₂ (M + Na) calculado 398.2, encontrado 398.4.

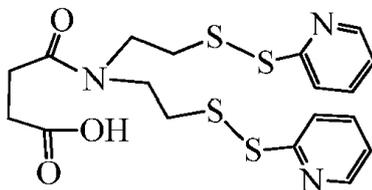
Ejemplo 3. 4-(bis(2-(acetiltio)etil)amino)-4-oxobutanoato de metilo (5)



A metil 4-(bis(2-((metilsulfonil)oxi)etil)amino)-4-oxobutanoato (recién hecho, 90% puro, 8.5 g, -20 mmol) en DMA (350 ml) a 0°C se añadió ácido tioacético (10 ml, 134 mmol), seguido de la adición de Et₃N (30 ml, 215 mmol). La mezcla se agitó entonces a temperatura ambiente durante la noche, se concentró, se diluyó con EtOAc (350 ml), se lavó con NaHCO₃ (sat, 300 ml), solución de NaCl sat (300 ml) y NaH₂PO₄ 1 M (300 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄,

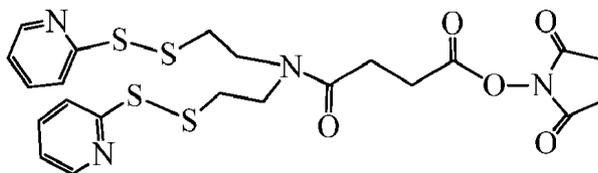
se filtró, se evaporó y se purificó en una columna de SiO₂ eluida con EtOAc/hexano (10%~25% EtOAc) para proporcionar el compuesto del título (5.1 g, 76% de rendimiento). ESI MS m/z+ para C₁₃H₂₁NaNO₅S₂ (M + Na) calculado 358.1, encontrado 358.2.

Ejemplo 4. Ácido 4-(bis(2-(piridin-2-ilisulfanil)etil)amino)-4-oxobutanoico (6)



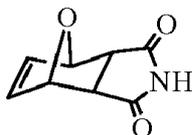
5 Se añadió 4-(bis(2-(acetiltio)etil)amino)-4-oxobutanoato de metilo (5.0 g, 14.9 mmol) en THF (150 ml) en NaOH (5.0 g, 125 mmol) en agua (100 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 35 minutos, se neutralizó con H₃PO₄ a pH 7. Luego se añadió 1,2-di(piridin-2-il)disulfano (Aldrithiol-2, 26.0 g, 118 mmol) en THF (100 ml) y la mezcla se agitó durante 4 h, se concentró y se purificó en una columna de SiO₂ eluida con MeOH/DCM/HOAc (1:20/1%) para proporcionar el producto del título (5.8 g, rendimiento del 85.6%). ESI MS m/z+ para C₁₈H₂₁NaN₃O₃S₄ (M + Na) calculado 478.0, encontrado 478.2.

Ejemplo 5. 2,5-dioxopirrolidin-1-il-4-(bis(2-(piridin-2-il-disulfanil)etil)amino)-4-oxobutanoato (7)



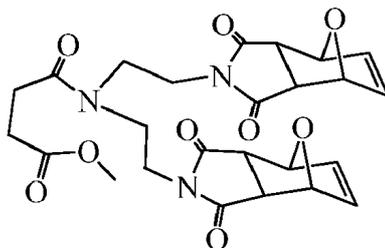
15 Se añadió ácido 4-(bis(2-(piridin-2-il-disulfanil)etil)amino)-4-oxobutanoico (5.2 g, 11.5 mmol) en DMA (100 ml) NHS (1.6 g, 13.9 mmol) y EDC (5.0 g, 26.1 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se evaporó y se purificó en una columna de SiO₂ eluida con EtOAc/DCM (5% a 15% de EtOAc) para proporcionar el producto del título (5.8 g, 85.6% de rendimiento). ESI MS m/z+ para C₂₂H₂₄NaN₄O₅S₄ (M + Na) calculado 575.1, encontrado 575.2.

Ejemplo 6. 3,6-endoxo-A-tetrahidroftalimida (12)



20 Se añadió maleimida (10.0 g, 103.0 mmol) en tolueno (200 ml) furano (10.0 ml, 137.4 mmol). La mezcla se calentó dentro de una bomba de autoclave de 1 L a 100°C durante 8 h. La bomba se enfrió a temperatura ambiente y el sólido interior se enjuagó con metanol, se concentró y cristalizó en acetato de etilo/hexano para proporcionar 16.7 g (99%) del compuesto del título. 1H RMN (CDCl₃): 11.12 (s, 1H) (NH), 6.68~6.64 (m, 2H), 5.18~5.13 (m, 2H), 2.97~2.92 (m, 2H). MS m/z+ para C₈H₇NaNO₃ (M + Na) calculado 188.04, encontrado 188.04.

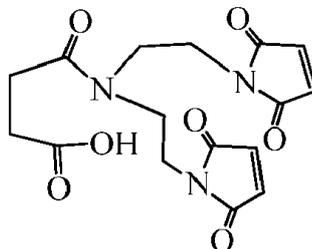
25 **Ejemplo 7. Metil 4-((2-((3aR,4R,7S,7aS)-1,3-dioxo-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoxiisindol-2(3H)-il)etil)(2-((4R,7S,7aS)-1,3-dioxo-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-4,7-epoxiisindol-2(3H)-il)etil)amino)-4-oxobutanoato (13)**



30 Se añadió 4-(bis(2-((metilsulfonyl)oxi)etil)amino)-4-oxobutanoato de metilo (4, recién hecho, 90% puro, 8.5 g, -20 mmol) en DMA (350 ml) 3,6-endoxo-A-tetrahidroftalimida (10.2 g, 61.8 mmol), carbonato de sodio (8.0 g, 75.5 mmol) y yoduro de sodio (0.3 g, 2.0 mmol). La mezcla se agitó entonces a temperatura ambiente durante la noche, se concentró, se diluyó con EtOAc (350 ml), se lavó con NaHCO₃ (sat, 300 ml), solución de NaCl sat (300 ml) y NaH₂PO₄ 1 M (300 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se evaporó y se purificó en una columna de SiO₂ eluida con

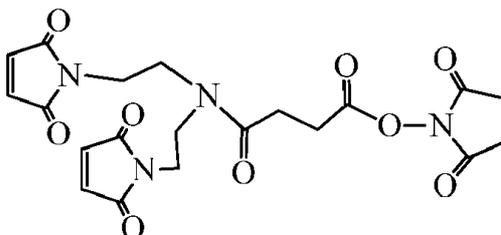
EtOAc/hexano (10%~30% EtOAc) para proporcionar el compuesto del título (7.9 g, 77% de rendimiento). ESI MS m/z+ para $C_{25}H_{27}NaN_3O_9$ (M + Na) calculado 536.2, encontrado 536.4.

Ejemplo 8. Ácido 4-(bis(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoico (14)



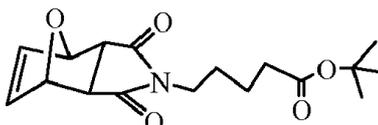
- 5 El compuesto 13 (3.0 g, 5.8 mmol) y trimetilestannanol (4.8 g, 26.4 mmol) en 1,2-dicloroetano (150 ml) se calentaron a reflujo a 80°C durante 8 h. Se enfrió a temperatura ambiente y el residuo se pasó por una columna corta de gel de sílice y se eluyó con diclorometano/metanol para eliminar el hidróxido de trimetilestano extra. Luego, las fracciones agrupadas se combinaron, se concentraron y se diluyeron con DMA y tolueno, se calentó a reflujo a 120°C durante la noche y se purificó en una columna de SiO_2 eluida con MeOH/DCM (5% ~ 10% MeOH) para proporcionar el compuesto del título (1.62 g, 76% rendimiento). ESI MS m/z+ para $C_{16}H_{17}NaN_3O_9$ (M + Na) calculado 386.1, encontrado 386.2.

Ejemplo 9. 2,5-Dioxopirrolidin-1-ilo 4-(bis(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etil)amino)-4-oxobutanoato



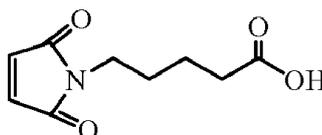
- Al compuesto (14) (1.60 g, 4.4 mmol) en DMA (100 ml) se añadió NHS (0.76 g, 6.61 mmol) y EDC (1.70 g, 8.90 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se evaporó y se purificó en una columna de SiO_2 eluida con EtOAc/DCM (5% a 15% de EtOAc) para proporcionar el producto del título (1.72 g, 85.0% de rendimiento). ESI MS m/z+ para $C_{20}H_{20}NaN_4O_9$ (M + Na) calculado 483.1, encontrado 483.2.

Ejemplo 10. 5-pentanoato de t-butilo 5-(3',6'-endoxo-Δ-tetrahidroftalimido).



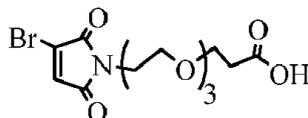
- A 5-hidroxi pentanoato de t-butilo (10.0 g, 57.4 mmol) en piridina (60 ml) se añadió cloruro de mesilo (8.0 ml, 103.3 mmol) y la mezcla se agitó durante 6 h, se evaporó, se diluyó con EtOAc, se lavó con NaH_2PO_4 1 M frío, pH 6, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó hasta sequedad. A la mezcla del compuesto 12 (9.90 g, 60.0 mmol) y Na_2CO_3 (8.5 g, 80.1 mmol) en DMF (80 ml) se añadió el compuesto de mesilato seco. La mezcla se agitó durante una noche, se evaporó, se diluyó con EtOAc, se lavó con agua salina y NaH_2PO_4 1 M, pH 6, se secó sobre $MgSO_4$, se evaporó y se purificó en una columna de SiO_2 eluida con EtOAc/ CH_2Cl_2 (1:12) para proporcionar el compuesto del título (14.01 g, 76%). MS m/z+ para $C_{17}H_{23}NaNO_5$ (M + Na) calculado 344.16, encontrado 344.16.

Ejemplo 11. Ácido 5-maleimido-pentanoico (21b).



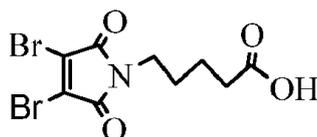
- A compuesto 17 (5.0 g, 15.57 mmol) en 1,4-dioxano (40 ml) se añadió HCl (10 ml, 36%) a 4°C y la mezcla se agitó durante 30 minutos, se evaporó a sequedad para formar ácido 5-(3',6'-endoxo-Δ-tetrahidroftalimido)pentanoico (4.08 g, 99%). El compuesto seco en una mezcla de DMF/tolueno (1:1, 40 ml) se calentó a reflujo durante 6 h, se evaporó y cristalizó en EtOH/éter/hexano para proporcionar el compuesto del título (2.76 g, 90%). MS m/z+ para $C_9H_{12}NO_4$ (M + H) calculado 198.07, encontrado 198.07.

Ácido 3-(2-(2-(2-(3-bromo-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)-propanoico.



MS m/z+ para C₁₃H₁₉BrNO₇ (M + H) calculado 380.03, encontrado 380.03.

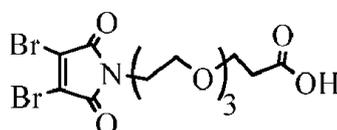
Ácido 5-(3,4-dibromo-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanoico



5

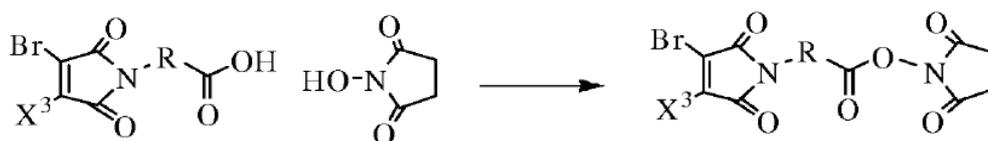
MS m/z+ para C₉H₁₀Br₂NO₄ (M + H) calculado 353.89, encontrado 353.89.

Ácido 3-(2-(2-(2-(3,4-dibromo-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)-propanoico



MS m/z+ para C₁₃H₁₈Br₂NO₇ (M + H) calculado 457.94, encontrado 457.94.

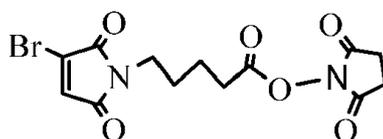
10 **Ejemplo 16. Procedimiento general para el éster NHS de los compuestos 3'-bromo-maleimida 41 y 42, y el éster NHS de los compuestos 3',4'-dibromo-maleimida 45 y 46.**



R = alquilo C₁ ~ C₈ o C₂H₄(OC₂H₄)_n, n = 1~20; X³ = H o Br 41, 42, X₃ = H; 45, 46, X₃ = Br

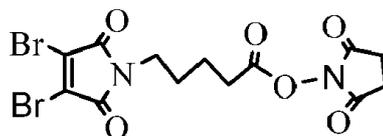
15 A la solución de los compuestos 3'-bromo-maleimida 39 y 40 (1 eq), o los compuestos 3',4'-dibromo-maleimida 43 y 44 en DMA (~0.15 M) se añadió N-hidroxisuccinimida (1.1 eq) y EDC (2-4 eq) y la mezcla se agitó durante la noche, se concentró y se purificó en una columna de SiO₂ eluida con EtOAc/CH₂Cl₂ (1:20~1:5) para proporcionar (70%~93% de rendimiento) de los enlazadores 3'-bromo-maleimida 41 y 42, y enlazadores 3',4'-dibromo-maleimida 45 y 46 respectivamente.

2,5-dioxopirrolidin-1-il 5-(3-bromo-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanoato.



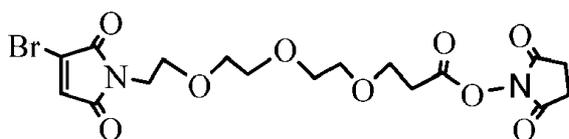
20 MS m/z+ para C₁₃H₁₃BrN₂NaO₇ (M + Na) calculado 395.00, encontrado 395.00.

2,5-dioxopirrolidin-1-il 5-(3,4-dibromo-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanoato



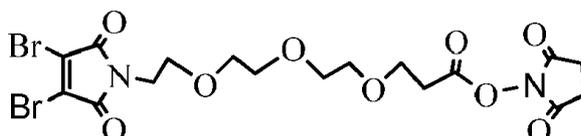
MS m/z+ para C₁₃H₁₂Br₂N₂NaO₆ (M + Na) calculado 472.91, encontrado 472.91.

2,5-dioxopirrolidin-1-il 3-(2-(2-(2-(3-bromo-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)propanoato



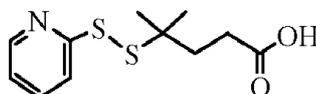
MS m/z+ para $C_{17}H_{21}BrN_2NaO_9$ (M + Na) calculado 499.04, encontrado 499.04.

2,5-dioxopirrolidin-1-ilo 3-(2-(2-(2-(3,4-dibromo-2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)propanoato



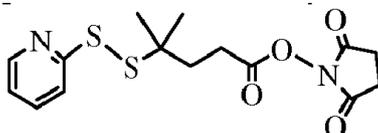
5 MS m/z+ para $C_{17}H_{20}Br_2N_2NaO_9$ (M + Na) calculado 576.95, encontrado 576.95.

Ejemplo 17. Ácido 4-(2-piridilditio)-4-metilpentanoico.



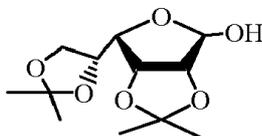
A ácido 4-mercapto-4-metilpentanoico (Goff, D. et al, Bioconjugate Chem. 1990, 1, 381-386) (4.67 g, 31.5 mmol) en metanol (15 ml) se añadió la solución de 2,2'-ditidipiridina (30.0 g, 136.2 mmol) en la mezcla de metanol (80 ml) y regulador de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.5 (70 ml). Después de agitar durante 6 h, la mezcla se concentró, se extrajo con EtOAc/Hexano (1:1). La solución acuosa se ajustó a pH 3 y se extrajo con EtOAc (3 x 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron, se evaporaron y se purificaron en una columna de SiO_2 (MeOH/ CH_2Cl_2 /HOAc, 1:15:0.01) para proporcionar el compuesto del título (7.05 g, 87%). MS m/z+ para $C_{11}H_{16}NO_2S_2$ (M + H) calculado 258.05, encontrado 258.05.

15 **Ejemplo 18. 4-(2-piridilditio)-4-metilpentanoato de N-succinimidilo (243) (enlazador SMDP)**



A ácido 4-(2-piridilditio)-4-metilpentanoico (2.0 g, 7.78 mmol) en CH_2Cl_2 (20 ml) se añadió N-hidroxisuccinimida (1.10 g, 9.56 mmol) y EDC (4.0 g, 20.8 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó en una columna de SiO_2 (EtOAc/ CH_2Cl_2 , 1:10) para proporcionar el compuesto del título (2.48 g, 90%). MS m/z+ para $C_{15}H_{18}NaN_2O_4S_2$ (M + Na) calculado 377.07, encontrado 377.08.

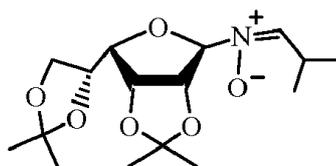
Ejemplo 19. (3aR,4R,6S,6aR)-6-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidro-furo[3,4-d][1,3]dioxol-4-ol (62).



A una suspensión en agitación de D-gulonic-lactona (20.01 g, 112.37 mmol) y $CuSO_4$ anhidro (25.0 g, 157.22 mmol) en acetona seca (450 ml) se añadió H_2SO_4 conc. (1.6 ml), y la mezcla se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El pH de la solución se ajustó a 7 con $Ca(OH)_2$, y la suspensión resultante se filtró y se evaporó al vacío para proporcionar un diacetónido (2,3:5,6-O-diisopropilideno-D-gulono-1,4-lactona) como un jarabe amarillo claro que se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. A una solución en agitación de diacetónida en THF (300 ml) a $-78^\circ C$ se añadió lentamente una solución 1 M de DIBAL-H (180 ml, 180 mM) en tolueno. Después de agitarse durante 1 hora a $-78^\circ C$, la mezcla de reacción se inactivó con agua (50 ml) y se filtró a través de Celite. La capa orgánica se separó, se secó (Na_2SO_4) y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía sobre gel de sílice con hexano-acetato de etilo (5:1) para dar el compuesto del título (25.27 g, 83% en dos etapas) como jarabe incoloro. ESI MS m/z+ para $C_{12}H_{20}NaO_6$ (M + Na) calculado 283.12, encontrado 283.12.

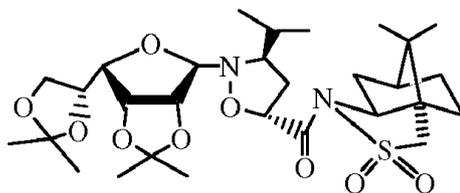
25 **Ejemplo 20. (3aR,4R,6S,6aR,Z)-6-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,2-dimetil-N (2-metilpropiliden)tetrahidrofluoro [óxido de 3,4-d][1,3] dioxol-4-amina (64)**

35



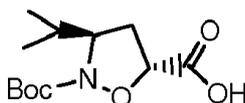
Una mezcla de 2,3:5,6-O-diisopropilideno-D-gulofuranosa (62) (10.0 g, 38.4 mmol) y clorhidrato de hidroxilamina (25.01 g, 360.87 mmol) en piridina (150 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío, se añadió agua (250 ml) y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄), se concentraron al vacío y se filtraron a través de una columna corta de gel de sílice eluida con acetato de etilo para dar 2,3:5,6-O-diisopropilideno-D-gulosa oxima (63) (10.34 g, 98%) como una sustancia vítrea incolora que se usó directamente sin purificación adicional. Una mezcla de esta oxima cruda (63) (10.30 g, 37.43 mmol), isobutiraldehído (3.00 g, 41.66 mmol) y MgSO₄ (3 g, 25 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite. El filtrado se concentró al vacío y el residuo se hizo pasar a través de una columna corta de SiO₂ eluida con acetato de etilo para proporcionar el compuesto del título (11.57 g, 94% de rendimiento) como un sólido blanco. ESI MS m/z+ para C₁₆H₂₇NO₆ calculado 329.18, encontrado 329.18.

Ejemplo 21. (3R,5R)-2-((3aR,4R,6S,6aR)-6-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofluoro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-3-((-)-10',2'-camforsultam)-N-propilisoxazolidina-5-carboxamida (65).



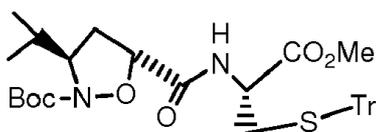
Una mezcla de (3aR,4R,6S,6aR,Z)-6-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,2-dimetil-N-(2-metilpropilideno) tetrahidrofluoro[3,4-d][1,3]dioxol-4-óxido de amina (6.00 g 18.22 mmol) y (2R)-N-(acriloil) bornano-10.2-sultamas (5.10 g, 18.95 mmol) en CH₂Cl₂ (50 ml) se calentó a reflujo durante 37 h. Después de la concentración, el residuo se recristalizó en EtOH (30 ml) para dar el compuesto del título (8.72 g, 80% de rendimiento) como un sólido incoloro. La cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, hexano/AcOEt 7:3) de las aguas madres dio más (0.47 g, 4%) del compuesto del título como un sólido incoloro. MS ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₉H₄₆N₂NaO₉S 621.28, encontrado, 621.28.

Ejemplo 22. Ácido (3R,5R)-2-(tert-butoxicarbonil)-3-isopropilisoxazolidina-5-carboxílico (67).



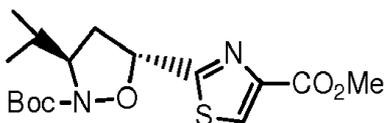
Se añadió una solución de LiOH (5.0 g, 208.7 mmol) en H₂O (60 mL) a 45°C a una solución de (3R,5R)-2-((3aR,4R,6S,6aR)-6-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofluoro[3,4-d][1,3]dioxol-4-il)-3-((-)-10',2'-camforsultam)-N-propilisoxazolidina-5-carboxamida (30.0 g, 48.2 mmol) en THF (100 ml) y MeOH (60 ml). Después de agitar durante 1 h, la mezcla se concentró, se vertió en H₂O (150 ml) y la mezcla se ajustó a pH 9 con HCl 4 M acuoso. La mezcla se extrajo con EtOAc, luego la capa acuosa se ajustó a pH 3 con HCl 4 M, la mezcla se extrajo con EtOAc, el extracto orgánico se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y luego se concentró al vacío. El residuo se trituroó con hexano para dar ácido (3R,5R)-2-((3aR,4R,6S,6aR)-6-((R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)-2,2-dimetiltetrahidrofluoro[3,4-d,1,3]dioxol-4-il)-3-isopropilisoxazolidina-5-carboxílico (66a) (17.1 g 88%) como un sólido incoloro. Este material se usó para el siguiente paso sin más purificación. MS ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₉H₃₁NNaO₈, 424.19, encontrado, 424.19. A una solución de este material (8.0 g, 19.95 mmol) en MeCN (80 ml) se añadió HClO₄ ac. al 60%. (6.0 ml, 35.77 mmol) a 45°C, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de la concentración, el residuo se disolvió en 1,4-dioxano (40 ml), y luego se añadió una suspensión de NaHCO₃ (25 g, 297 mmol) en H₂O (32 ml) y Boc₂O (4.80 g, 22.00 mmol) a 4°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, se concentró, se diluyó con H₂O y EtOAc/Hexano (1:1) y se separó. La capa acuosa se ajustó a pH 3 con 4 M HCl acuoso. La mezcla se extrajo con EtOAc, las capas orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron al vacío. El residuo se trituroó con hexano para dar ácido (3R,5R)-2-(tert-butoxicarbonil)-3-isopropilisoxazolidina-5-carboxílico (4.91 g, 95%) como un sólido amorfo incoloro. MS ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₂H₂₁NNaO₅, 282.13, encontrado, 282.13.

Ejemplo 23. (R)-2-[(3R,5R)-2-((t-butil-il)metoxicarbonil)-3-isopropilisoxazolidina-5-carboxamido]-3-(trifenilmetilto)propionato de metilo (68)



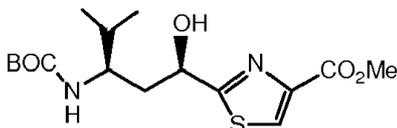
5 Se añadieron *i*Pr₂NEt (0.75 ml, 4.31 mmol) y TBTU (2.50 g, 7.78 mmol) a una solución de ácido (3*R*,5*R*)-2-(tert-butoxicarbonil)-3-isopropilisoxazolidina-5-carboxílico (1.01 g, 3.89 mmol) y clorhidrato de éster metílico de 1-(*S*)-Tricisteína (1.76 g, 4.27 mmol) en CH₂Cl₂ (15 ml) a 4°C y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vertió en solución de NaHCO₃ (sat.), se extrajo con CH₂Cl₂, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se concentró y se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (hexano/AcOEt 1:2) para dar el compuesto del título (2.10 g, 87%) como sólido amorfo incoloro. MS ESI: *m/z*: [M+Na]⁺, calculado para C₃₅H₄₂N₂NaO₆S, 641.27, encontrado, 641.26.

Ejemplo 24. 3-isopropil-5-(4-(metoxicarbonil)tiazol-2-il)isoxazolidina-2-carboxilato de (3*R*,5*R*)-tert-butilo (69)



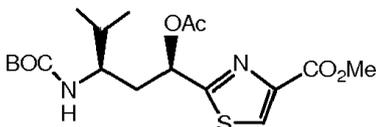
10 Se añadió Tf₂O (2.0 ml, 12.0 mmol) a una solución de Ph₃P=O (4.10 g, 14.74 mmol) en CH₂Cl₂ (40.0 ml) y la mezcla se agitó a -10°C durante 1 h. Una solución de (R)-2-[(3*R*,5*R*)-2-[(*t*-butil-il)metoxicarbonil]-3-isopropilisoxazolidina-5-carboxamido]-3-(trifenilmetilil)propionato de metilo (68) (4.00 g, 6.47 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml) se añadió a la mezcla de reacción a -10°C y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6 h, se añadió a solución saturada de NaHCO₃ a 4°C y se extrajo con CH₂Cl₂. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, se concentraron al vacío y se sometieron a cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 3:2) para dar el derivado de tiazolidina correspondiente como un sólido amorfo amarillo. Se añadió MnO₂ (5.80 g, 66.7 mmol) a una solución de este material en CH₂Cl₂ (60 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla se filtró a través de Celite, se concentró a vacío y cromatografía en SiO₂ (hexano/AcOEt 3:2) para dar el compuesto del título (69) (1.75 g, 75%) como un sólido amorfo incoloro. ESI: *m/z*: [M+Na]⁺, calculado para C₁₆H₂₄N₂NaO₅S, 379.13, encontrado, 379.14.

Ejemplo 25. 2-((1*R*,3*R*)-3-(tert-butoxicarbonilamino)-1-hidroxi-4-metilpentil)-tiazol-4-carboxilato de metilo (70).



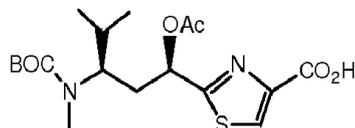
25 Se añadió Mo(CO)₆ (1.10 g, 3.12 mmol) a una solución de (3*R*,5*R*)-tert-butil 3-isopropil-5-(4-(metoxicarbonil) tiazol-2-il)isoxazolidina-2-carboxilato (69) (1.00 g, 2.81 mmol) en CH₃CN (20 ml) y H₂O (2 ml) y la mezcla se agitó a 70°C durante 16 h. Después de la concentración, el residuo se diluyó con EtOAc (50 ml) y una solución acuosa al 10% de ácido cítrico (50 ml). Se añadió NaIO₄ a la mezcla hasta que la capa acuosa se volvió transparente y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con una solución acuosa al 10% de Na₂S₂O₃ y salmuera, secados sobre Na₂SO₄, filtrados, concentrados y cromatografía sobre SiO₂ (hexano/EtOAc 3:2) para dar el compuesto del título (906 mg, 90%) como un sólido incoloro. MS ESI: *m/z*: [M+Na]⁺, calculado para C₁₆H₂₆NNaO₅S, 381.14, encontrado, 381.14.

30 **Ejemplo 26. 2-((1*R*,3*R*)-1-acetoxi-3-(tert-butoxicarbonil-amino)-4-metilpentil)-tiazol-4-carboxilato de metilo (71)**



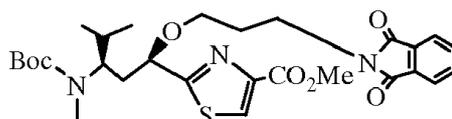
35 El compuesto 70 (900 mg, 2.51 mmol) en piridina (15 ml) se añadió Ac₂O (0.5 ml, 5.29 mmol) y la mezcla se agitó durante una noche, se concentró, se sometió a cromatografía en SiO₂ (hexano/EtOAc 4:1) para dar el compuesto del título (950 mg, 95%) como un sólido incoloro. MS ESI: *m/z*: [M+Na]⁺, calculado para C₁₈H₂₈N₂NaO₆S, 423.15, encontrado, 423.16.

Ejemplo 27. Ácido 2-((1*R*,3*R*)-1-acetoxi-3-(tert-butoxicarbonil-amino)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxílico (72)



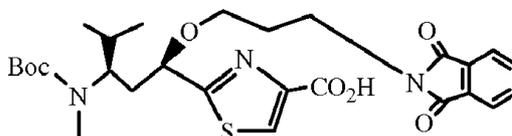
A compuesto 71 (940 mg, 2.35 mmol) en THF (15 ml) se añadió NaH (120 mg, 3.0 mmol, 60% en aceite) a 4°C y la mezcla se agitó durante 2 h, luego se añadió CH₃I (0.155 ml, 2.49 mmol). Después de agitar durante la noche, concentrar, redisolver en EtOAc, filtrar a través de una columna corta de SiO₂ y evaporar a sequedad para dar un ácido 2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-(tert-butoxicarbonil(metil)amino)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxílico crudo (73a). Al compuesto seco (73a) en 1,2-dicloroetano (20 ml) se añadió hidróxido de trimetilestaño (620 mg, 3.43 mmol). La mezcla se agitó a 80°C durante la noche, se concentró, se redisolvió MeOH/CH₂Cl₂/HOAc (1:5:0.01, 20 ml), se filtró a través de una columna corta de SiO₂, se concentró y se coevaporó con tolueno hasta sequedad. Al compuesto seco en piridina (15 ml) se añadió Ac₂O (0.4 ml, 4.23 mmol). Después de agitar durante la noche, la mezcla se concentró, cromatografía en SiO₂ (MeOH/CH₂Cl₂/HOAc (1:10:0.01) para dar el compuesto del título (735 mg, 78%) como un sólido incoloro. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₈H₂₈N₂NaO₆S, 423,15, encontrado, 423,16.

Ejemplo 28. 2-((1R,3R)-3-(tert-butoxicarbonil(metil)amino)-1-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-il)propoxi)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo (86).



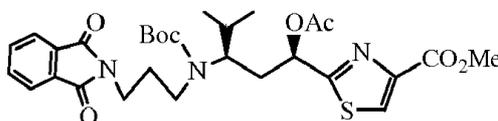
Al compuesto 70 (850 mg, 2.37 mmol) en THF (15 ml) a -20°C se añadió NaH (100 mg, 2.5 mmol, 60% en aceite). Después de agitar durante 30 minutos a -20°C, se añadió N-(3-bromopropil)ftalimida (655 mg, 2.4 mmol) y la mezcla se agitó a -20°C durante 30 minutos y luego se calentó a temperatura ambiente en 4 h. La mezcla de reacción se inactivó con metanol (0.5 ml), se diluyó con CH₂Cl₂ (60 ml), se filtró a través de una columna corta de gel de sílice, se evaporó a sequedad para proporcionar metilo crudo 2-((1R,3R)-3-(tert-butoxicarbonilo-amino)-1-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-il)propoxi)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato 85 que se usó directamente sin purificación adicional. Al compuesto crudo 85 en THF (25 ml) a temperatura ambiente se añadió NaH (170 mg, 4.25 mmol, 60% en aceite). Después de agitar durante 45 minutos, se añadió CH₃I (0.20 ml, 3.21 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se inactivó con NaH₂PO₄ (2.0 M, 2 ml). La mezcla se añadió DMA (5 ml), se evaporó al vacío, cromatografía en SiO₂ con EtOAc/CH₂Cl₂ (1:10~1:4) para proporcionar el compuesto del título (921 mg, 69%). ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₈H₃₇N₃NaO₇S, 582.22, encontrado, 582.22.

Ejemplo 29. Ácido 2-((1R,3R)-3-(tert-butoxicarbonil(metil)amino)-1-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-il)propoxi)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxílico (87).



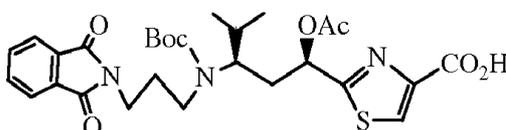
Al compuesto seco 86 (910 mg, 1.63 mmol) en 1,2-dicloroetano (20 ml) se añadió hidróxido de trimetilestaño (400 mg, 2.21 mmol). La mezcla se agitó a 80°C durante la noche, se concentró, se purificó en una columna de SiO₂ eluida con CH₃OH/CH₂Cl₂/HOAc (1:10:0.01) para proporcionar el compuesto del título (756 mg, 85%). ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₇H₃₆N₃NaO₇S, 546.22, encontrado, 546.22.

Ejemplo 30. 2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-(tert-butoxicarbonil(3-(1,3-dioxisoindolin-2-il)propil)amino)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo (89)



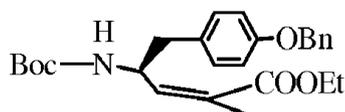
Al compuesto 71 (800 mg, 2.00 mmol) en THF (30 ml) a temperatura ambiente se añadió NaH (150 mg, 3.75 mmol, 60% en aceite). Después de agitar durante 45 minutos, se añadió N-(3-bromopropil)ftalimida (655 mg, 2.4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se inactivó con NaH₂PO₄ (2.0 M, 2 ml). La mezcla se añadió DMA (5 ml), se evaporó y se purificó en una columna de SiO₂ eluida con EtOAc/CH₂Cl₂ (1:10~1:4) para proporcionar el compuesto del título (971 mg, 82%). ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₉H₃₇N₃NaO₈S, 610.22, encontrado, 610.22.

Ejemplo 31. Ácido 2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-(tert-butoxicarbonilo(3-(1,3-dioxisoindolin-2-il)propil)amino)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxílico (90)



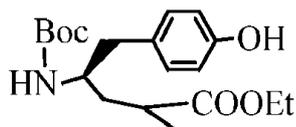
Al compuesto seco (89) (900 mg, 1.53 mmol) en 1,2-dicloroetano (35 ml) se añadió hidróxido de trimetilestaño (400 mg, 2.21 mmol). La mezcla se agitó a 80°C durante la noche, se concentró. Luego, la mezcla en piridina (20 ml) se añadió Ac₂O (3 ml) y se agitó durante la noche, se evaporó, se purificó en una columna de SiO₂ (MeOH/CH₂Cl₂/HOAc, 1:10:0.01) para proporcionar el compuesto del título (755 mg, 86%) ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₈H₃₅N₃NaO₈S, 596.20, encontrado, 596.20.

Ejemplo 32. (S)-etil 5-(4-(benciloxi)fenil)-4-(tert-butoxicarbonilamino)-2-metilpent-2-enoato (185)



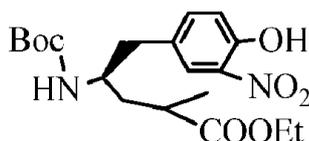
A (S)-Metil 3-(4-(benciloxi)fenil)-2-(tert-butoxi-carbonilamino)propanoato 184 (8.00 g, 20.76 mmol) en CH₂Cl₂ (250 ml) a -78°C se añadió DIBAL gota a gota (40 ml, 40 mmol, 1.0 M) en CH₂Cl₂. Después de agitar a -78°C durante 2 h, la reacción se interrumpió con la adición de MeOH (5 ml). La mezcla se calentó a temperatura ambiente, se acidificó con HCl 1 M a pH 4 y se separó. La capa acuosa se extrajo con DCM (2 x 150 ml). Las capas orgánicas se lavaron con agua, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se evaporaron a sequedad para formar un intermedio aldehído crudo. Luego, el aldehído intermedio crudo se disolvió en DCM, se añadió la solución de iluro preparada a partir de bromuro de 1-(1-etoxicarbonil etil)-trifenilfosfonio (18.0 g, 40.64 mmol) y KOtBu (5.00 g, 44.64 mmol) en CH₂Cl₂ (80 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante la noche, la mezcla se extrajo, se concentró y se purificó por cromatografía en SiO₂ (EtOAc/Hexano, 1:8~1:4) para proporcionar (6.90 g, 76%) del compuesto del título. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₆H₃₃NNaO₅, 462.22, encontrado, 462.22.

Ejemplo 33. 4-((tert-butoxicarbonil)amino)-5-(4-hidroxifenil)-2-metilpentanoato de (4R)-etilo (186)



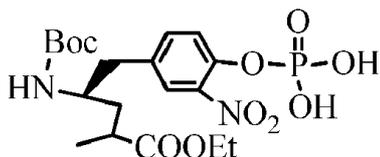
A (S)-etil 5-(4-(benciloxi)fenil)-4-(tert-butoxicarbonilamino)-2-metilpent-2-enoato (185) (6.70 g, 15.26 mmol) en una botella de hidrogenación se cargó metanol (150 ml), Pd/C (0.3 g, Pd al 10%). La reacción de hidrogenación se realizó a 30 psi durante 6 h. La mezcla se filtró a través de Celite, se evaporó y cristalizó con EtOH/hexano en el compuesto del título (186) (4.61 g, rendimiento del 86%). ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₉H₂₉NNaO₅, 374.20, encontrado, 374.30.

Ejemplo 34. 4-((tert-butoxicarbonil)amino)-5-(4-hidroxi-3-nitrofenil)-2-metilpentanoato de (4R)-etilo (187)

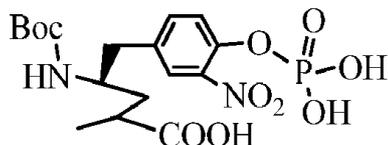


A una solución del compuesto 186 (4.50 g, 12.81 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (200 ml) se añadió Ac₂O (2 ml, 21.16 mmol) y HNO₃ fumante (0.65 ml, 14.07 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, se diluyó con agua (150 ml), se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄, se evaporaron y se purificaron en una columna de SiO₂ (EtOAc/DCM, 1:10) para proporcionar (4.21 g, 83%) del compuesto del título. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₉H₂₈N₂NaO₇, 419.19, encontrado, 419.20.

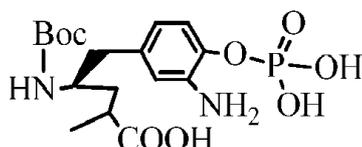
Ejemplo 35. 4-((tert-butoxicarbonil)amino)-2-metil-5-(3-nitro-4-(fosfonooxi)fenil)pentanoato de etilo (188)



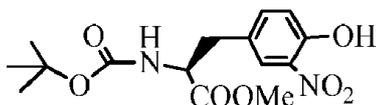
Al compuesto 187 (4.00 g, 10.09 mmol) en una mezcla de CH₃CN (70 ml) y DMA (30 ml) se añadió DIPEA (4.00 ml, 23.00 mmol) a 0°C. Después de agitar durante 2 minutos, se añadió gota a gota POCl₃ (2.00 ml, 21.45 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 h, y se inactivó con la adición lenta de NaHCO₃ (3.5 g, 41.60 mmol) en agua (20 ml) a 0°C. Después de agitar a 0°C durante la noche, la mezcla se concentró y se purificó en un cartucho C-18 (20 x 4 cm) eluido con una mezcla de gradiente, 25 ml/min, A: 0.5% de HOAc, B: CH₃OH, del 100% de A en 10 min, luego a 75% de A y 25% de B en 45 min. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título (3.89 g, 81% de rendimiento). ESI: m/z: [M-H]⁻, calculado para C₁₉H₂₈N₂O₁₀P, 475.16, encontrado, 475.20.

Ejemplo 36. Ácido (4R)-4-((tert-butoxicarbonil)amino)-2-metil-5-(3-nitro-4-(fosfonooxi)fenil)pentanoico (189)

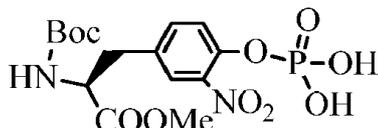
5 A una solución de LiOH (5.0 g, 208.7 mmol) en H₂O (60 ml) se añadió a una solución del compuesto (188) (3.75 g, 7.87 mmol) en THF (100 ml). Después de agitar durante 4 horas a 0°C, la mezcla se ajustó a pH ~6 con HCl 4 M, se concentró y se purificó por cromatografía C-18 eluida con mezcla gradiente, 25 ml/min, A: 0.5% de HOAc, B: CH₃OH, de 100% de A en 10 min, luego a 75% de A y 25% de B en 45 min. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron para proporcionar el compuesto del título (2.82 g, 80% de rendimiento). ESI: m/z: [M-H]⁻, calculado para C₁₇H₂₄N₂O₁₀P, 447.12, encontrado, 447.20.

Ejemplo 37. Ácido (4R)-5-(3-amino-4-(fosfonooxi)fenil)-4-((tert-butoxicarbonil)amino)-2-metilpentanoico (190)

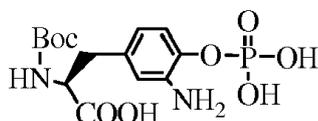
10 El compuesto (189) (2.60 g, 5.80 mmol) en una botella de hidrogenación se cargó con metanol (80 ml), Pd/C (0.2 g, Pd al 10%). La reacción de hidrogenación se realizó a 35 psi de H₂ durante 6 h. La mezcla se filtró a través de Celite, se evaporó para proporcionar el compuesto del título crudo (190) (2.18 g, 90% de rendimiento), que se usó directamente sin purificación adicional. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₇H₂₆N₂O₈P, 417.15, encontrado, 417.15.

Ejemplo 38. 2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(4-hidroxi-3-nitrofenil)propanoato de (S)-metilo (196)

20 A una solución de 2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(4-hidroxifenil)propanoato de (S)-metilo (195) (4.5 g, 15.24 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (240 ml) se agregó c₂O (4 ml, 42.32 mmol) y HNO₃ fumante (0.85 ml, 18.40 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, se diluyó con agua (150 ml), se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄, se evaporaron y se purificaron en una columna de SiO₂ (EtOAc/DCM, 1:10) para proporcionar (4.30 g, 83%) del compuesto del título. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₅H₂₀N₂NaO₇, 363.13, encontrado, 363.20.

Ejemplo 39. 2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(3-nitro-4-(fosfonooxi)fenil)propanoato de (S)-metilo (197)

25 A una solución del compuesto 196 (4.10 g, 12.05 mmol) en una mezcla de CH₃CN (90 ml) se añadió DIPEA (4.00 ml, 23.00 mmol) a 0°C. Después de agitar durante 2 minutos, se añadió gota a gota POCl₃ (2.00 ml, 21.45 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 h, y se inactivó con la adición lenta de NaHCO₃ (3.5 g, 41.60 mmol) en agua (20 ml) a 0°C. Después de agitar a 0°C durante la noche, la mezcla se concentró y se purificó en un cartucho C-18 (20 x 4 cm) eluido con una mezcla de gradiente, 25 ml/min, A: 0.5% de HOAc, B: CH₃OH, del 100% de A en 10 min, luego a 75% de A y 25% de B en 45 min. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron para proporcionar (4.20 g, 83%) el compuesto del título. ESI: m/z: [M-H]⁻, calculado para C₁₅H₂₀N₂O₁₀P, 419.08, encontrado, 419.10.

Ejemplo 40. Ácido 3-[3-amino-4-(fosfonooxi)fenil]-(2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]amino]-propanoico (198)

35 Al compuesto seco (197) (4.0 g, 9.52 mmol) en la mezcla de 1,2-dicloroetano (50 ml) y DMA (60 ml) se añadió hidróxido de trimetilestano (4.00 g, 22.1 mmol). La mezcla se agitó a 80°C durante 6 h, se evaporó, se filtró a través de una

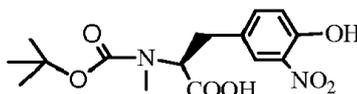
columna corta de SiO₂ eluida con agua/MeCN (1;4). Las fracciones que contenían el producto se agruparon, se concentraron para generar ácido (S)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-(3-nitro-4-(fosfonooxi)fenil)propanoico. En una botella de hidrogenación se cargó DMA (70 ml), Pd/C (0.3 g, 10% Pd), seguido de la adición del ácido propanoico preparado. La reacción de hidrogenación se realizó a 30 psi de hidrógeno durante 6 h. La mezcla se filtró a través de Celite, se evaporó y cristalizó para proporcionar (2.86 g, 80% de rendimiento) del compuesto del título (198), que se usó directamente sin purificación adicional. ESI: m/z: [M-H]⁻, calculado para C₁₄H₂₀N₂O₈P, 375.10, encontrado, 375.10.

Ejemplo 41. 3-[4-(benciloxi)fenil]-(2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]-(metil)-amino}-propanoato de bencilo (200).



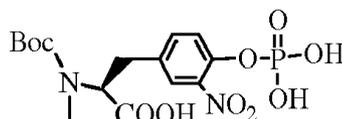
A una solución de 3-[4-(benciloxi)fenil]-(2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]-(metil)-amino}-propanoato de bencilo (4.0 g, 8.67 mmol) en THF (60 ml) se añadió NaH (430 mg, 10.75 mmol, 60% en aceite). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, se añadió CH₃I (1.82 g, 12.82 mmol) y la mezcla se agitó durante una noche, se detuvo con CH₃OH (0.5 ml), se evaporó y se purificó en una columna de SiO₂ (EtOAc/CH₂Cl₂, 1:10) para proporcionar el compuesto del título (3.83 g, 93%). MS ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₉H₃₃NNaO₅, 498.24, encontrado, 498.24.

Ejemplo 42. Ácido (2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]-(metil)amino}-3-(4-hidroxi-3-nitrofenil)propanoico (201)



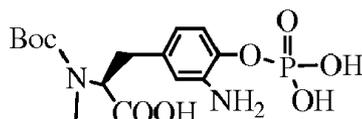
El compuesto 200 (3.80 g, 8.00 mmol) en una botella de hidrogenación se cargó con metanol (80 ml), Pd/C (0.3 g, Pd al 10%). La reacción de hidrogenación se realizó a 30 psi de hidrógeno durante 6 h. La mezcla se filtró a través de Celite, se evaporó para proporcionar ácido (2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]-(metil)amino}-3-(4-hidroxi)fenil)propanoico crudo (201a), que se usó directamente sin purificación adicional. Al compuesto 201a en CH₂Cl₂ anhidro (240 ml) a -25°C se añadió gota a gota una mezcla de SnCl₄ (1.5 ml, 12.75 mmol) y HNO₃ fumante (0.60 ml, 12.98 mmol) en CH₂Cl₂ (40 ml). La mezcla se agitó a -25°C durante 75 minutos, se inactivó con NaHCO₃ saturado a pH 3-4, se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄, se concentraron y se purificaron en una columna de SiO₂ (MeOH/DCM/HOAc 1:8:0.01) para proporcionar (1.98 g, 73%) del compuesto del título. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₅H₂₀N₂NaO₇, 363.13, encontrado, 363.13.

Ejemplo 43. Ácido (2R)-2-[[tert-butoxi]carbonil]-(metil)amino}-3-[3-nitro-4-(fosfonooxi)-fenil]propanoico (202).



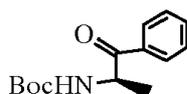
A una solución del compuesto 201 (1.98 g, 5.82 mmol) en una mezcla de CH₃CN (30 ml) y DMA (30 ml) se añadió DIPEA (2.00 ml, 11.50 mmol) a 0°C. Después de agitar durante 2 minutos, se añadió gota a gota POCl₃ (1.10 ml, 11.79 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 h, y se inactivó con la adición lenta de NaHCO₃ (2.0 g, 23.80 mmol) en agua (10 ml) a 0°C. Después de agitar a 0°C durante la noche, la mezcla se concentró y se purificó en un cartucho C-18 (20 x 4 cm) eluida con una mezcla de gradiente, 25 ml/min, A: 0.5% de HOAc, B: CH₃OH, del 100% de A en 10 min, luego a 75% de A y 25% de B en 45 min. Las fracciones que contenían el producto se agruparon y se evaporaron para proporcionar (1.96, 80%) el compuesto del título. ESI: m/z: [M-H]⁻, calculado para C₁₅H₂₀N₂O₁₀P, 419.09, encontrado, 419.09.

Ejemplo 44. Ácido 3-[3-amino-4-(fosfonooxi)fenil]-(2R)-2-[[tert-butoxicarbonil]-(metil)-amino]-propanoico (203)



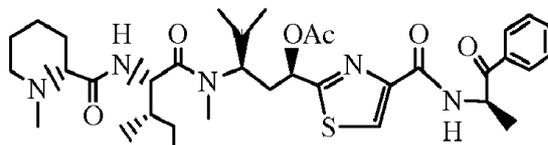
El compuesto 202 (1.96 g, 4.67 mmol) en una botella de hidrogenación se cargó con DMA (60 ml), Pd/C (0.2 g, Pd al 10%). La reacción de hidrogenación se realizó a 30 psi de hidrógeno durante 6 h. La mezcla se filtró a través de Celite, se evaporó a sequedad para proporcionar (1.74 g, 95%) del compuesto del título (203), que se usó directamente sin purificación adicional. ESI: m/z: [M-H]⁻, calculado para C₁₅H₂₂N₂O₈P, 389.12, encontrado, 389.12.

Ejemplo 45. N-(1-oxo-1-fenilpropan-2-(2R)-il)carbamato de tert-butilo (204)



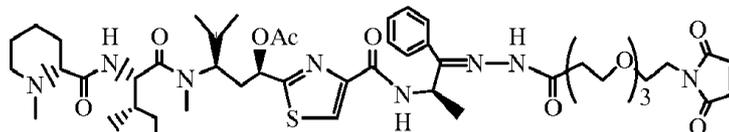
A (1S,2R)-(+)- Norefedrina (7.0 g, 46.29 mmol) en la mezcla de THF (40 ml) y NaHCO₃ 1 M (100 ml) a 4°C se añadió gota a gota Boc₂O (10.15 g, 46.53 mmol) en THF (60 ml) durante 45 min. La mezcla luego se agitó a temperatura ambiente durante 6 h, se concentró, se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄, se concentró y se filtró a través de una columna corta de SiO₂ eluida con EtOAc/Hexano (1:2), se concentró para proporcionar el N-((1S)-hidroxi-1-fenilpropan-2-(2R)-il)carbamato de tert-butilo crudo (204b) (10.81, 93%). MS ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₁₄H₂₁NaNO₃, 274.15, encontrado, 274.15. El compuesto crudo se usó directamente sin purificación adicional. Al compuesto (204b) en CH₂Cl₂ (50 ml) se añadió solución de peryodinano Dess-Martin en CH₂Cl₂ (180 ml, 0.3 M). Después de agitar durante 1 h, la mezcla se añadió NaOH helado (1 M, 100 ml), se separó y las capas orgánicas se lavaron con NaH₂PO₄ 1 M, pH 6 (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄, se evaporaron y se purificaron en una columna de SiO₂ (EtOAc/hexano 1:5) para proporcionar el compuesto del título 204 (9,34 g, 81% en dos pasos). MS ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₁₄H₁₉NaNO₃, 272.14, encontrado, 272.14.

Ejemplo 46. Acetato de (1R,3R)-3-((2S,3S)-N-(metil)-3-metil-2-((R)-1-metilpiperidin-2-carboxamido)-pentamido)-4-metil-1-(4-((1-oxo-1-fenilpropan-2-il)carbamoi)ltiazol-2-il)-pentilo (205).



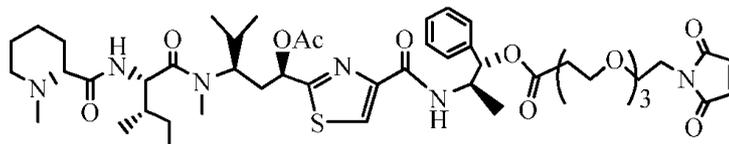
Al compuesto 204 (180 mg, 0.722 mmol) en 4 ml de dioxano se añadió HCl conc. (1.0 ml, 37%) a 4°C y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, se evaporó y se coevaporó con tolueno hasta sequedad. Luego, a la sequedad del sólido en DMA (7 ml) se añadieron el compuesto 106 (251 mg, 0.466 mmol), EDC (305 mg, 1.56 mmol) y DIPEA (0.13 ml, 0.747 mmol) y la mezcla se agitó durante 8 h, se evaporó y purificado en columna de SiO₂ (EtOAc/CH₂Cl₂, 1:4) para proporcionar el compuesto del título 205 (255.3 mg, 82%). ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₃₅H₅₁NaN₅O₆S, 692.36, encontrado, 692.36.

Ejemplo 47. Acetato de (1R,3R)-3-((2S,3S)-N,3-dimetil-2-((R)-1-metilpiperidina-2-carboxamido)-pentanamido)-1-(4-((R)-1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-12-oxo-15-fenil-3,6,9-trioxa-13,14-diazaheptadec-14-en-16-ilcarbamoi)ltiazol-2-il)-4-metilpentil (206).



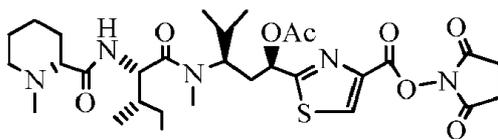
Al compuesto 205 (75 mg, 0.112 mmol) en metanol (5 ml) se añadió compuesto 12 (50 mg en sal de HCl, 0.126 mmol) y HOAc (3 ul, 0.052 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se neutralizó con DIPEA (23 ul, 0.132 mmol), se evaporó y se purificó en un cartucho de SiO₂ (4 g, EtOAc/CH₂Cl₂, 1:5 -1:3) para proporcionar el compuesto del título 206 (79.3 mg, 70%) MS ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₅₀H₇₄NaN₈O₁₂S, 1033.51, encontrado, 1033.50.

Ejemplo 48. 3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi) etoxi)-propanoato de ((1R,3R)-1-acetoxi-3-((2S,3S)-N,3-dimetil-2-((R)-1-metilpiperidina-2-carboxamido)-pentanamido)-4-metilpentil)ltiazol-4-carboxamido)-1-fenil-propil (211)



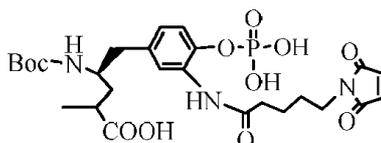
Al compuesto 208a (95 mg, 0.141 mmol) y ácido 3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi) propanoico (55 mg, 0.182 mmol) en CH₂Cl₂ (5 ml) se agregaron DCC (122 mg, 0.591 mmol) y DMAP (25 mg, 0.204 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó con cromatografía SiO₂ (EtOAc)/CH₂Cl₂, 1:3) para proporcionar el compuesto del título (95.1 mg, 71%). MS ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₄₈H₇₀NaN₆O₁₂S, 977.47, encontrado, 977.47.

Ejemplo 49. 2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-((2S,3S)-N,3-dimetil-2-((R)-1-metilpiperidina-2-carboxamido) pentanamido)-4-metilpentil)ltiazol-4-carboxilato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (234).



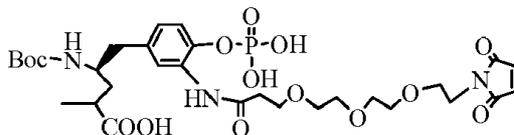
5 Al compuesto 106 (788.1 mg, 1.464 mmol) en DMF (10 ml) se añadió NHS (202.0 mg, 1.756 mmol) y EDC (980 mg, 5.104 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó con cromatografía de SiO₂. (EtOAc/CH₂Cl₂, 1:3) para proporcionar el compuesto del título (762.8 mg, 82%). MS ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₃₀H₄₅NaN₅O₈S, 658.30, encontrado, 658.30.

Ejemplo 50. Ácido (4R)-4-(tert-butoxicarbonilamino)-5-(3-(5-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanamido)-4-(fosfonooxi)fenil)-2-metilpentanoico (235)



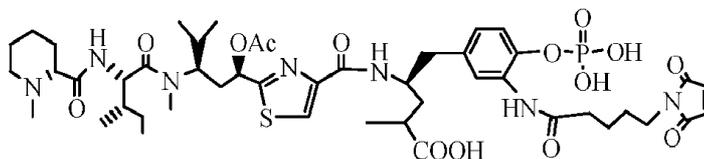
10 Al compuesto 190 (825.1 mg, 1.973 mmol) en DMF (7 ml) se añadió 5-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (23d) (711 mg, 2.417 mmol) y DIPEA (0.250 ml, 1.438 mmol), y la mezcla se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó con cromatografía C-18 (4x25 cm, v = 15 ml/min, 100% de HOAc al 1% a 75% de HOAc al 1%/MeOH al 25% en 45 minutos) para proporcionar el compuesto del título 235 (895.7 mg, 76%). MS ESI: m/z-: [M-H]⁻, calculado para C₂₆H₃₅N₃O₁₁P, 596.21, encontrado, 596.21.

15 **Ejemplo 51. Ácido (4R)-4-(tert-butoxicarbonilamino)-5-(3-(3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)propanamido)-4-(fosfonooxi)fenil)-2-metilpentanoico (236)**



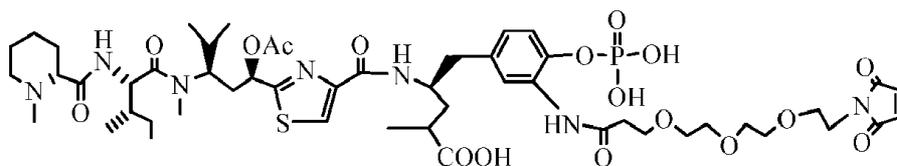
20 Al compuesto 190 (632.5 mg, 1.512 mmol) en DMF (7 ml) se añadió 2,5-dioxopirrolidin-1-il-3-(2-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)propanoato (24c) (727 mg, 1.826 mmol) y DIPEA (0.250 ml, 1.438 mmol), y la mezcla se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó con C-18 cromatografía (4x25 cm, v = 15 ml/min, 100% de HOAc al 1% a 75% de HOAc al 1%/MeOH al 25% en 45 min) para proporcionar el compuesto del título 236 (763.2 mg, 72%). MS ESI: m/z-: [M-H]⁻, calculado para C₃₀H₄₄N₃O₁₄P, 700.25, encontrado, 700.25.

Ejemplo 52. Ácido (4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-((2S,3S)-N,3-dimetil-2-((R)-1-metilpiperidina-2-carboxamido)pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxamido)-5-(3-(5-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)pentanamido)-4-(fosfonooxi)fenil)-2-metilpentanoico (239).



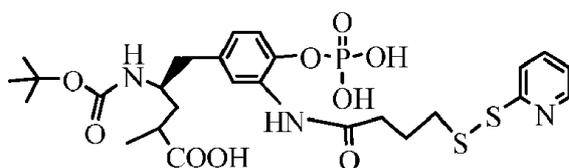
25 Se añadió el compuesto 235 (102 mg, 0.171 mmol) en 1,4-dioxano (4 ml) HCl concentrado (1 ml, 37%) y la mezcla se agitó durante 30 minutos, se evaporó a sequedad para proporcionar el compuesto crudo 237. Al compuesto crudo en DMA (5 ml) se añadieron el compuesto 234 (110 mg, 0.173 mmol) y DIPEA (30 ul, 0.172 mmol), y la mezcla se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó por cromatografía en SiO₂ (1% de HOAc en agua/acetona, 1:9~1:4) para proporcionar el compuesto del título 239 (123.2 mg, 71%) MS ESI: m/z-: [M-H]⁻, calculado para C₄₇H₆₇N₇O₁₄PS, 1016.42, encontrado, 1016.42.

30 **Ejemplo 53. Ácido (4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-((2S,3S)-N,3-dimetil-2-((R)-1-metilpiperidina-2-carboxamido)pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxamido)-5-(3-(3-(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etoxi)-propanamido)-4-(fosfonooxi)fenil)-2-metilpentanoico (240)**



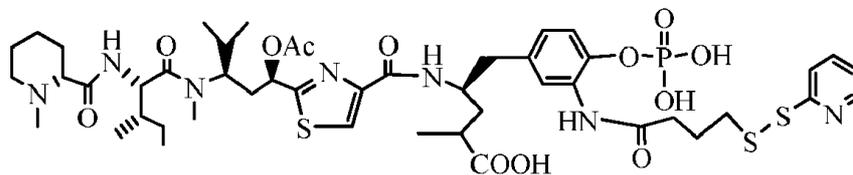
5 Al compuesto 236 (108 mg, 0.154 mmol) en 1,4-dioxano (4 ml) se añadió HCl concentrado (1 ml, 37%) y la mezcla se agitó durante 30 minutos, se evaporó a sequedad para proporcionar el compuesto crudo 238. Al compuesto crudo en DMA (5 ml) se añadieron el compuesto 234 (110 mg, 0.173 mmol) y DIPEA (30 μ l, 0.172 mmol), y la mezcla se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó por cromatografía en SiO₂ (1% HOAc en agua/acetona, 1:9~1:4) para proporcionar el compuesto del título 240 (131.2 mg, 76%) MS ESI: m/z-: [M-H]⁻, calculado para C₅₁H₇₅N₇O₁₇PS, 1120.47, encontrado, 1120.48.

Ejemplo 54. Ácido (4R)-4-(tert-butoxicarbonilamino)-2-metil-5-(4-(fosfonooxi)-3-(4-(piridin-2-il-disulfanil)butanamido)fenil) pentanoico (244).



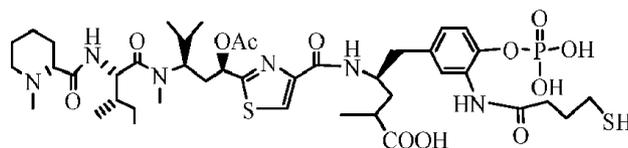
10 A una solución del compuesto 190 (548.3 mg, 1.311 mmol) en DMF (10 ml) se añadieron 4-(piridin-2-il)disulfanil-butirato de succinimidilo (550.2mg, 1.687 mmol) y DIPEA (0.18 ml, 1.03 mmol). La mezcla se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó por cromatografía sobre SiO₂ (1% de HOAc en agua/acetona, 1:9~1:4) para proporcionar el compuesto del título 244 (660.2 mg, 80%). MS ESI: m/z-: [M-H]⁻, calculado para C₂₆H₃₆N₃O₉PS₂, 628.16, encontrado, 628.16.

Ejemplo 55. Ácido (4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-((2S,3S)-N,3-dimetil-2-((R)-1-metilpiperidina-2-carboxamido) pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxamido)-2-metil-5-(4-(fosfonooxi)-3-(4-(piridin-2-il-disulfanil) butanamido)fenil) pentanoico (248)



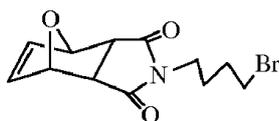
20 Al compuesto 244 (110.5 mg, 0.175 mmol) en 1,4-dioxano (4 ml) se añadió HCl concentrado (1 ml, 37%) y la mezcla se agitó a 4°C durante 30 minutos, se evaporó a sequedad para proporcionar el compuesto crudo 246. Al compuesto crudo en DMA (5 ml) se añadieron el compuesto 234 (110 mg, 0.173 mmol) y DIPEA (30 μ l, 0.172 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se evaporó y se purificó por cromatografía sobre SiO₂ (1% de HOAc en agua/acetona, 1:9~1:4) para proporcionar el compuesto del título 248 (129.1 mg, 71%). MS ESI: m/z-: [M-H]⁻, calculado para C₄₇H₆₈N₇O₁₂PS₃, 1048.38, encontrado, 1048.38.

Ejemplo 56. (Ácido 4R)-4-(2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-((2S,3S)-N,3-dimetil-2-((R)-1-metilpiperidina-2-carboxamido) pentanamido)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxamido)-5-(3-(4-mercaptobutanamido)-4-(fosfonooxi)fenil)-2-metilpentanoico (248b).



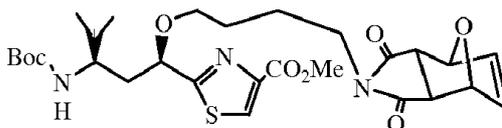
30 Al compuesto 248 (30 mg, 0.0285 mmol) en una mezcla de DMA (2 ml) y NaH₂PO₄ (0.1 M, pH 7) se añadió ditiotreitolo (20 mg, 0.129 mmol). La mezcla se agitó durante 2 h, se evaporó y se purificó por cromatografía sobre SiO₂ (1% de HOAc en agua/CH₃CN, 1:9~1:4) para proporcionar el compuesto del título 248b (22 mg, 85%). MS ESI: m/z-: [M-H]⁻, calculado para C₄₂H₆₄N₆O₁₂PS₂, 939.38, encontrado, 939.38.

Ejemplo 57. 4-(4-bromobutil)-10-oxa-4-azatriciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-eno-3,5-diona (271).



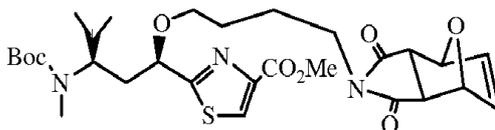
5 10-oxa-4-azatriciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-eno-3,5-diona (6.0 g, 36.35 mmol) y NaH (1.50 g, 37.50 mmol, 60% en aceite) se agitaron en DMA (60 ml) durante 1 h, luego se añadieron 1,4-dibromobutano (35.0 g, 162.10 mmol) y NaI (0.50 g, 3.33 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se inactivó con CH₃OH (0.5 ml), se evaporó, se purificó en una columna de SiO₂ (EtOAc/Hexano, 1:8) para proporcionar el compuesto del título (9.34 g, 86%). MS ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₁₂H₁₄BrNaNO₃, 322.02, encontrado, 322.02.

Ejemplo 58. 2-((1R,3R)-3-(tert-butoxicarbonilamino)-1-[4'-(3'',6''-endoxo-Δ-tetrahidroftalimido)butiloxi]-4-metilpentil) tiazol-4-carboxilato de metilo (272).



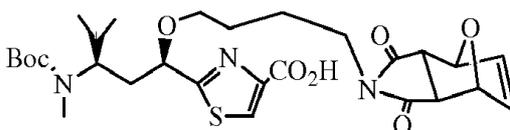
10 2-((1R,3R)-3-(tert-butoxicarbonilamino)-1-hidroxi-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo (70) (1.0 g, 2.79 mmol) y NaH (120 mg, 3.00 mmol, 60% en aceite) se agitaron en THF (30 ml) durante 20 minutos y se añadieron el compuesto 271 (1.00 g, 3.34 mmol) y NaI (50 mg, 0.33 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se inactivó con MeOH (0.5 ml), se evaporó y se purificó en una columna de SiO₂ (EtOAc/CH₂Cl₂, 1:10) para proporcionar el compuesto del título (1.36 g, 84%). MS ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₂₈H₃₉NaN₃O₈S, 600.25, encontrado, 600.25.

15 **Ejemplo 59.** 2-((1R,3R)-3-(N,N-tert-butoxicarbonilmetilamino)-1-[4'-(3'',6''-endoxo-Δ-tetrahidroftalimido)butiloxi]-4-metilpentil)tiazol-4-carboxilato de metilo (273).



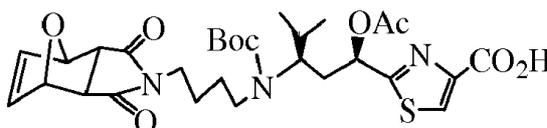
20 Al compuesto 272 (1.30 g, 2.25 mmol) y NaH (108 mg, 2.70 mmol, 60% en aceite) agitado en DMF (80 ml) durante 1 h se añadió CH₃I (460 mg, 3.24 mmol). La mezcla se agitó durante la noche, se evaporó y se purificó en una columna de SiO₂ (EtOAc/CH₂Cl₂, 1:12~1:8) para proporcionar el compuesto del título (1.01 g, 76%). MS ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₂₉H₄₁NaN₃O₈S, 614.26, encontrado, 614.26.

Ejemplo 60. Ácido 2-((1R,3R)-3-(N,N-tert-butoxicarbonilmetil-amino)-1-(4'-maleimido-butiloxi)-4-metilpentil)tiazol-4-carboxílico (274).



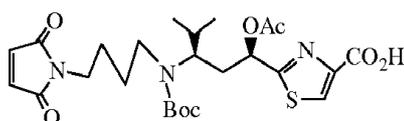
25 Al compuesto seco (273) (900 mg, 1.52 mmol) en una mezcla de 1,2-dicloroetano (30 ml) y tolueno se añadió hidróxido de trimetilestaño (400 mg, 2.21 mmol). La mezcla se agitó a 100°C durante la noche, se concentró, se purificó en una columna de SiO₂ eluida con MeOH/CH₂Cl₂/HOAc (1:10:0.01) para proporcionar el compuesto del título (730 mg, 94%). ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₄H₃₅N₃NaO₇S, 532.22, encontrado, 532.22.

30 **Ejemplo 61.** 2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-(N,N-(tert-butoxicarbonil)(4'-(3'',6''-endoxo-Δ-tetrahidroftalimido)butil)amino)-4-metilpentil)-tiazol-4-carboxilato de metilo (275)



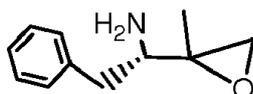
35 Al compuesto 71 (1.50 g, 3.74 mmol) y NaH (180 mg, 4.50 mmol, 60% en aceite) agitado en DMF (80 ml) durante 1 h se añadió el compuesto 271 (1.48 g, 4.94 mmol) y NaI (70 mg, 0.467 mmol). La mezcla se agitó durante una noche, se evaporó y se purificó en una columna de SiO₂ (EtOAc/CH₂Cl₂, 1:10~1:6) para proporcionar el compuesto del título (1.60 g, 69%). MS ESI: m/z+: [M+Na]⁺, calculado para C₃₀H₄₁NaN₃O₉S, 642.26, encontrado, 642.26.

Ejemplo 62. Ácido 2-((1R,3R)-1-acetoxi-3-(N,N-(tert-butoxicarbonil)(4'-maleimidobutil)amino)-4-metilpentil)-tiazol-4-carboxílico (276)



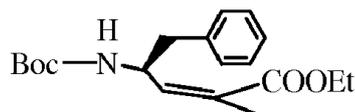
Al compuesto seco (275) (800 mg, 1.29 mmol) en una mezcla de 1,2-dicloroetano (40 ml) y tolueno se añadió hidróxido de trimetilestano (400 mg, 2.21 mmol). La mezcla se agitó a 100°C durante la noche, se filtró a través de una columna corta de SiO₂, se lavó la columna con MeOH/CH₂Cl₂/HOAc (1:5:0.01) y se evaporó a sequedad. A la mezcla seca cruda en piridina (15 ml) se añadió Ac₂O (0.3 ml, 3.17 mmol) a 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, se evaporó y se purificó en una columna de SiO₂ eluida con MeOH/CH₂Cl₂/HOAc (1:10:0.01) para proporcionar el compuesto del título (578.4 mg, 74%). ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₉H₃₉N₃NaO₉S, 628.24, encontrado, 628.24.

Ejemplo 63. Fenilalanin-cetoepóxido



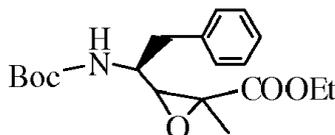
A N-Boc fenilalanin-cetoepóxido (Sun, L. et al, J. Mol. Catalysis A: Chem., 2005, 234 (1-2), 29-34) (300 mg, 1.08 mmol) en 1, 4-dioxano (8 ml) a 0°C se añadió ácido clorhídrico (37%, 2 ml). La mezcla se agitó durante 1 hora, momento en el cual la TLC mostró un consumo completo de material de partida. La solución resultante se diluyó con tolueno (10 ml), se evaporó y cristalizó con EtOH/Hexano para producir la sal HCl del compuesto del título (201 mg, 87%). ESI: m/z: [M+H]⁺, calculado para C₁₁H₁₆NO, 178.12, encontrado, 178.12.

Ejemplo 64. (S,E)-etil5-fenil-4-(tert-butoxicarbonilamino)-2-metilpent-2-enoato (327)



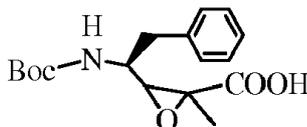
Al éster metílico de L-t-Boc-fenilalanina 326 (5.60 g, 20.05 mmol) en CH₂Cl₂ (80 ml) a -78°C se añadió gota a gota DIBAL (40 ml, 40 mmol, 1.0 M) en CH₂Cl₂. Después de agitar a -78°C durante 45 minutos, la solución de iluro preparada a partir de bromuro de 1-(1-etoxicarbonil etil)-trifenilfosfonio (18.0 g, 40.64 mmol) y KOtBu (5.00 g, 44.64 mmol) en CH₂Cl₂ (80 ml) se añadió a temperatura ambiente a -78°C. Después de agitar a -78°C durante 1 h y temperatura ambiente durante la noche, la mezcla se vertió en 1 L de solución de NaH₂PO₄ (sat.) con agitación vigorosa. Se separó y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se concentraron y se purificaron mediante cromatografía en SiO₂ (EtOAc/Hexano, 1:7~1:5) para proporcionar 5.50 g (83% de rendimiento) del compuesto del título. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₉H₂₇NNaO₄, 356.19, encontrado, 356.20.

Ejemplo 65. 3-((S)-1-(tert-butoxicarbonilamino)-2-feniletil)-2-metiloxirano-2-carboxilato de etilo (328)

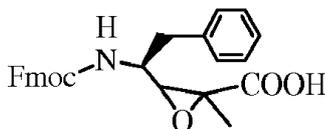


Al compuesto 327 (5.0 g, 15.0 mmol) en CH₂Cl₂ (80 ml) se añadió ácido 3-cloroperoxisbenzoico (5.5 g, 22.3 mmol) y la mezcla se agitó durante una noche, se diluyó con NaHCO₃ (25 ml, sat.), se separó y extrajo la solución acuosa con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, se evaporaron y se purificaron en una columna de SiO₂ (EtOAc/Hexano 1:4) para proporcionar 4.71 g (rendimiento del 90%) del compuesto del título. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₉H₂₇NNaO₅, 372.19, encontrado, 372.20.

Ejemplo 66. Ácido 3-((S)-1-(tert-butoxicarbonilamino)-2-feniletil)-2-metiloxirano-2-carboxílico (329)



A una solución de LiOH (5.0 g, 208.7 mmol) en H₂O (60 ml) se añadió una solución del compuesto (328) (4.70 g, 13.45 mmol) en THF (100 ml). Después de agitar durante 1 h, la mezcla se concentró, se vertió en H₂O (150 ml) y la mezcla se ajustó a pH~4 con HCl acuoso 4M. La mezcla se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄, se concentró y se purificó por cromatografía en SiO₂ (MeOH/DCM/HOAc 1:10:0.01) para proporcionar (3.97 g, 92%) del compuesto del título. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₁₇H₂₃NNaO₅, 344.16, encontrado 344.16.

Ejemplo 67. Ácido 3-((S)-1-(((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonilamino)-2-feniletil)-2-metiloxirano-2-carboxílico (331)

5 A una solución del compuesto (329) (3.90 g, 12.14 mmol) en CH₂Cl₂ (40 ml) a 0°C, se añadió TFA (10 ml) y la mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos, se diluyó con tolueno, se evaporó a sequedad para formar la sal de TFA cruda del compuesto 330. En una solución de Na₂CO₃ (5.0 g, 47.16 mmol) en una mezcla de H₂O (60 ml) y etanol (30 ml) se añadieron el compuesto crudo 330 y Fmoc-Cl (3.70 g, 14.30 mmol). Después de agitar durante 6 h, la mezcla se concentró, se vertió en H₂O (150 ml) y la mezcla se ajustó a pH ~4 con HCl acuoso 4 M. La mezcla se extrajo con EtOAc, se secó sobre Na₂SO₄, se concentró y se purificó por cromatografía en SiO₂ (MeOH/DCM/HOAc 1:10:0.01) para proporcionar 3.87 g (72% de rendimiento en 2 etapas) del compuesto del título. ESI: m/z: [M+Na]⁺, calculado para C₂₇H₂₅NNaO₅, 466.17, encontrado 466.17.

Ejemplo 68. Procedimiento general de acoplamiento de péptidos en solución:

15 La sal de HCl de una amina (1 eq) se disolvió en CH₂Cl₂ o DMF (0.2 M) y se enfrió a 4°C en un baño de hielo, seguido de la adición del aminoácido apropiado protegido con Boc (1.3 eq), EDC (2 eq), o TBTU (2 eq), o PyBrOP (2 eq), HOBt (1.5 eq) y DIPEA (3.5 eq). La reacción se dejó calentar lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 15 h, después de lo cual se diluyó con EtOAc y se lavó sucesivamente con soluciones acuosas de HCl 1 M, bicarbonato de sodio saturado, agua y cloruro de sodio saturado. La capa orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. La purificación por cromatografía en columna (MeOH al 0% a 20%:CH₂Cl₂) produjo péptido protegido con Boc.

Ejemplo 69. Procedimiento general de desprotección de Boc:

20 El aminoácido protegido con Boc se disolvió en TFA al 20% en CH₂Cl₂ o HCl 4 M en dioxano y se agitó durante 30 minutos, o hasta que la reacción se consideró completa por TLC. La solución se concentró luego a presión reducida para dar la sal TFA o HCl del péptido. La sal de TFA del péptido se coevaporó con HCl al 2% en CH₂Cl₂/Tolueno durante 3~4 veces para generar la sal de HCl.

Ejemplo 70. Procedimiento general de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS):

25 Para Boc SPPS se utilizó resina Merrifield o resina PAM modificada o resina MBHA. Para Fmoc SPPS se utilizó resina Wang, o resina de 2-clorotritilo, o HMPB, resina MBHA. El pretratamiento de la resina (prehinchamiento) y la primera carga de un compuesto amino se realizaron siguiendo las etiquetas o notas del fabricante. Los aminoácidos protegidos con Boc unidos a la resina se desprotegeron con TFA al 20% en CH₂Cl₂ o HCl 3M en dioxano durante 30 minutos y se lavaron con DMF, MeOH, DIPEA al 50% (iPr₂Net) en CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂. Para los pasos que implican la desprotección de múltiples aminas libres, este paso se repitió una vez antes de la acilación para garantizar la integridad de la reacción. Los aminoácidos protegidos con Fmoc unidos a resina se desprotegeron con piperidina al 20% en DMF durante 30 minutos y se lavaron con DMF, MeOH y CH₂Cl₂. Para los pasos que implican la desprotección de múltiples aminas libres, este paso se repitió una vez antes de la acilación para garantizar la integridad de la reacción. Las perlas de amina libre se suspendieron en una solución del aminoácido protegido (3 eq por eq de amina libre), TBTU o PyBrOP (3 eq por eq de amina libre) y DIPEA (5 eq por eq de amina libre) y se mezclaron durante 4 h, y luego se lavó con DMF, MeOH y CH₂Cl₂. Para los pasos que implican la acilación de múltiples aminas libres, el procedimiento de acoplamiento se repitió una vez antes de la desprotección para garantizar la integridad de la reacción. Estos pasos se repitieron hasta que se sintetizó el péptido deseado.

Ejemplo 71. Escisión general de péptidos de resina Wang o resina de 2-clorotritilo:

40 El péptido unido con la resina Wang se mezcló con 50% de TFA en CH₂Cl₂ y triisopropilsilano (1-5%) o el péptido unido con resina de 2-clorotritilo se mezcló con 1% de TFA en CH₂Cl₂. Se mezcló durante 2 h y luego se filtró. La resina se lavó con CH₂Cl₂ (3x30 ml), metanol (3x30 ml), que se combinaron con el filtrado y se evaporaron hasta casi sequedad. Luego se añadió Et₂O frío para precipitar el péptido desprotegido deseado.

Ejemplo 72. Escisión general de péptidos con resina Merrifield, MBHA o PAM:

45 El péptido unido a las resinas se mezcló con HF/Me₂S/anisol (10:1:1) o CH₃SO₃H/Me₂S/anisol (20:1:1), o HF/anisol/Me₂S/p-tiocresol (10:1:1:0.2) para péptidos que contienen Cys mezclado durante 2 h, se concentró bajo una corriente de N₂, diluido con TFA y se filtró. La resina se lavó con CH₂Cl₂ (3x30 ml), metanol (3x30 ml), que se combinaron con el filtrado y se condensaron a presión reducida hasta casi sequedad. Luego se añadió Et₂O frío para precipitar el péptido desprotegido deseado.

Ejemplo 73. Purificación cromatográfica:

La mezcla de péptidos crudos se purificó luego mediante cromatografía en columna de SiO₂ (10% a 25% de MeOH en CH₂Cl₂) o mediante una HPLC de fase reversa eluida con gradiente de 100% de agua (que opcionalmente contenía 1% de HOAc) hasta 30% de agua (que contenía 1% de HOAc)/70% de metanol en 1 h, se combinaron las fracciones, se evaporaron para dar la protección deseada.

5 Ejemplo 74. Preparación del conjugado.

Una molécula de unión, preferiblemente un anticuerpo, puede conjugarse con agentes antimetabólicos de esta invención a través de enlaces amida, tiol éter o enlace disulfuro. En un experimento de generación de tioles libres en un anticuerpo, los anticuerpos (mAbs) (>5 mg/ml) en PBS que contenía borato de sodio 50 mM, pH 8.0, se trataron con ditiotreitól (10 mM final) a 35°C durante 30 min. Después de la filtración en gel (G-25, PBS que contenía EDTA 1 mM), la determinación de tiol usando el reactivo de Ellman [5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico)] indicó que había aproximadamente ocho tioles por mAb. Los tioles libres también se introdujeron mediante la conjugación del reactivo de Traut (2-iminotiolano) (Jue, R., et al. *Biochem.* 1978, 17(25): 5399-5405), o mediante la conjugación de SATP (N-succinimidil-S-acetilpropionato) o enlazadores de SAT(PEG)₄ a pH 7 ~8, seguido de la liberación del grupo SH por tratamiento con hidroxilamina (Duncan, R., et al. *Anal. Biochem.* 1983, 132, 68-73, Fuji, N. et al., *Chem. Pharm. Bull.* 1985, 33, 362-367). En promedio, se introdujeron 5~8 de tioles libres en mAbs.

A los mAbs que contenían tioles libres a 4°C se añadieron el fármaco que portaba maleimida o bromoacetamida (se requirió regulador de borato de sodio 0.5 M pH 9 para promover la alquilación de mAb con bromoacetamida) (1.2-1.5 equivalentes de derivados de fármaco/relación de grupo SH) en DMA frío (2-20% v/v). Después de 1-2 h, las reacciones se extinguieron con exceso de cisteína; los conjugados se concentraron por ultrafiltración centrífuga, se filtraron en gel (G-25, PBS) y se esterilizaron por filtración. La concentración de proteína y la carga del fármaco se determinaron mediante análisis espectral a 280 y 252 nm, respectivamente. Se usó HPLC de exclusión por tamaño para determinar el porcentaje de monómero de cada conjugado preparado, y RP-HPLC estableció que había menos del 0.5% de fármaco inactivado con cisteína no conjugado. El conjugado resultante era monomérico y contenía, en promedio, agentes antimetabólicos 3.2-4.2 unidos por molécula de anticuerpo para esta conjugación unida a tiol éter.

Para la conjugación a través de conectores DMPS, SMDP, SMPT, SPP, SPDP, SPDB, SMCC o SM(PEG)_n. Se incubó una solución de mAb (>5 mg/ml) en regulador acuoso (PBS 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM) a pH 6.5-7.5 durante 2 h con un exceso molar de 6 a 10 veces de un conector. La mezcla de reacción se purificó a través de una columna de filtración en gel Sephadex G25 para eliminar el material de bajo peso molecular. (La concentración del anticuerpo se determinó espectrofotométricamente si los conectores contenían un piridiltio. Los coeficientes para el anticuerpo $\epsilon_{280nm} = 2067550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una alícuota del anticuerpo modificado se trató con un exceso (>20 equiv) de ditiotreitól y la liberación de piridina-2-tiona se determinó utilizando los coeficientes de extinción conocidos de $\epsilon_{843nm} = 8080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{280nm} = 5100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para piridina-2-tiona). El anticuerpo modificado se trató con 1.2~1.5 equivalentes de un agente antimetabólico que portaba un grupo tiol. La mezcla de reacción se incubó durante 5-18 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó mediante una columna de filtración en gel Sephadex G25 para eliminar el fármaco no conjugado y otras especies de bajo peso molecular. La concentración del conjugado se determinó espectrofotométricamente a 280 y 252 nm. El conjugado resultante era monomérico y contenía, en promedio, 3,2-4,5 moléculas de agente antimetabólico unidas por molécula de anticuerpo.

Ejemplo 75. Ensayos de citotoxicidad in vitro.

BJAB (linfoma de Burkitt), células BT-474 (carcinoma de mama), Namalwa (linfoma de Burkitt humano), Ramos (linfoma de Burkitt humano), COLO 205 (adenocarcinoma de colon humano) y A375 (melanoma maligno humano) eran de ATCC. La línea de tumor de mama KPL-4 era del Dr. J. Kurebayashi (Kurebayashi, J. et al. *Br J Cancer* 1999; 79: 707-17). Los cultivos se mantuvieron en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10%. Todas las líneas celulares se cultivaron en una incubadora humidificada a 37°C, 6% de CO₂. El estudio de citotoxicidad se realizó utilizando un ensayo clonogénico similar a una referencia descrita (Franken, et al, *Nature Protocols* 1, 2315 - 2319 (2006)). Las líneas celulares de prueba se sembraron en placas de cultivo de 6 pozos a un número constante de 5000 células por pozo. Las células se incubaron con concentraciones variables (1 pM a 50 nM) del agente de prueba (los agentes antimetabólicos o sus conjugados) durante 72 h. Luego se aspiró el medio de las placas y se reemplazó con medio nuevo. Se permitió que los cultivos crecieran y formaran colonias durante un total de 7 a 10 días después de la siembra. Los cultivos se fijaron y se tiñeron con 0.2% de violeta cristal en 10% de formalina/PBS, y se contaron las colonias. La eficacia de la siembra de las células no tratadas (medio solo) se determinó dividiendo el número de colonias contadas por el número de células en placa. La fracción superviviente de células expuestas a un agente tóxico se determinó dividiendo el número de colonias en los pozos expuestos al agente por el número de colonias en los pozos de control.

Referencias:

- 55 Zanda, M.; et al. *Can. Pat. Appl.* CA 2710693 (2011).
 Chai, Y.; et al. *Eur. Pat. Appl.* 2174947 (2010), PCT WO 2010034724.
 Leamon, C.; et al, PCT WO 2010033733, WO 2009002993..

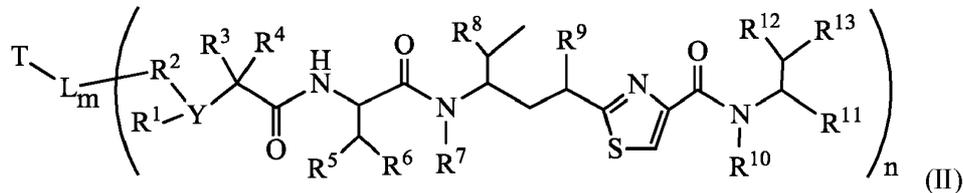
- Ellman, J.; et al, PCT WO 2009134279; PCT WO 2009012958
Matschiner, G.; et al, PCT WO 2009095447.
Vlahov, I.; et al, PCT WO 2009055562, WO 2008112873.
Low, P.; et al, PCT WO 2009026177.
- 5 Richter, W., PCT WO 2008138561.
Kjems, J.; et al, PCT WO 2008125116.
Davis, M.; et al, PCT WO 2008076333.
Diener, J.; et al, U.S. Pat. Appl. 20070041901, WO 2006096754
Matschiner, G.; et al, PCT WO 2006056464.
- 10 Vaghefi, F.; et al, PCT WO 2006033913
Doemling, A., Ger. Offen. DE 102004030227; PCT WO 2004005327; WO 2004005326; WO 2004005269.
Stanton, M.; et al, U.S. Pat. Appl. Publ. 20040249130.
Hoefle, G.; et al, Ger. Offen. DE 10254439 ; DE 10241152; DE 10008089.
Leung, D.; et al, PCT WO 2002077036.
- 15 Reichenbach, H.; et al, Ger. Offen. DE 19638870
Shibue, T., et al., Bioorg Med Chem Lett, 2011. 21(1): p. 431-4.
Floyd, W.C., 3rd, et al., ChemMedChem, 2011. 6(1): p. 49-53.
Shibue, T., et al., Total Syntheses of Tubulysins. Chemistry, 2010.
Kubicek, K., et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2010. 49(28): p. 4809-12.
- 20 Chai, Y., et al., Chem Biol, 2010. 17(3): p. 296-309.
Chandrasekhar, S., et al, J Org Chem, 2009. 74(24): p. 9531-4.
Pando, O., et al., Org Lett, 2009. 11(24): p. 5567-9.
Reddy, J.A., Mol Pharm, 2009. 6(5): p. 1518-25.
Ullrich, A., et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2009. 48(24): p. 4422-5.
- 25 Ullrich, A.; et al, European J. Org. Chem. 2009, 36, 6367-6378
Schluep, T., et al., Clin Cancer Res, 2009. 15(1): p. 181-9.
Balasubramanian, R., et al., J Med Chem, 2009. 52(2): p. 238-40.
Leamon, C.P., et al., Cancer Res, 2008. 68(23): p. 9839-44.
Vlahov, I.R., et al., Bioorg Med Chem Lett, 2008. 18(16): p. 4558-61.
- 30 Patterson, A.W., et al, J Org Chem, 2008. 73(12): p. 4362-9.
Balasubramanian, R., et al., Bioorg Med Chem Lett, 2008. 18(9): p. 2996-9.
Raghavan, B., et al., J Med Chem, 2008. 51(6): p. 1530-3.
Richter, C.D., et al., Nat Chem Biol, 2008. 4(1): p. 75-81.
Patterson, A.W., et al., Chemistry, 2007. 13(34): p. 9534-41.
- 35 Wang, Z., et al., Chem Biol Drug Des, 2007. 70(2): p. 75-86.
Sani, M., et al., Angew Chem Int Ed Engl, 2007. 46(19): p. 3526-9.
Wipf, P. et al, Org Lett, 2007. 9(8): p. 1605-7.

- Sasse, F., et al, *Nat Chem Biol*, 2007. 3(2): p. 87-9.
- Peltier, H.M., et al., *J Am Chem Soc*, 2006. 128(50): p. 16018-9.
- Domling, A., et al., *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. 45(43): p. 7235-9.
- Khalil, M.W., et al., *Chembiochem*, 2006. 7(4): p. 678-83.
- 5 Kaur, G., et al., *Biochem J*, 2006. 396(2): p. 235-42.
- Wipf, P., et al, *Org Lett*, 2004. 6(22): p. 4057-60.
- Steinmetz, H., et al., *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. 43(37): p. 4888-92.
- Friestad, G.K., et al, *Org Lett*, 2004. 6(19): p. 3249-52.
- Sandmann, A., et al, *Chem Biol*, 2004. 11(8): p. 1071-9.
- 10 Sasse, F., et al., *J Antibiot (Tokyo)*, 2000. 53(9): p. 879-85.

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado que es:

A. un conjugado que tiene la Fórmula (II):



5 y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma,

en donde T es un ligando de direccionamiento o de unión; L es un conector liberable que se conecta a una molécula dentro del soporte de forma independiente; n es 1-20 y m es 1-10;

la porción dentro del corchete redondo es un potente agente antimitótico en donde R¹, R², R³ y R⁴ son independientemente C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de heterocíclico, carbocíclico, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo; C₃-C₈ de arilo, Ar-alquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; o dos R pueden ser 3-7 miembros de un sistema de anillo carbocíclico, cicloalquilo o heterocíclico, heterocicloalquilo; Y es N o CH; además, R¹, R³ y R⁴ pueden ser H y R² puede estar ausente; en donde Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de tres a catorce átomos de carbono;

R⁵, R⁶, R⁸ y R¹⁰ se seleccionan independientemente de H y C₁-C₄ de alquilo o heteroalquilo;

R⁷ se selecciona independientemente de H, -R¹⁴ o -R¹⁴C(=O)X¹R¹⁵; -R¹⁴X¹R¹⁵; en donde R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan independientemente de C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo; C₃-C₈ de arilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroaralquilo, alquilcarbonilo; X¹ se selecciona de O, S, S-S, NH o NR¹⁴;

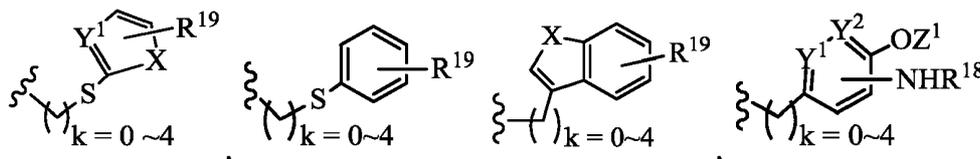
R⁹ es independientemente H, -O-, -OR¹⁴, -OC(=O)R¹⁴-, -OC(=O)NHR¹⁴-, -OC(=O)R¹⁴SSR¹⁵, -OP(=O)(OR¹⁴), o -OR¹⁴OP(=O)(OR¹⁵), en donde R¹⁴ y R¹⁵ son independientemente C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃-C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroaralquilo, alquilcarbonilo;

R¹¹ es independientemente H, R¹⁴, -R¹⁴C(=O)R¹⁶, -R¹⁴X²R¹⁶, -R¹⁴C(=O)X², en donde X² es -O-, -S-, -NH-, -N(R¹⁴), -O-R¹⁴-, -S-R¹⁴-, -S(=O)-R¹⁴-, o -NHR¹⁴-; en donde R¹⁴ es C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃-C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroaralquilo, alquilcarbonilo; R¹⁶ es H, -OH, -R¹⁴, o de una a cuatro unidades de aminoácidos;

R¹² es independientemente R¹⁴, -OH, -SH, -NH₂, =NH, =NNH₂, -NH(R¹⁴), -OR¹⁴, COR¹⁶, COOR¹⁴-, C(O)NH₂, C(O)NHR¹⁴, -SR¹⁴, -S(=O)R¹⁴, -P(=O)(OR¹⁶)₂, -OP(=O)(OR¹⁶)₂, -CH₂OP(=O)(OR¹⁶)₂, -SO₂R¹⁶; en donde R¹⁴ es independientemente C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃-C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroaralquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; R¹⁶ es H, OH, R¹⁴ o de una a cuatro unidades de aminoácidos; y

R¹³ es C₁-C₁₀ de alquilo, heteroalquilo, alquilácido, alquilamida, alquilamina o Ar; en donde Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de cuatro a diez átomos de carbono;

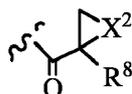
Además, R¹² puede ser H cuando R¹⁰ no es H, o cuando R¹³ es:



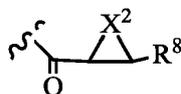
en donde Z¹ es H, CH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, C(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, PO(OR¹⁸)₂, P(O)(OR¹⁸)OP(O)(OR¹⁸)₂, C(O)R¹⁸, C(O)NHR¹⁸, SO₂(OR¹⁸), glucósidos C₄-C₁₂ o C₁-C₈ de alquilo, carboxialquilo, heterocíclico; en donde R¹⁸ es H, C₁-C₈ de alquilo, carboxialquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico; C₃-C₈ de arilo, alquilcarbonilo;

R¹⁹ es H, OH, NH₂, OSO₂(OR¹⁸), XCH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, XPO(OR¹⁸)₂, XC(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, XC(O)R¹⁸, XC(O)NHR¹⁸, C₁-C₈ de alquilo, carboxialquilo, derivado de ácido carboxílico; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico; C₃-C₈ de arilo, alquilcarbonilo; o sales farmacéuticas; X es O, S, NH; Y¹ e Y² son N o CH respectivamente;

o R¹² puede ser H cuando R¹¹ es:



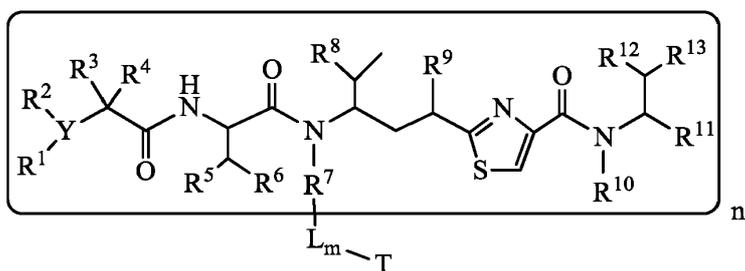
o



en donde X² es O, S, N-R⁸; R⁸ es H, C₁-C₆ de alquilo o heteroalquilo;

5 o

B. un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (III):



(III)

y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

10 en donde T es un ligando de direccionamiento o de unión; L es un conector liberable que se conecta a una molécula dentro del soporte de forma independiente; n es 1-20 y m es 1-10;

la porción dentro del corchete es un potente agente o fármaco antimitótico en donde R¹, R², R³, y R⁴ son independientemente C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de heterocíclico, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo; C₃-C₈ de arilo, Ar-alquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; o dos R pueden ser 3-7 miembros de un sistema de anillo carbocíclico, cicloalquilo o heterocíclico, heterocicloalquilo; Y es N o CH; además, R¹, R³ y R⁴ pueden ser H; y R² puede estar ausente; en donde Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de tres a catorce átomos de carbono;

15 R⁵, R⁶, R⁸ y R¹⁰ se seleccionan independientemente de H y C₁-C₄ de alquilo o heteroalquilo;

R⁷ se selecciona independientemente de R¹⁴- o -R¹⁴C(=O)X¹R¹⁵-, o -R¹⁴X¹R¹⁵-; en donde R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan independientemente de C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alquenilo, alquinilo, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo; C₃-C₈ de arilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo; X¹ se selecciona de O, S, S-S, NH o NR¹⁴;

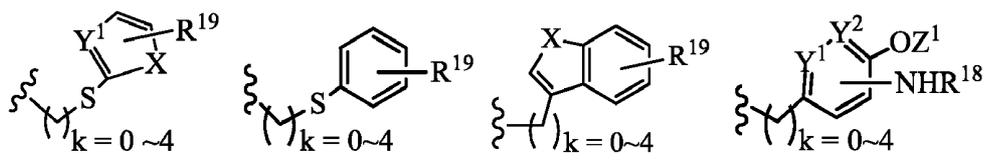
20 R⁹ es independientemente H, -O-, -OR¹⁴, -OC(=O)R¹⁴-, -OC(=O)NHR¹⁴, -OC(=O)R¹⁴SSR¹⁵, OP(=O)(OR¹⁴), u OR¹⁴OP(=O)(OR¹⁵), en donde R¹⁴ y R¹⁵ son independientemente C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alquenilo, alquinilo, heterocíclico, carbocíclico; C₃-C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo;

25 R¹¹ es independientemente H, R¹⁴, -R¹⁴C(=O)R¹⁶, -R¹⁴X²R¹⁶, -R¹⁴C(=O)X², en donde X² es -O-, -S-, -NH-, -N(R¹⁴)-, -O-R¹⁴-, -S-R¹⁴-, -S(=O)-R¹⁴-, o -NHR¹⁴-; en donde R¹⁴ es C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alquenilo, alquinilo, heterocíclico, carbocíclico; C₃-C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo; R¹⁶ es H, OH, R¹⁴, o de una a cuatro unidades de aminoácidos;

30 R¹² es independientemente R¹⁴, -OH, -SH, -NH₂, =NH, =NNH₂, -NH(R¹⁴), -OR¹⁴, COR¹⁶, COOR¹⁴, C(O)NH₂, C(O)NHR¹⁴, -SR¹⁴, -S(=O)R¹⁴, -P(=O)(OR¹⁶)₂, -OP(=O)(OR¹⁶)₂, -CH₂OP(=O)(OR¹⁶)₂, -SO₂R¹⁶; en donde R¹⁴ es independientemente C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alquenilo, alquinilo, heterocíclico, carbocíclico; C₃-C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo; R¹⁶ es H, OH, R¹⁴ o de una a cuatro unidades de aminoácidos; y

35 R¹³ es C₁-C₁₀ de alquilo, heteroalquilo, alquilácido, alquilamida, alquilamina o Ar; en donde Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de cuatro a diez átomos de carbono;

Además, R¹² puede ser H cuando R¹⁰ no es H, o cuando R¹³ es:



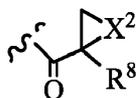
en donde Z¹ es H, CH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, C(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, PO(OR¹⁸)₂, P(O)(OR¹⁸)OP(O)(OR¹⁸)₂, C(O)R¹⁸, C(O)NHR¹⁸, SO₂(OR¹⁸), glucósidos C₄-C₁₂ o C₁-C₈ de alquilo, carboxialquilo, heterocíclico; en donde R¹⁸ es H, alquilo C₁-C₈ de carboxialquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alquenilo, alquinilo, heterocíclico; C₃-C₈ de arilo, alquilcarbonilo;

- 5 R¹⁹ es H, OH, NH₂, OSO₂(OR¹⁸), XCH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, XPO(OR¹⁸)₂, XC(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, XC(O)R¹⁸, XC(O)NHR¹⁸, C₁-C₈ de alquilo, carboxialquilo, derivado de ácido carboxílico; C₂-C₈ de alquenilo, alquinilo, heterocíclico; C₃-C₈ de arilo, alquilcarbonilo; o sales farmacéuticas; X es O, S, NH;

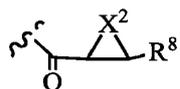
Y¹ e Y² son N o CH respectivamente;

o R¹² puede ser H cuando R¹¹ es:

10



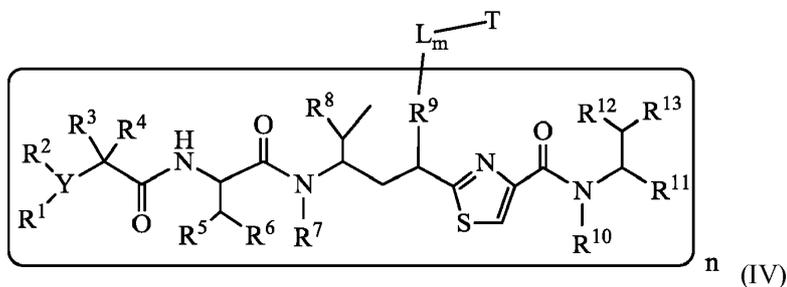
o



en donde X² es O, S, N-R⁸; R⁸ es H, C₁-C₆ de alquilo o heteroalquilo;

o

- 15 C. un conjugado que tiene la estructura de Fórmula (IV):



y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

20

en donde T es un ligando de direccionamiento o de unión; L es un conector liberable que se conecta a una molécula dentro del soporte de forma independiente; n es 1-20 y m es 1-10; la porción dentro del corchete es un potente agente o fármaco antimotórico en donde R¹, R², R³ y R⁴ son independientemente C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de heterocíclico, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo; C₃-C₈ de arilo, Ar-alquilo, heteroalquilcicloalquilo, alquilcarbonilo; o dos R pueden ser 3-7 miembros de un sistema de anillo carbocíclico, cicloalquilo o heterocíclico, heterocicloalquilo; Y es N o CH; además, R¹, R³ y R⁴ pueden ser H; y R² puede estar ausente; en donde Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de tres a catorce átomos de carbono;

25

R⁵, R⁶, R⁸ y R¹⁰ se seleccionan independientemente de H y C₁-C₄ de alquilo o heteroalquilo;

R⁷ se selecciona independientemente de H, R¹⁴, o -R¹⁴C(=O)X¹R¹⁵, o -R¹⁴X¹R¹⁵; en donde R¹⁴ y R¹⁵ se seleccionan independientemente de C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alquenilo, alquinilo, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo; C₃-C₈ de arilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo; X¹ se selecciona de O, S, S-S, NH o NR¹⁴-,

30

R⁹ es independientemente -O-, -OR¹⁴-, -OC(=O)R¹⁴-, -OC(=O)NHR¹⁴-, -OC(=O)R¹⁴SSR¹⁵-, -OP(=O)(OR¹⁴)O-, en donde R¹⁴, R¹⁵ son independientemente alquilo C₁-C₈, heteroalquilo; arilo C₃-C₈, heteroarilo, heterocíclico, carbocíclico, cicloalquilo, alquilcicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilcicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo o sales farmacéuticas;

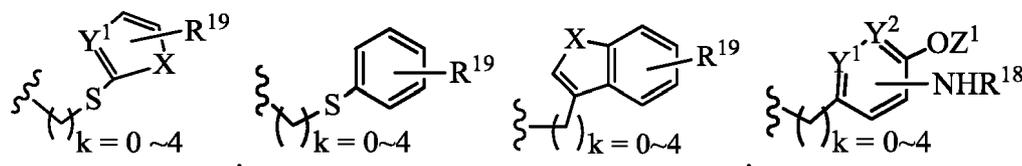
Además, R⁹ puede estar ausente;

R¹¹ es independientemente H, R¹⁴, -R¹⁴C(=O)R¹⁶, -R¹⁴X²R¹⁶, -R¹⁴C(=O)X², en donde X² es -O-, -S-, -NH-, -N(R¹⁴)-, -O-R¹⁴-, -S-R¹⁴-, -S(=O)-R¹⁴-, o -NHR¹⁴-; en donde R¹⁴ es C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃-C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilocicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilocicloalquilo, heteroalquilo, alquilcarbonilo; R¹⁶ es H, OH, R¹⁴, o de una a cuatro unidades de aminoácidos;

R¹² es independientemente R¹⁴, -OH, -SH, -NH₂, =NH, =NNH₂, -NH(R¹⁴), -OR¹⁴, COR¹⁶, COOR¹⁴, C(O)NH₂, C(O)NHR¹⁴, -SR¹⁴, -S(=O)R¹⁴, -P(=O)(OR¹⁶)₂, -OP(=O)(OR¹⁶)₂, -CH₂OP(=O)(OR¹⁶)₂, -SO₂R¹⁶; en donde R¹⁴ es independientemente C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico, carbocíclico; C₃-C₈ de arilo, cicloalquilo, alquilocicloalquilo, heterocicloalquilo, heteroalquilo, heteroalquilocicloalquilo, alquilcarbonilo; R¹⁶ es H, OH, R¹⁴ o de una a cuatro unidades de aminoácidos; y

R¹³ es C₁-C₁₀ de alquilo, heteroalquilo, alquilácido, alquilamida, alquilamina o Ar; en donde Ar se refiere a un grupo aromático o heteroaromático, compuesto de uno o varios anillos, que comprende de cuatro a diez átomos de carbono;

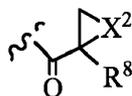
Además, R¹² puede ser H cuando R¹⁰ no es H, o cuando R¹³ es:



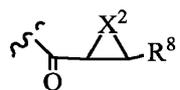
en donde Z¹ es H, CH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, C(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, PO(OR¹⁸)₂, C(O)R¹⁸, C(O)NHR¹⁸, SO₂(OR¹⁸), glucósidos C₄-C₁₂, o C₁-C₈ de alquilo, carboxialquilo, heterocíclico; en donde R¹⁸ es H, alquilo C₁-C₈ de carboxialquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico; C₃-C₈ de arilo, alquilcarbonilo; R¹⁹ es H, OH, NH₂, OSO₂(OR¹⁸), XCH₂OP(O)(OR¹⁸)₂, XC(O)OP(O)(OR¹⁸)₂, XPO(OR¹⁸)₂, XC(O)R¹⁸, XC(O)NHR¹⁸, C₁-C₈ de alquilo, carboxialquilo, derivado de ácido carboxílico; C₂-C₈ de alqueno, alquino, heterocíclico; C₃-C₈ de arilo, alquilcarbonilo; o sales farmacéuticas; X es O, S, NH;

Y¹ e Y² son N o CH respectivamente;

o R¹² puede ser H cuando R¹¹ es:



o



en donde X² es O, S, N-R⁸; R⁸ es H, C₁-C₆ de alquilo o heteroalquilo.

2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, cuando dos R de R¹, R², R³ y R⁴ son 3-7 miembros de un sistema de anillo carbocíclico, cicloalquilo o heterocíclico, heterocicloalquilo, seleccionándose esas dos R de R¹ y R², R² y R³, R³ y R⁴, R⁵ y R⁶, y R¹² y R¹³.

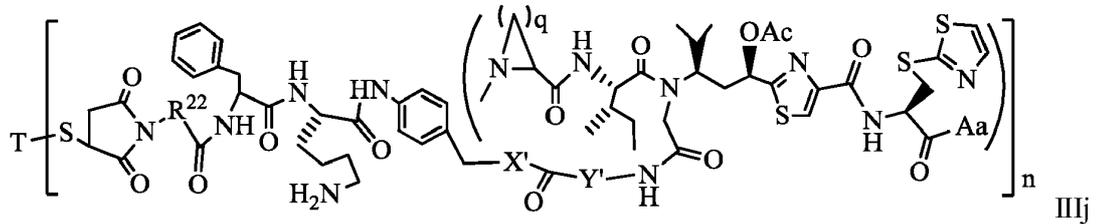
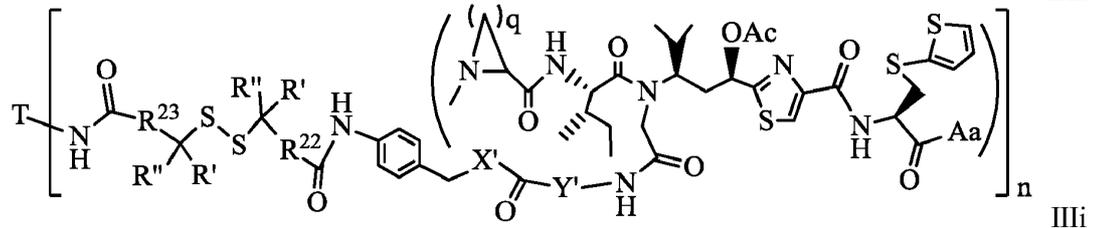
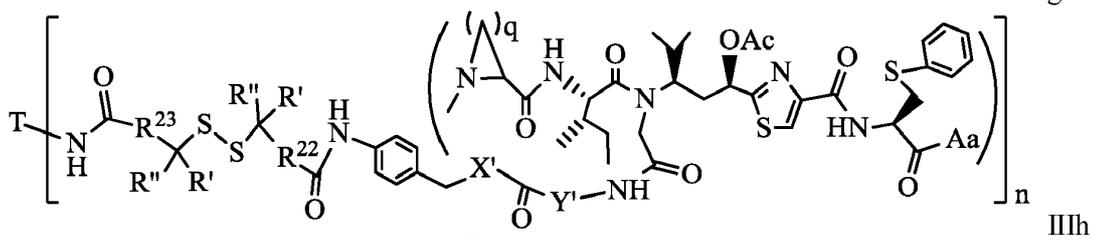
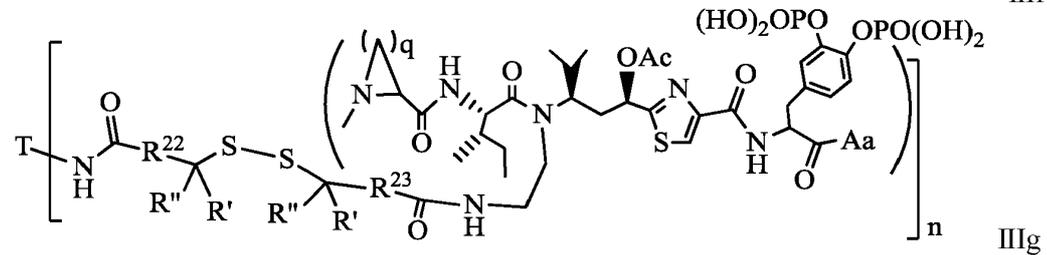
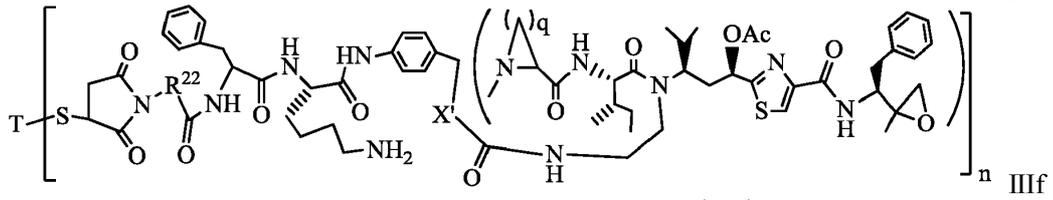
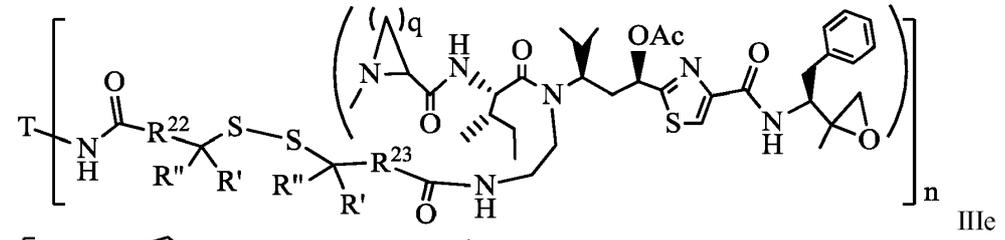
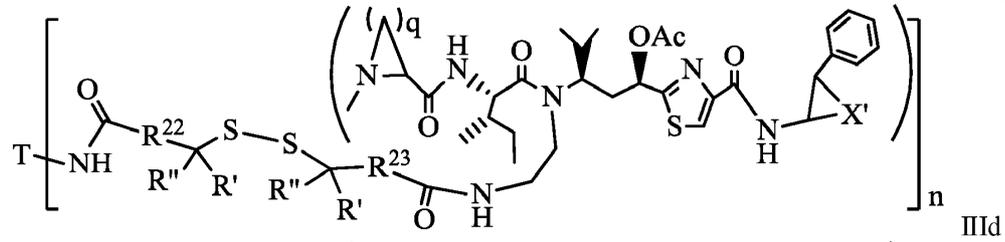
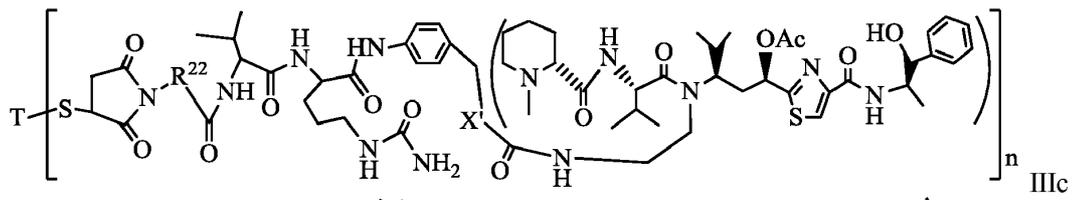
3. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde:

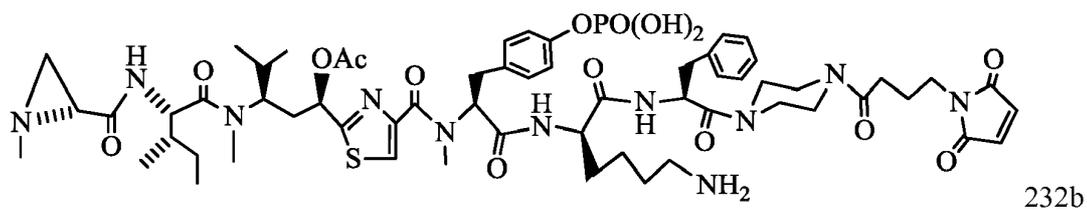
A. Ar en la definición de R¹³ es un grupo aromático o heteroaromático, compuesto por uno o varios anillos, que comprende de cuatro a seis átomos de carbono; o

B. Ar en la definición de R¹³ se refiere a un grupo heteroaromático que es un grupo aromático que tiene uno, dos o tres átomos de carbono reemplazados por O, N, Si, Se, P o S; o

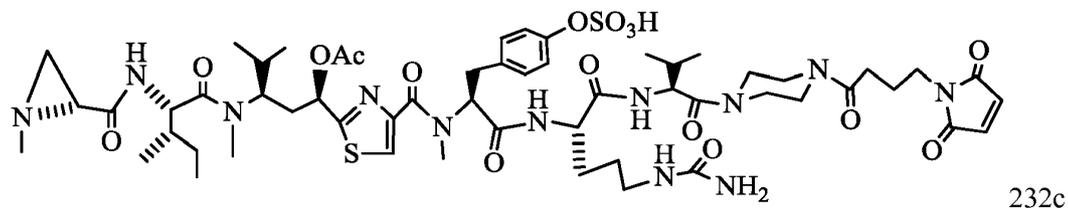
C. Ar en la definición de R¹³ se refiere a un grupo heteroaromático que es un grupo aromático que tiene uno, dos o tres átomos de carbono reemplazados por O, S, N.

4. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde, en el anillo aromático de un grupo arilo o Ar, uno o varios átomos de H se reemplazan independientemente por R¹⁷, F, Cl, Br, I, OR¹⁶, SR¹⁶, NR¹⁶R¹⁷, N=NR¹⁶, N=R¹⁶, NR¹⁶R¹⁷, NO₂, SOR¹⁶R¹⁷, SO₂R¹⁶, SO₃R¹⁶, OSO₃R¹⁶, PR¹⁶R¹⁷, POR¹⁶R¹⁷, PO₂R¹⁶R¹⁷, OP(O)(OR¹⁷)₂, OCH₂OP(O)(OR¹⁷)₂, OC(O)OP(O)(OR¹⁷)₂, PO(OR¹⁶)(OR¹⁷), OP(O)(OR¹⁷)OP(O)(OR¹⁷)₂, OC(O)R¹⁷ u OC(O)NHR¹⁷, en donde R¹⁶, R¹⁷ son independientemente H, C₁-C₈ de alquilo, heteroalquilo; C₂-C₈ de alqueno,

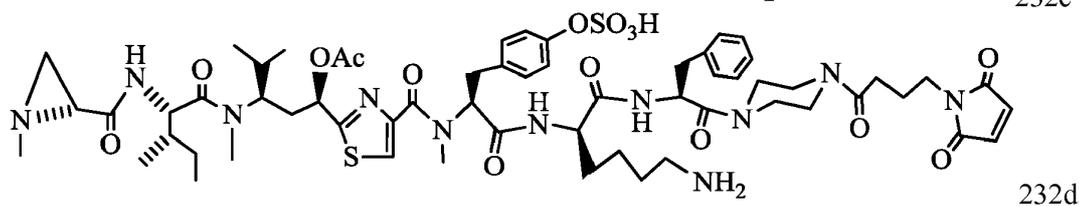




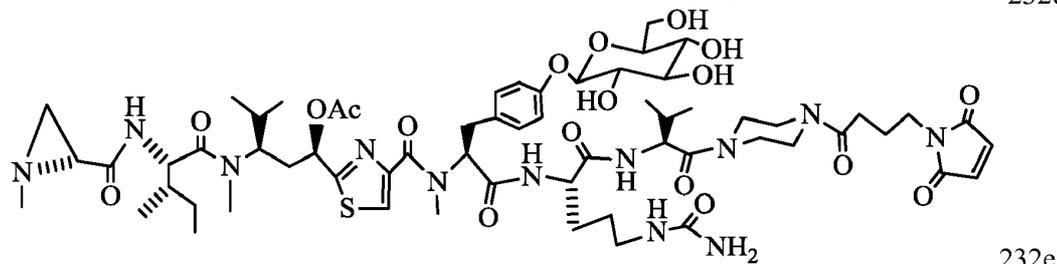
232b



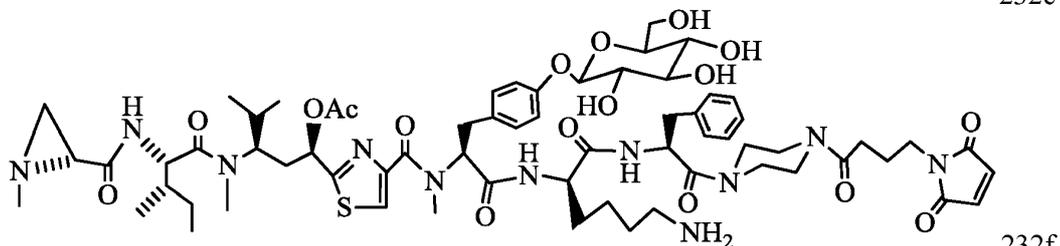
232c



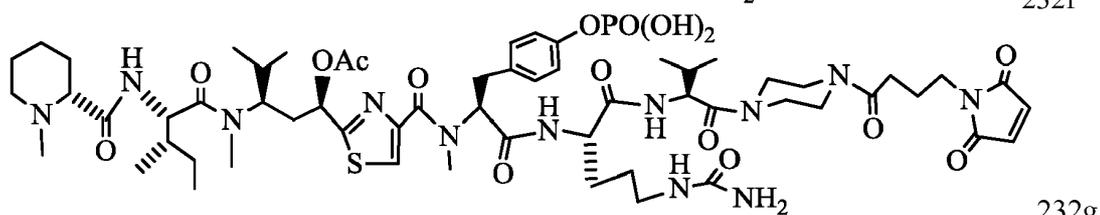
232d



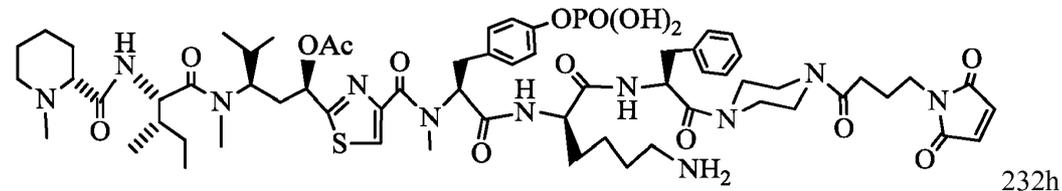
232e



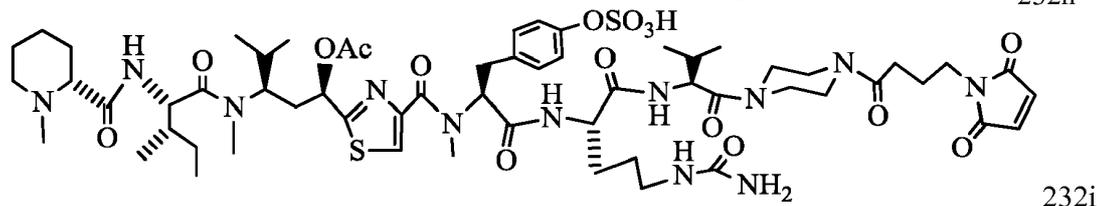
232f



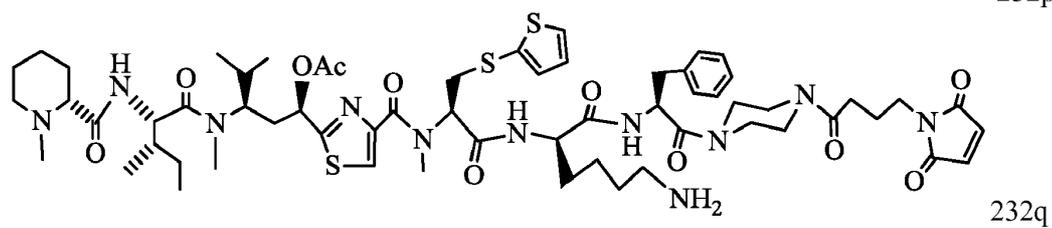
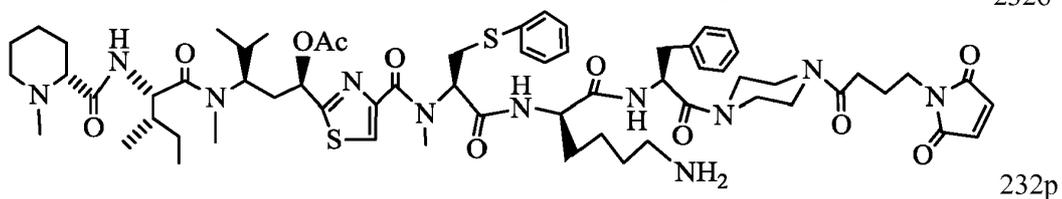
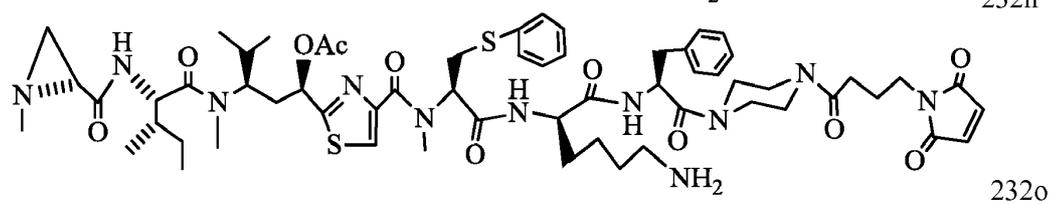
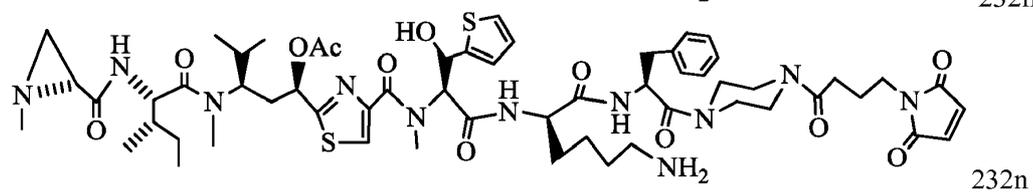
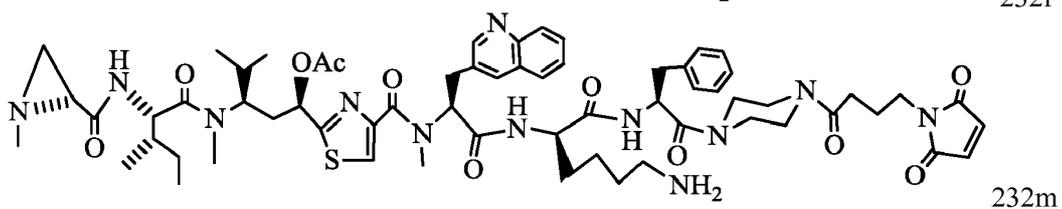
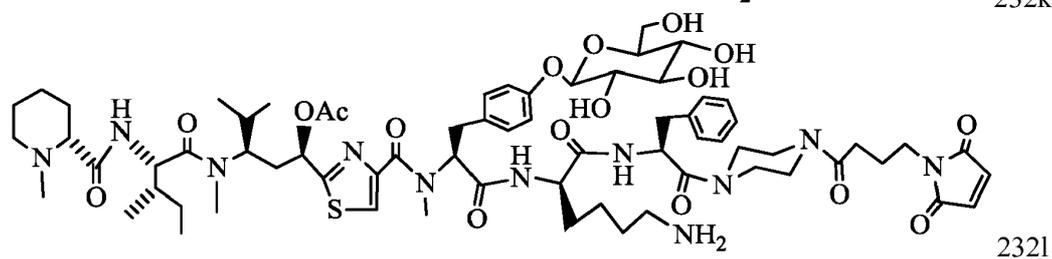
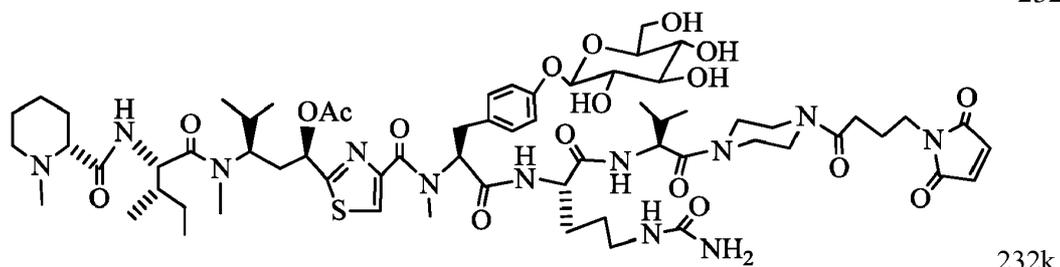
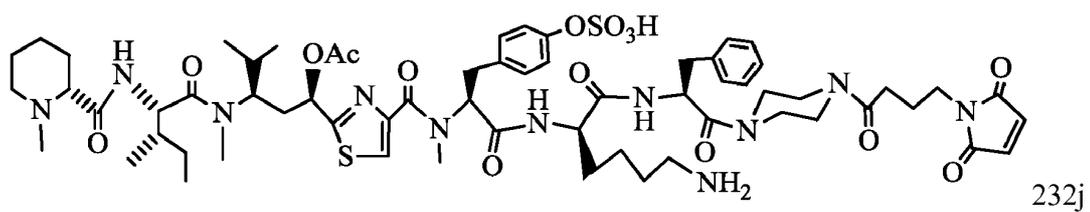
232g

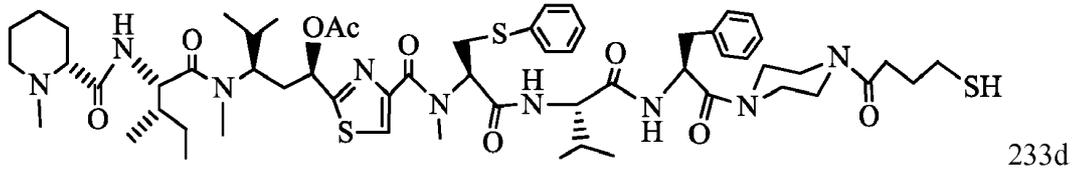
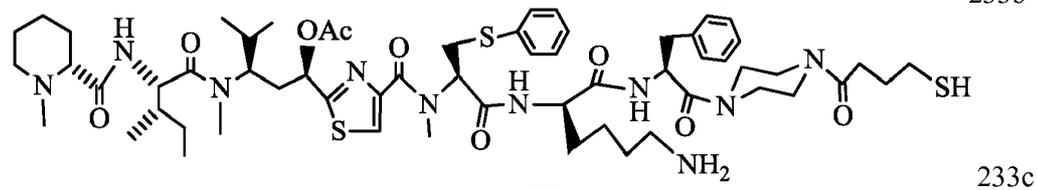
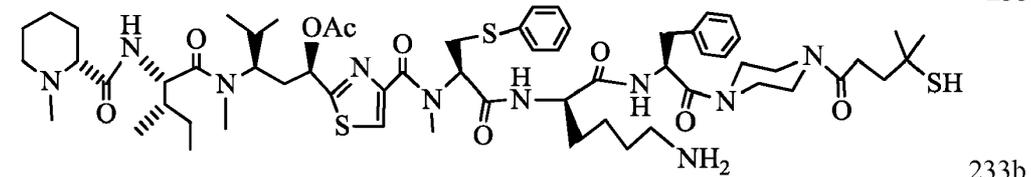
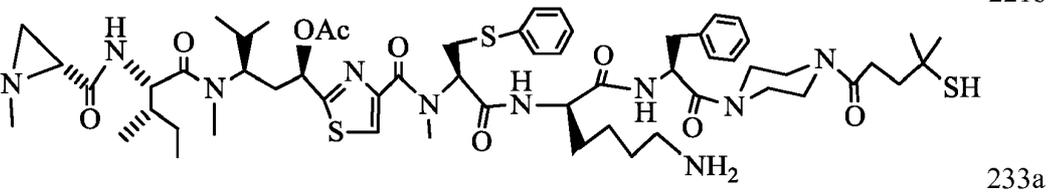
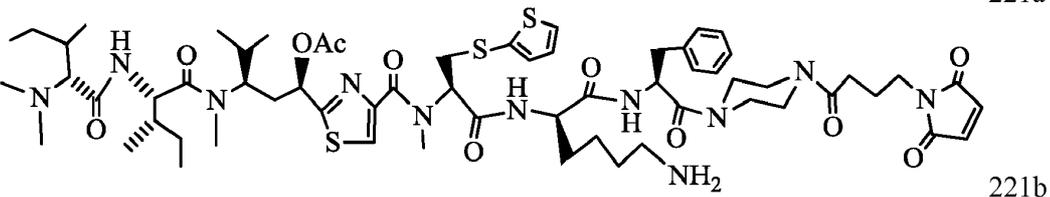
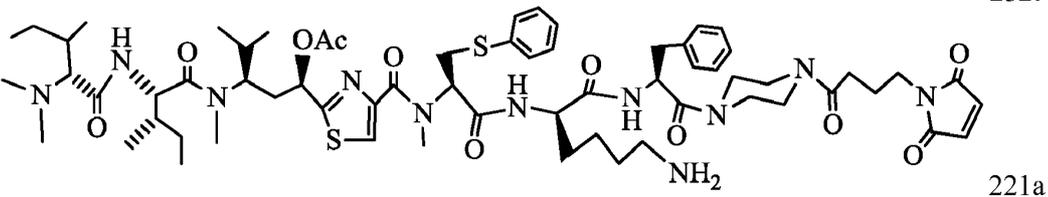
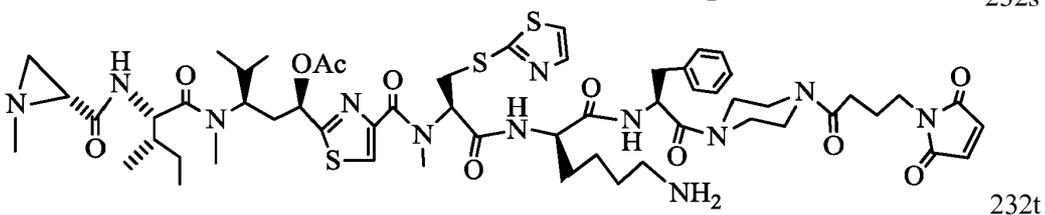
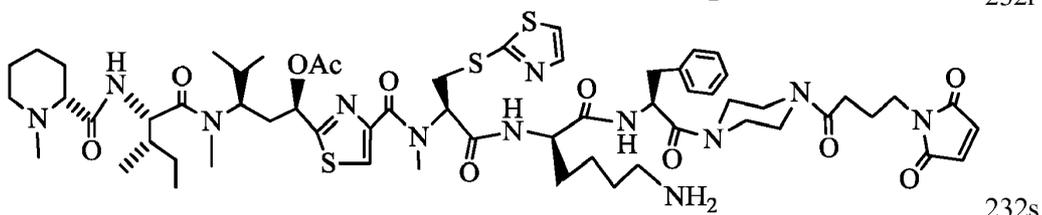
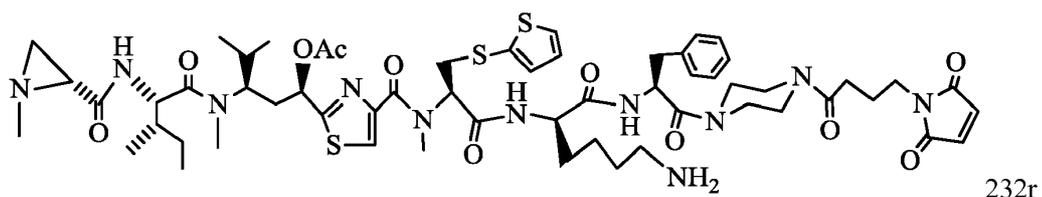


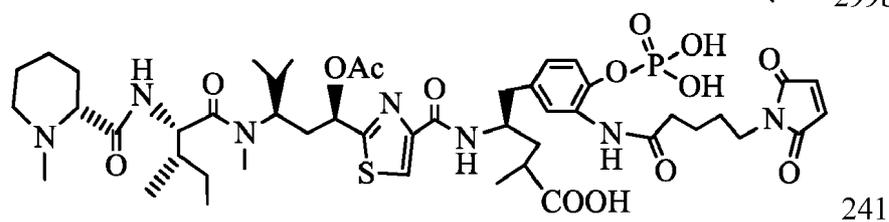
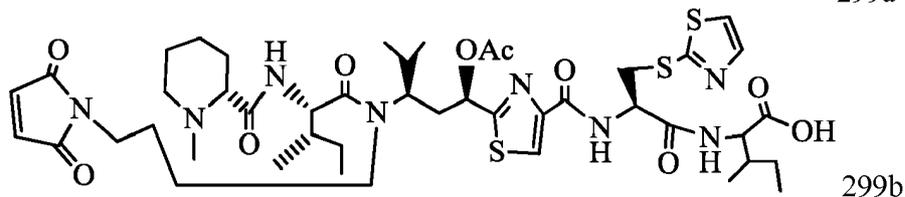
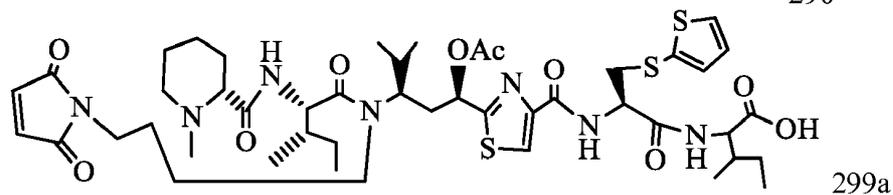
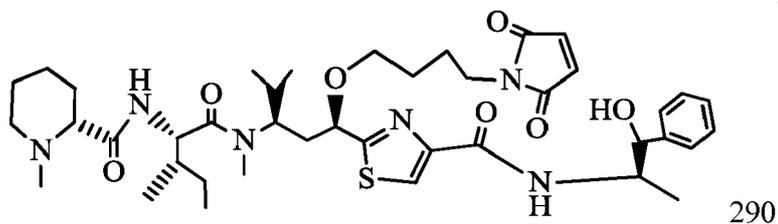
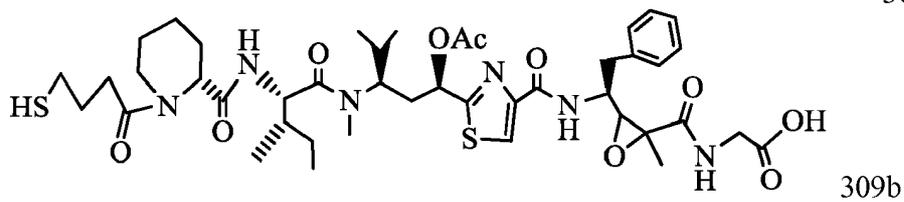
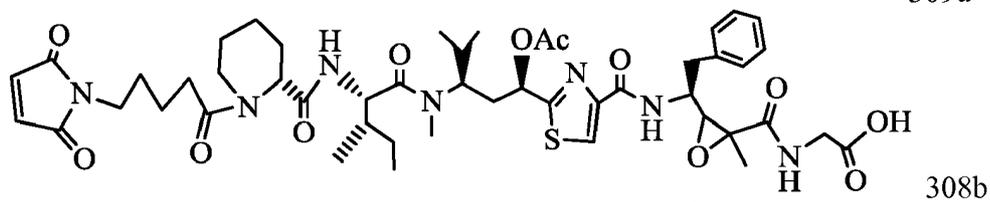
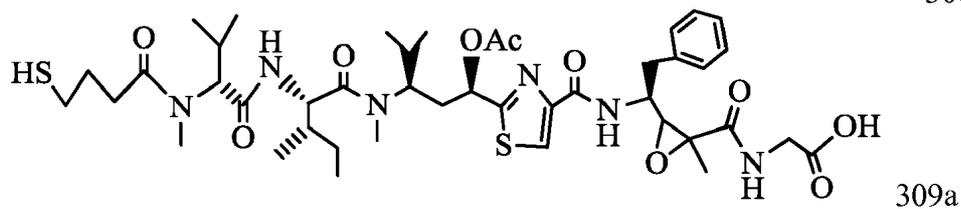
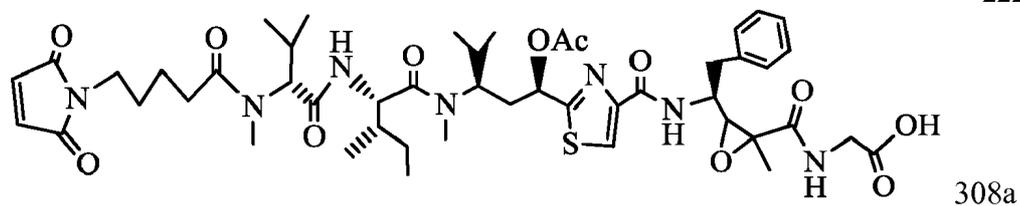
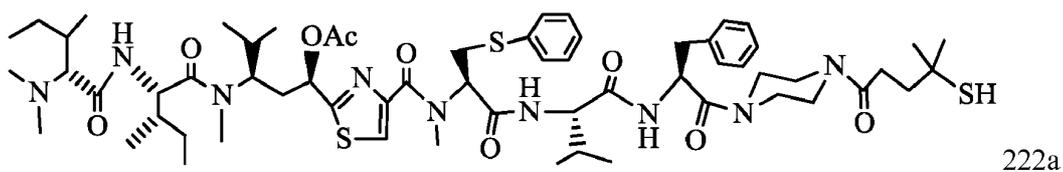
232h

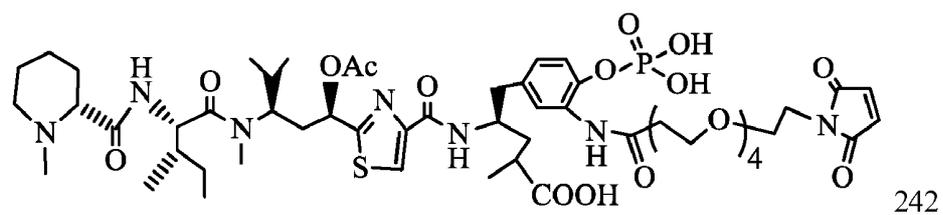


232i

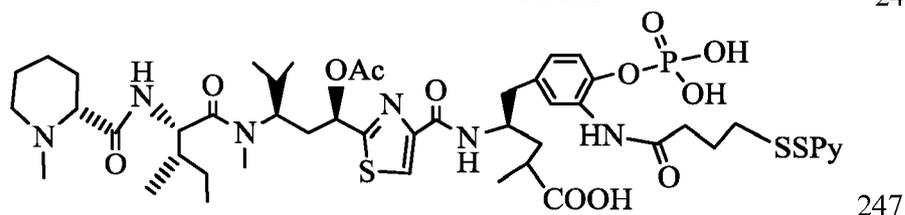




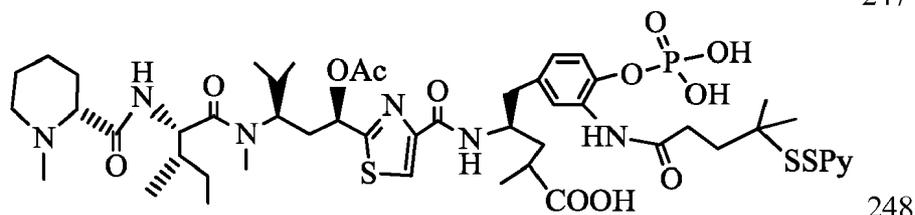




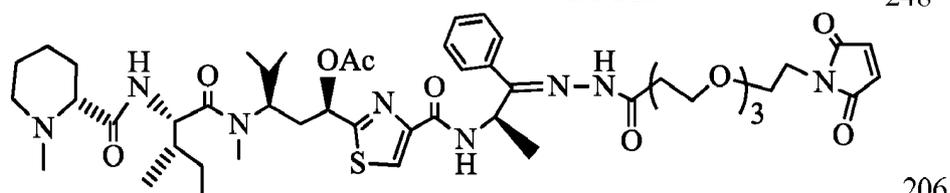
242



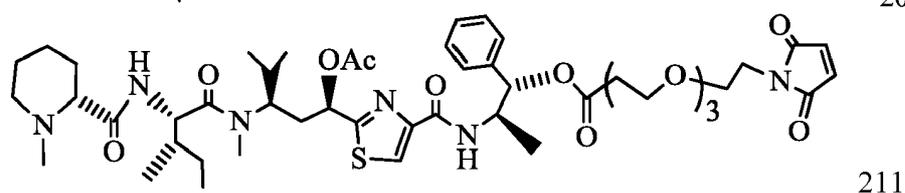
247



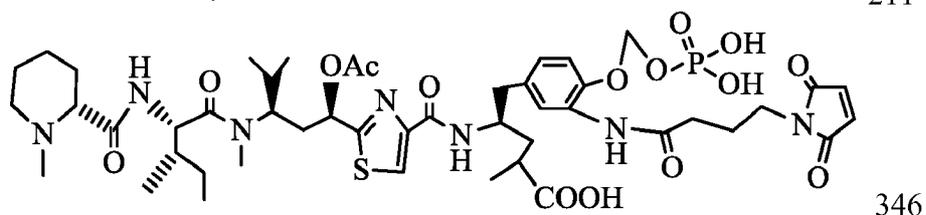
248



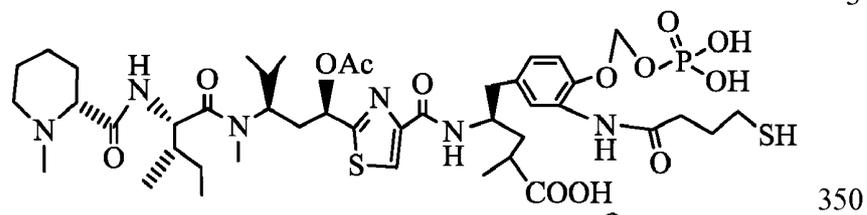
206



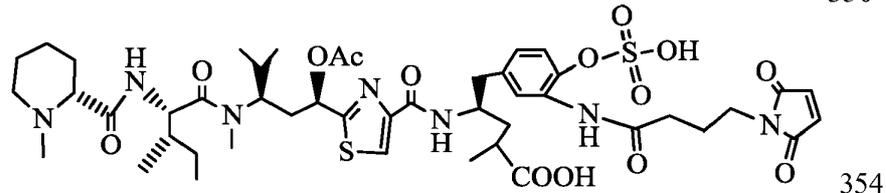
211



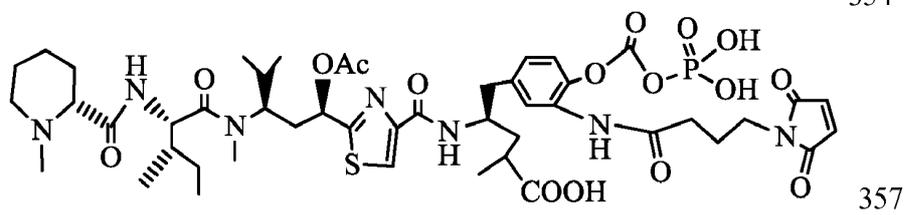
346



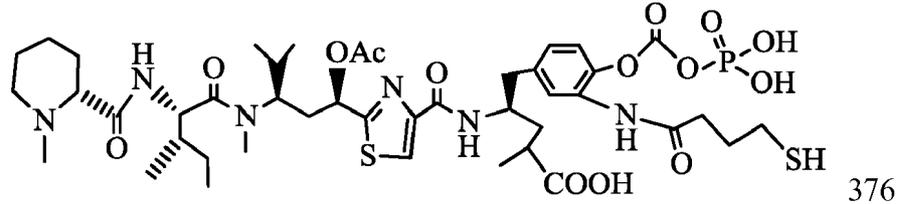
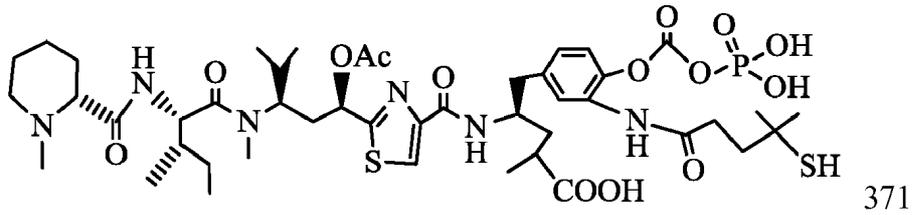
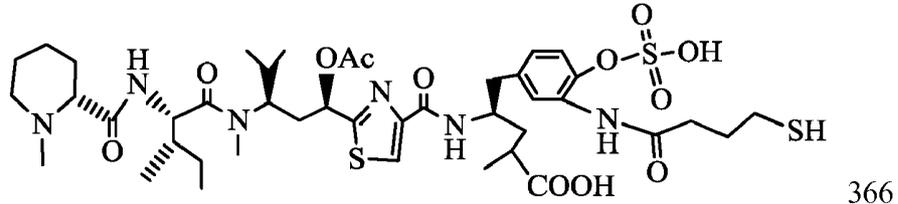
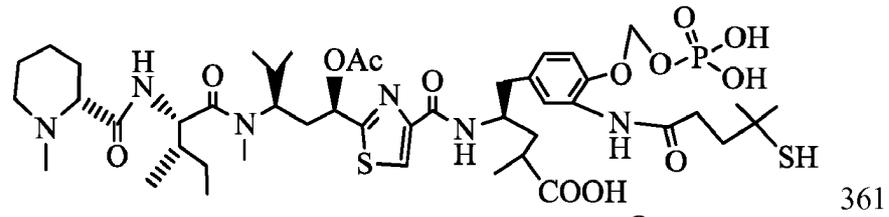
350



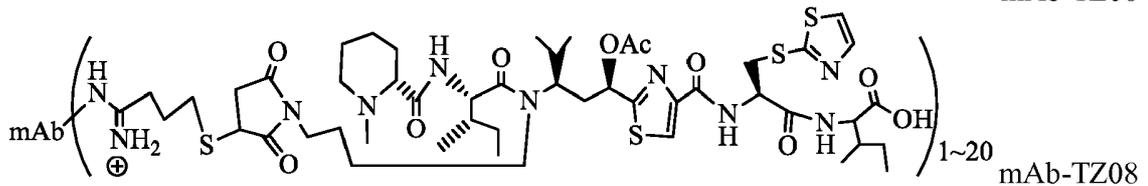
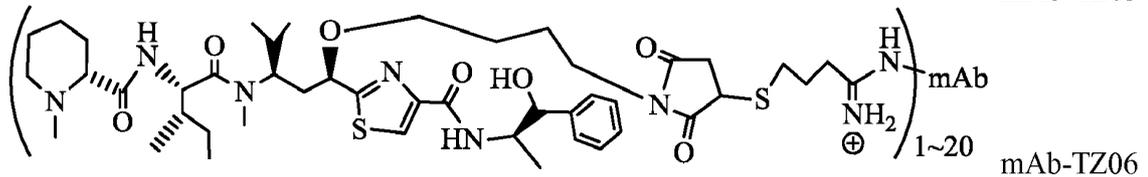
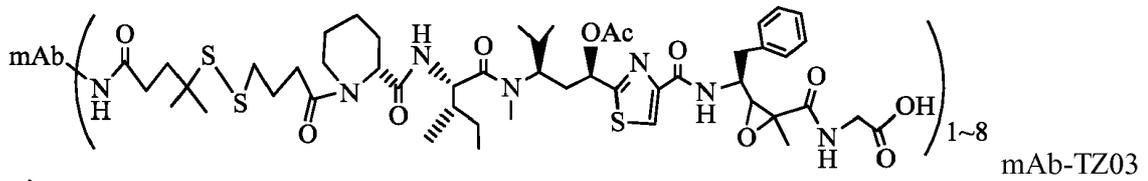
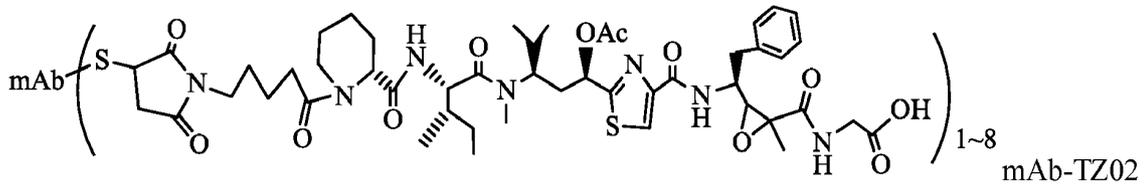
354



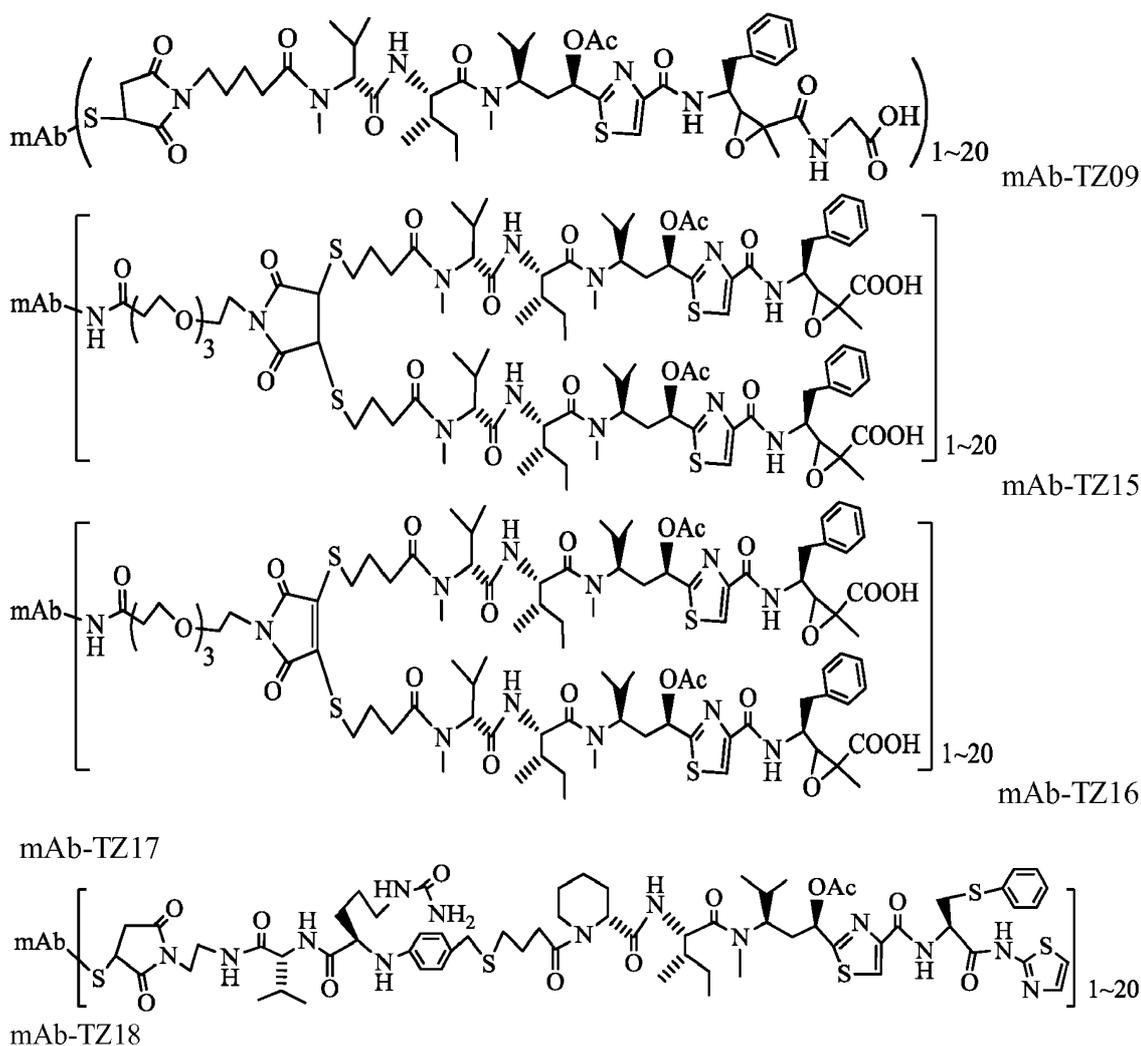
357



- 5 9. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un agente antimitótico conjugado con un anticuerpo y tiene una estructura de: mAb-TZ02, mAb-TZ03, mAb-TZ06, mAb-TZ08, mAb-TZ09, mAb-TZ15, mAb-TZ16 o mAb-TZ18, que se ilustran a continuación:



10

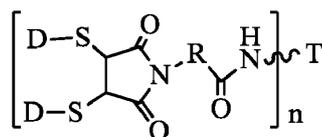


5 en donde mAb es un anticuerpo.

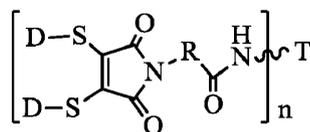
10. El conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ligando T dirigido o de unión es un agente de unión a la superficie celular capaz de unirse a células diana seleccionadas de células tumorales, células infectadas por virus, células infectadas por microorganismos, células infectadas por parásitos, células autoinmunes, células activadas, células mieloides, células T activadas, células B o melanocitos, células que expresan uno o más de Apo2, ASLG659, BAFF-R, BMPR1B (receptor de proteína morfogenética ósea), IGF-IR, CA125, CanAg, E16, EGFR, receptor EphA2, ErbB2, interleucina, MUC1, MUC16, Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, familia portadora de solutos 34, miembro 2, transportador de fosfato dependiente de sodio tipo II 3b), VEGF, TF, MY9, anti-B4, EpCAM, FcRH2, C242, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD11a, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD70, CD72, CD79, CD79a, CD79b, CD90, CD105, CD138, CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, CXCR5, LY64, TDGF1, factores de crecimiento derivados del tetratocarcinoma), receptor de endotelina B (ETBR), receptores EphA, receptores EphB, EGFR, EGFRvIII, ETBR (Endotelina), FCRH1, HER2, HER2/neu, HER3, HLA-DOB (antígeno de molécula la de MHC clase II), integrinas, IRTA2, LIV-1, MPF (MPF, MSLN, SMR, factor potenciador de megacariocitos, mesotelina), GEDA, mesotelina, NaPi2b, PDL1, Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm42015, SEMA5B, 5EMAG, 5 bHlog de semaforización, dominio de sdema, siete repeticiones de trombospondina, dominio citoplasmático, PSCA, PSMA, STEAP1 (seis antígenos epiteliales transmembrana de próstata 1) y antígenos STEAP2 (HGNC 8639, IPCA-1, PCANP1, STAMP1, STEAP2, STMP, próstata); y células que expresan el receptor del factor de crecimiento de insulina, el receptor del factor de crecimiento epidérmico o el receptor de folato.

11. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 10, en donde la porción dentro del corchete redondo comprende dos agentes citotóxicos por conector y el conjugado tiene la siguiente fórmula:

A.

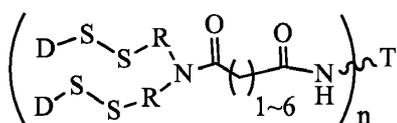


o

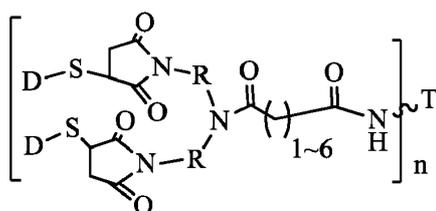


o

5 B.



o



en donde R es alquilo C₁-C₈ o C₂H₄(OC₂H₄)_n, n es 1-20;

10 y D es un agente o fármaco citotóxico; y

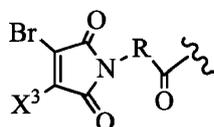
T es el ligando de fijación o unión, en donde T es una molécula de unión celular;

en donde al menos un D es el agente antimetabólico definido dentro del corchete redondo en la reivindicación 1;

15 y en donde se puede seleccionar un agente citotóxico adicional opcional o fármaco D de compuestos químicos útiles en el tratamiento del cáncer, por ejemplo caliqueamicinas, auristatinas, maitansinoides, dolastinas, análogos CC-1065, doxorubicinas, taxanos, dímeros de pirrolbenzodiazepina, ARNip, combinaciones de los mismos, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

12. Un método para preparar el conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende usar un conector que tiene un terminal 3-bromo-maleimido, o 3,4-dibromo-maleimido, de la siguiente fórmula:

20



en donde R es alquilo C₁-C₈ o C₂H₄(OC₂H₄)_n, n es 1-20; X³ es H o Br; para enlazar el agente antimetabólico con el ligando T de unión.

13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo, diluyente o excipiente para el mismo.

14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, que es una composición farmacéutica para uso en un método terapéutico, en donde el método terapéutico es un método:

A. para el tratamiento o prevención de un cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa; o

30 B. para el tratamiento o prevención sinérgicamente eficaz de un cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en la cual la composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva

de un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 se administra a un sujeto simultáneamente con otros agentes terapéuticos para el tratamiento o prevención de un cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa; o

- 5 C. para el tratamiento o prevención sinérgicamente eficaz de un cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa en la cual la composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 se administra a un sujeto simultáneamente con otros agentes terapéuticos para el tratamiento o la prevención de un cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa, seleccionándose dichos otros agentes terapéuticos para el tratamiento o la
- 10 prevención de un cáncer, una enfermedad autoinmune o una enfermedad infecciosa de entre agente quimioterapéutico, radioterapia, agentes de inmunoterapia, agentes de trastorno anti-autoinmune, agentes antiinfecciosos y conjugados de anticuerpo-fármaco distintos de los definidos en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

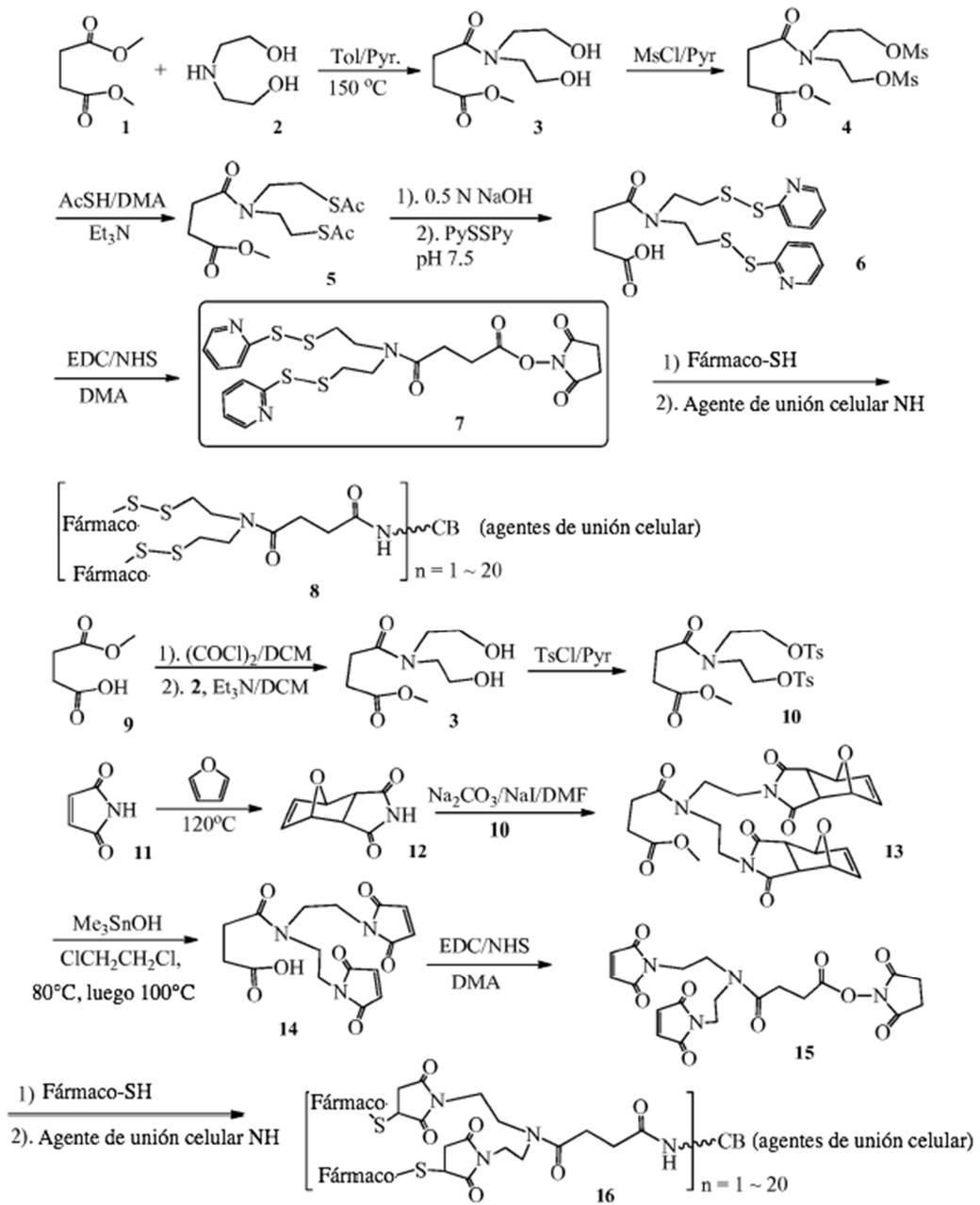


Figura 1. La síntesis de los enlazadores ramificados para la conjugación de fármaco para agentes de unión celular.

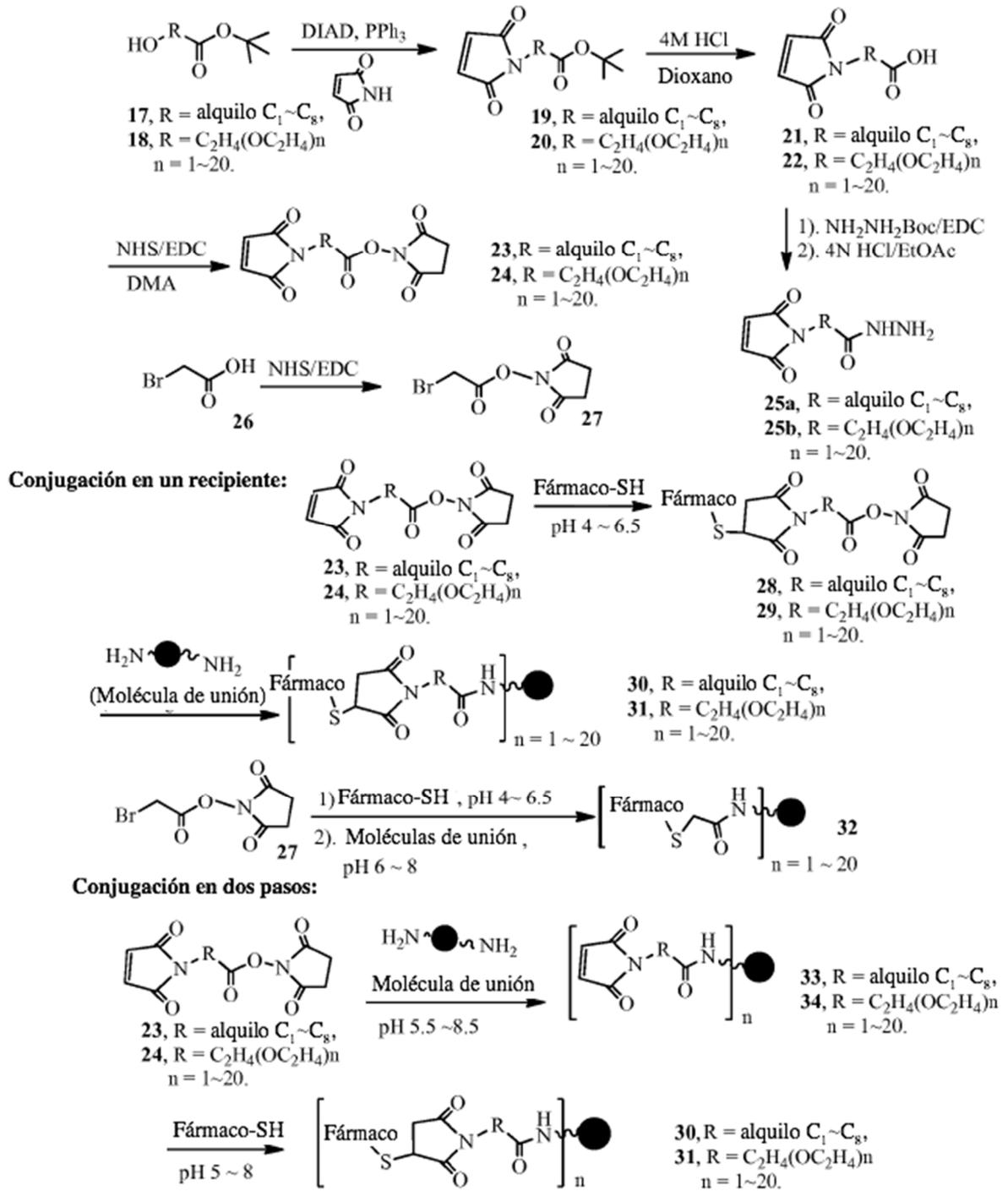


Figura 2. La síntesis de enlazadores de maleimida y su uso para la conjugación de molécula de unión al fármaco.

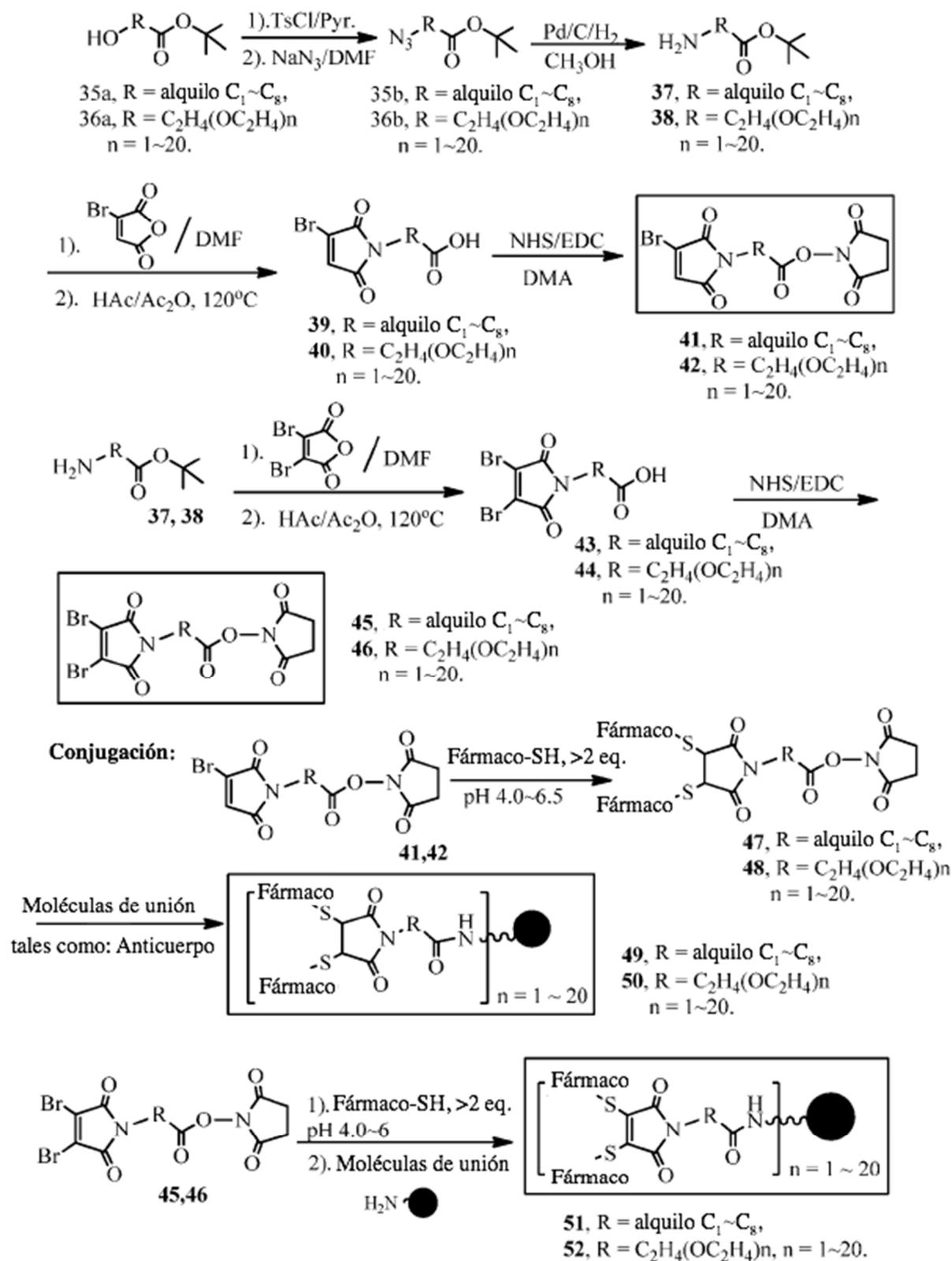


Figura 3: La síntesis de enlazadores de bromoamaleimida y dibromomaleimida y su uso para la conjugación de molécula de unión al fármaco.

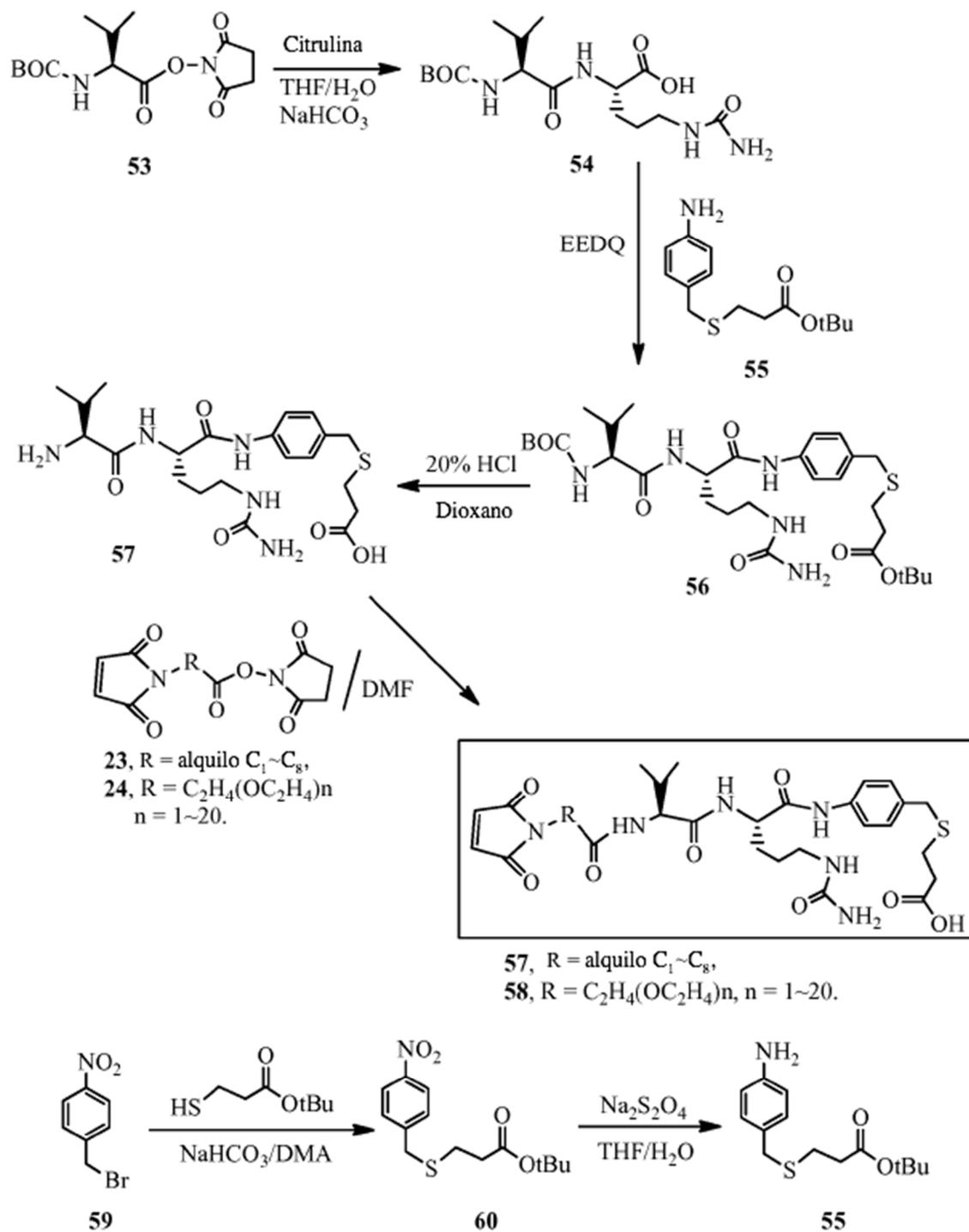


Figura 4. La síntesis de enlazadores de aminoácido (Val-Cit) para la conjugación de agentes antimetabólicos con una molécula de unión celular.

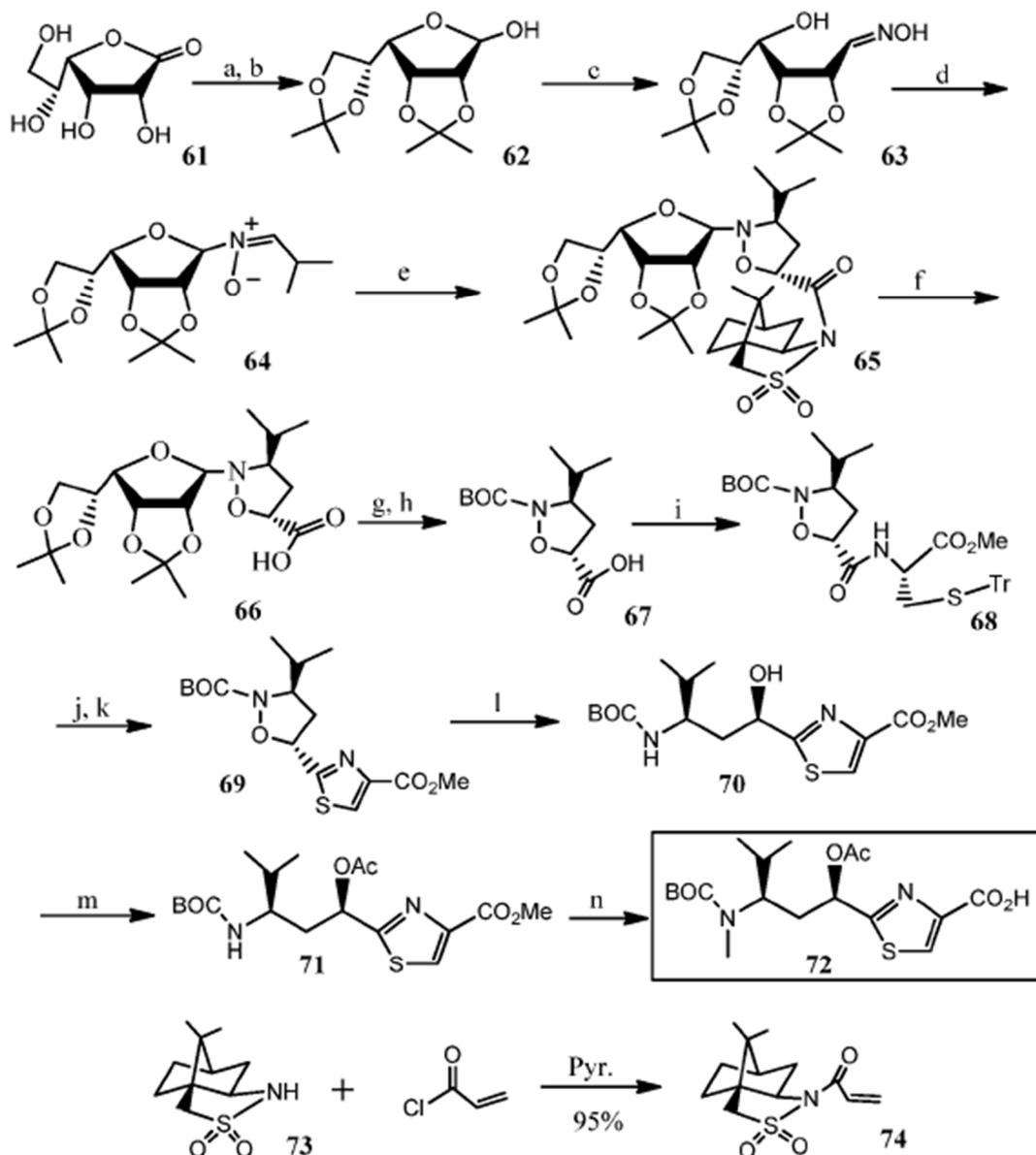


Figura 5. La síntesis del componente Tuv de los agentes antimitóticos. Condiciones: a. CuSO_4 , H_2SO_4 , Acetona, 95%; b. DIBAL-H, THF/Tol, -78°C , 95%; c. NH_2OH , NaHCO_3 , $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$; d. isobutiraldehído, MgSO_4 , CH_2Cl_2 , 85% (2 steps); e. (2R)-N-(acriloil)bornano-10,2-sultamas **74**, 40°C , 48h, CH_2Cl_2 83%; f. LiOH , THF/ H_2O , 86%; g. HClO_4 , $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 98%; h. BOC_2O , Na_2CO_3 , THF/ H_2O , 95%; i. Metil éster de L-(S)-Tr-cisteína, EDC, CH_2Cl_2 , 85%; j. $\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$, Tf_2O , CH_2Cl_2 ; k. MnO_2 , CH_2Cl_2 , 76% (2 etapas); l. $\text{Mo}(\text{CO})_6$, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 87%; m. Ac_2O , Pyr., 95%; n. 1). NaH , THF, CH_3I , 85%; 2). HOSnMe_3 , $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, 80°C , 95%, 3). $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyr}$, 86%.

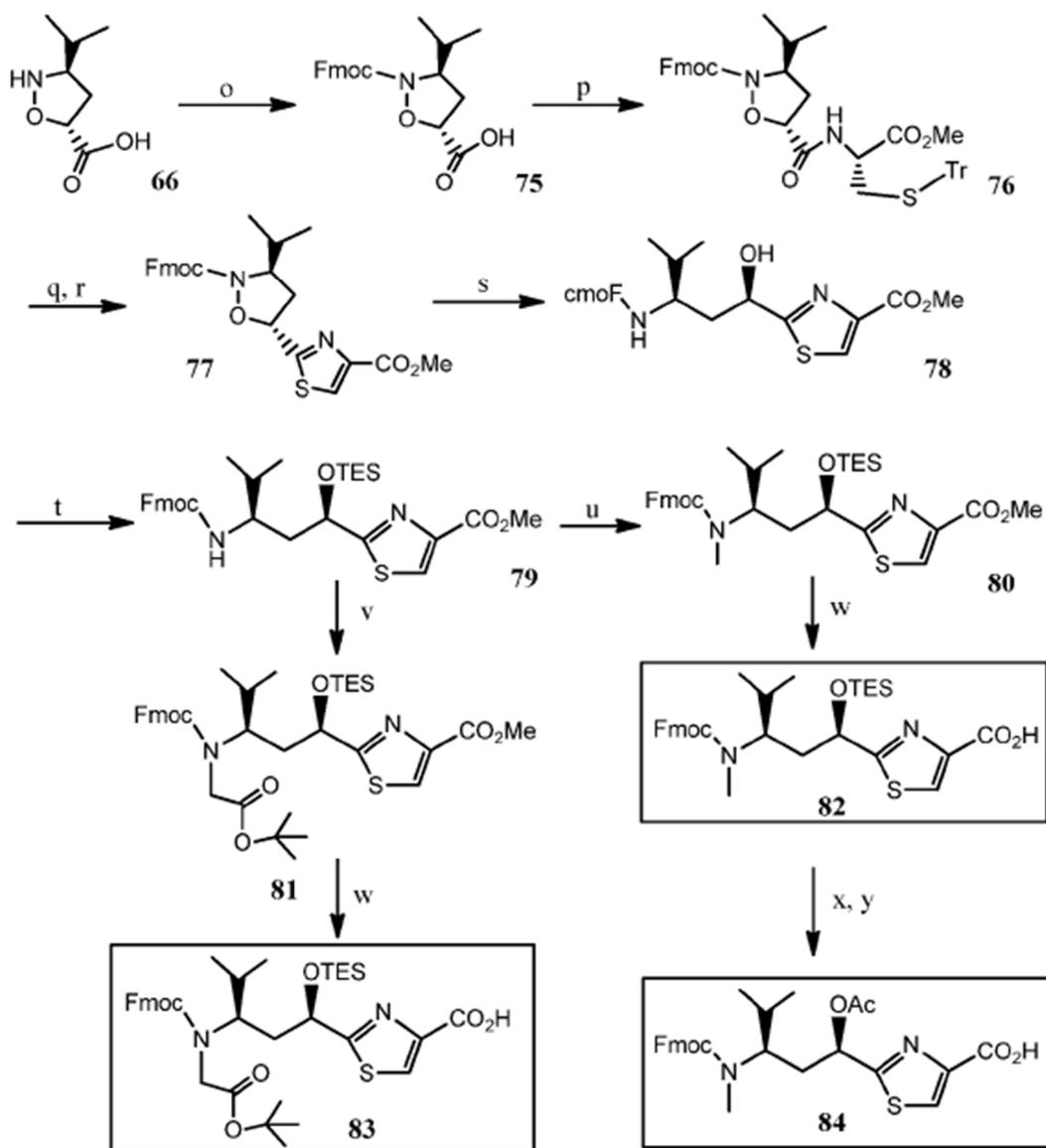


Figura 6. La síntesis del componente Tuv de los agentes antimitóticos. Condiciones: o): Fmoc-Cl, NaHCO₃, THF/H₂O, 95%; p): Metil éster de L-(S)-Tr-cisteína, EDC, CH₂Cl₂, 87%; q): Ph₃P=O, Tf₂O, CH₂Cl₂; r): MnO₂, CH₂Cl₂, 76%(2 etapas); s): Mo(CO)₆, CH₃CN/H₂O, 87%; t): TES-Cl, Pyr., 95%; u): NaH, THF, CH₃I, 90%; v): NaH, THF, BrCH₂COOtBu, 0°C, 87%; w): HO-SnMe₃, ClCH₂CH₂Cl, 80°C; -90%; x): Bu₄NF, THF; y): Ac₂O, Pyr. 81%.

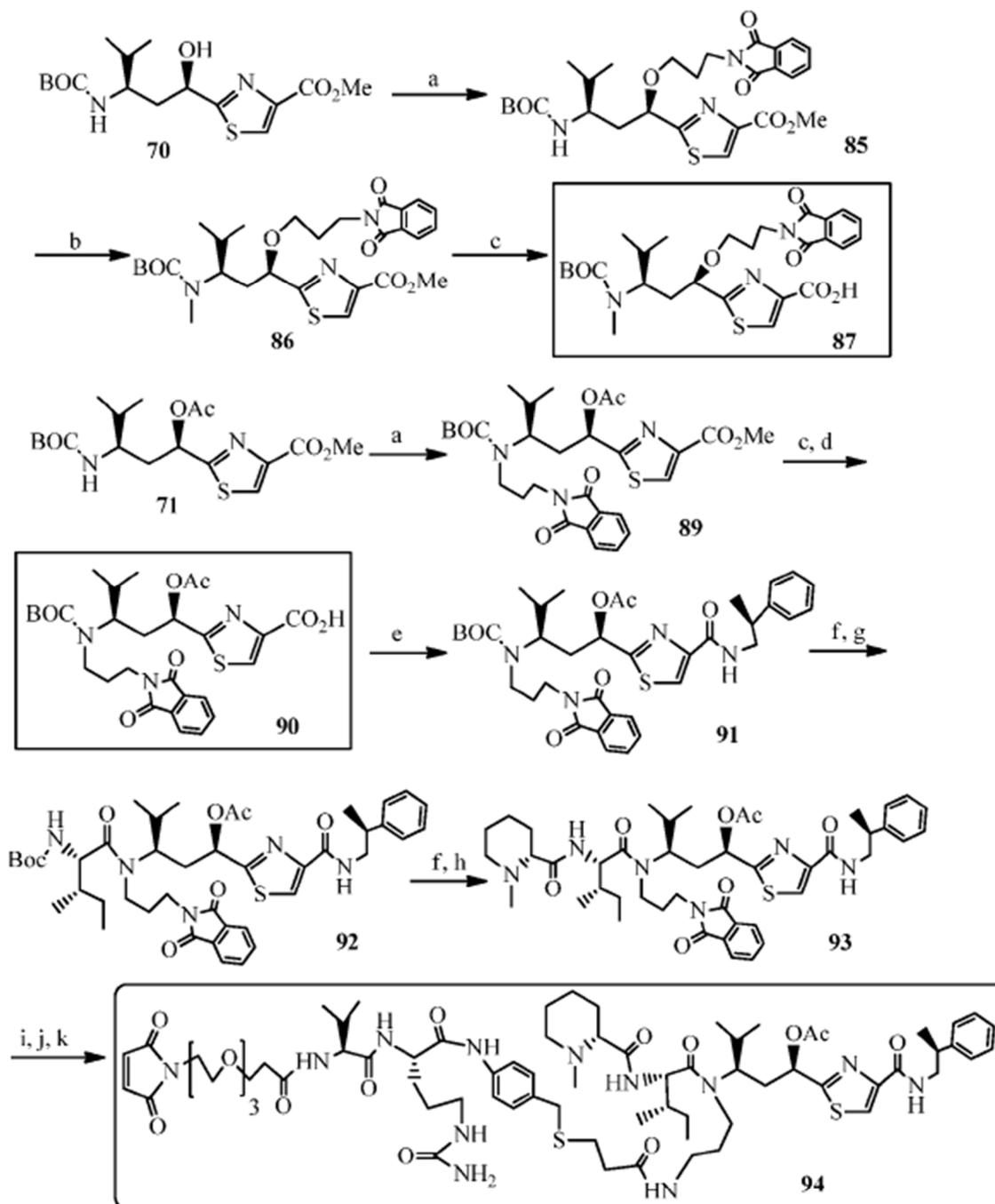


Figura 7. La síntesis de fracciones de Boc-Tuv y un agente antimitótico conjugable. Condiciones: a): NaH, THF, N-(4-Bromobutil)ftalimida; NaI, ~83%; b): NaH, DMF, CH₃I, 90%; c): HOSnMe₃, ClCH₂CH₂Cl, 80°C, ~85%; d): Ac₂O, Pyr.; e): (R)-(+)-b-Metilfenetilamina, EDC, DMA, 85%; f): 4M HCl, dioxano; g): Boc-Ile-OH, PyBroP, DMAP, DMA, 78%; h): D-Mep, PyBroP/CH₂Cl₂, 81%; i): NH₂NH₂, DMA; j): **58** (n=3), EDC, DMA; k): Ac₂O, Pyr. 56%.

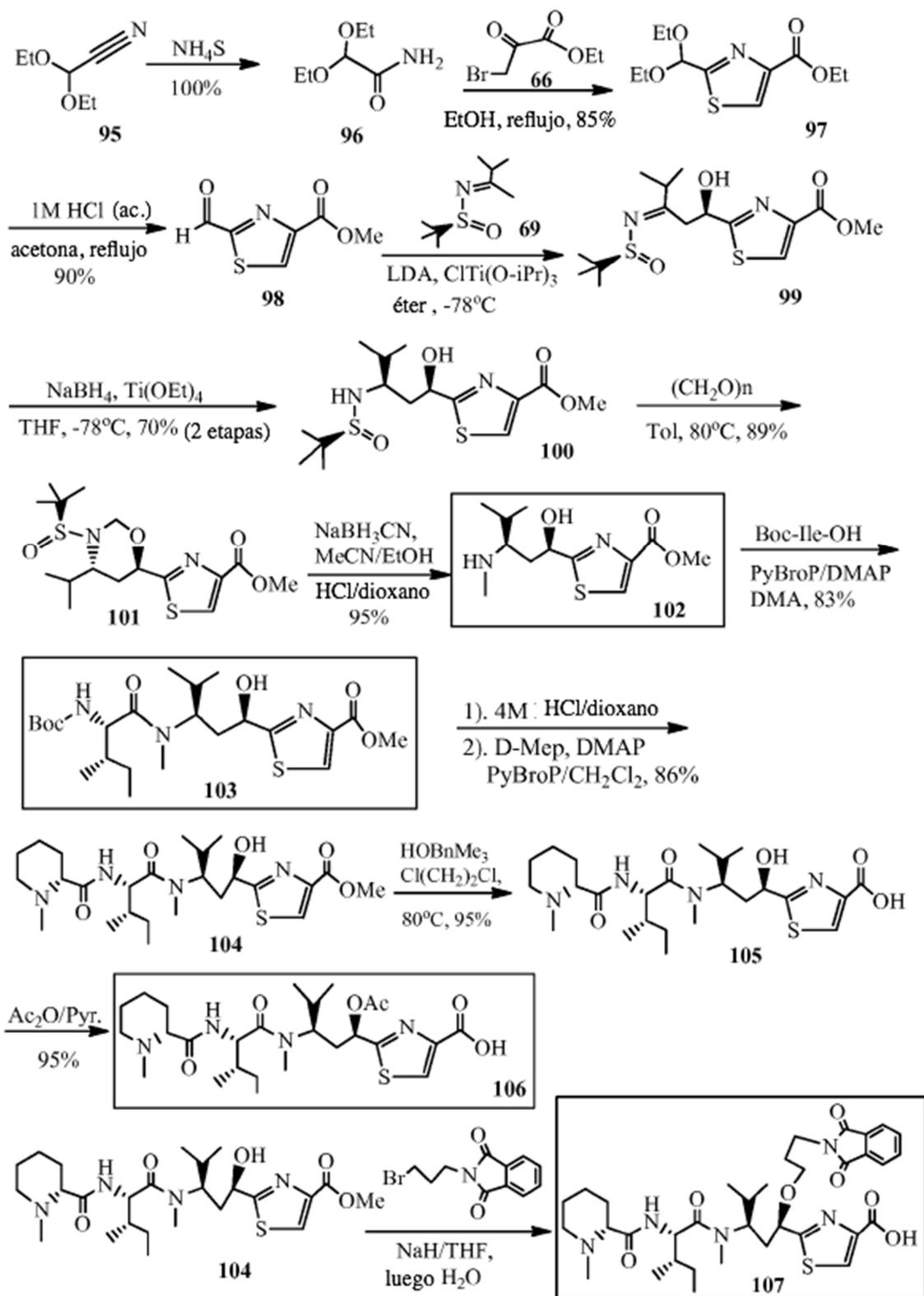


Figura 8. La síntesis de fracciones de Tuv, Ile-Tuv y Mep-Ile-Tuv de agentes antimitóticos.

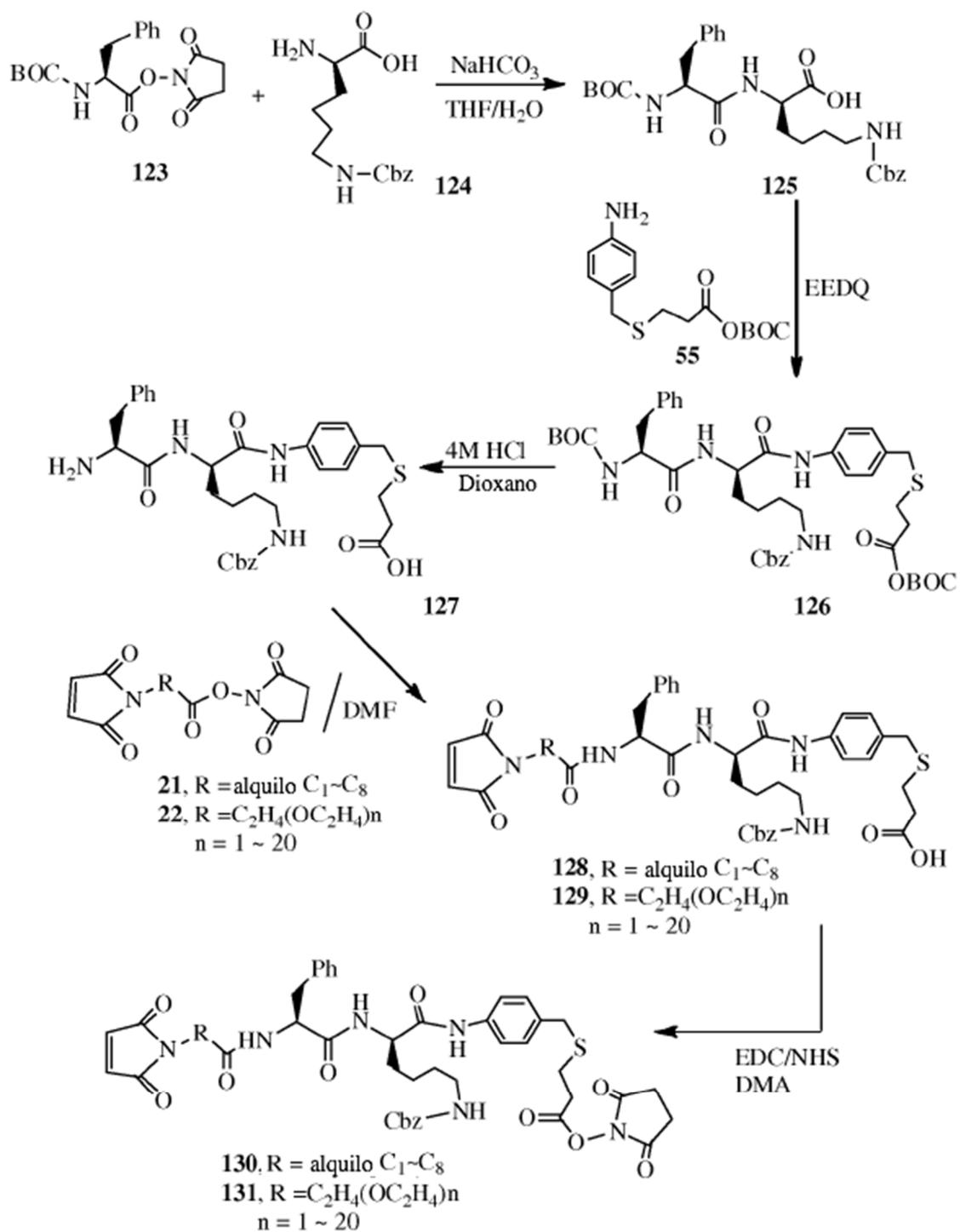


Figura 11. La síntesis de enlaces de aminoácido (Phe(D)Lys) para conjugación de agentes antimitóticos.

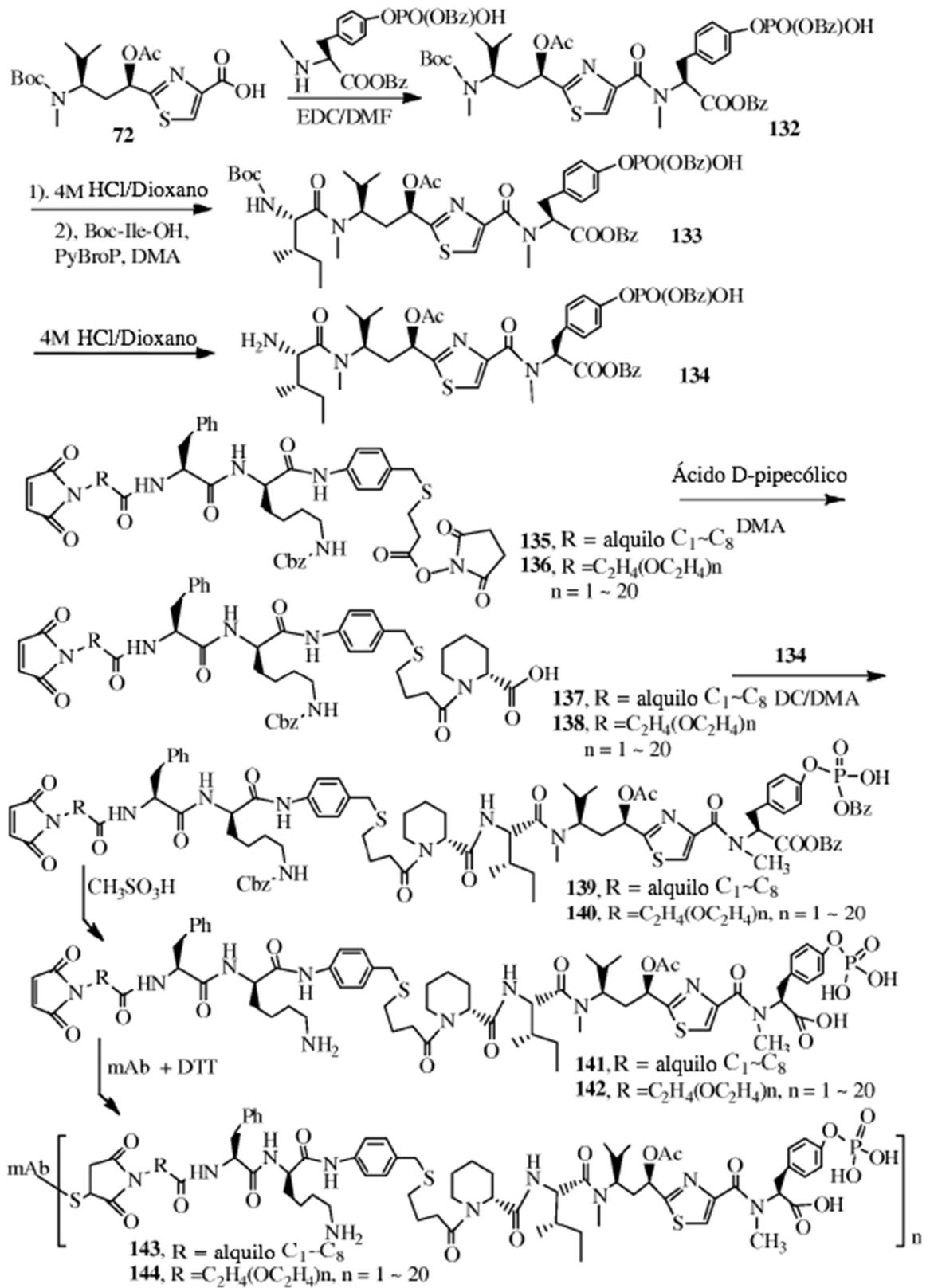


Figura 12. La síntesis de anticuerpo de conjugados de agente antimitótico.

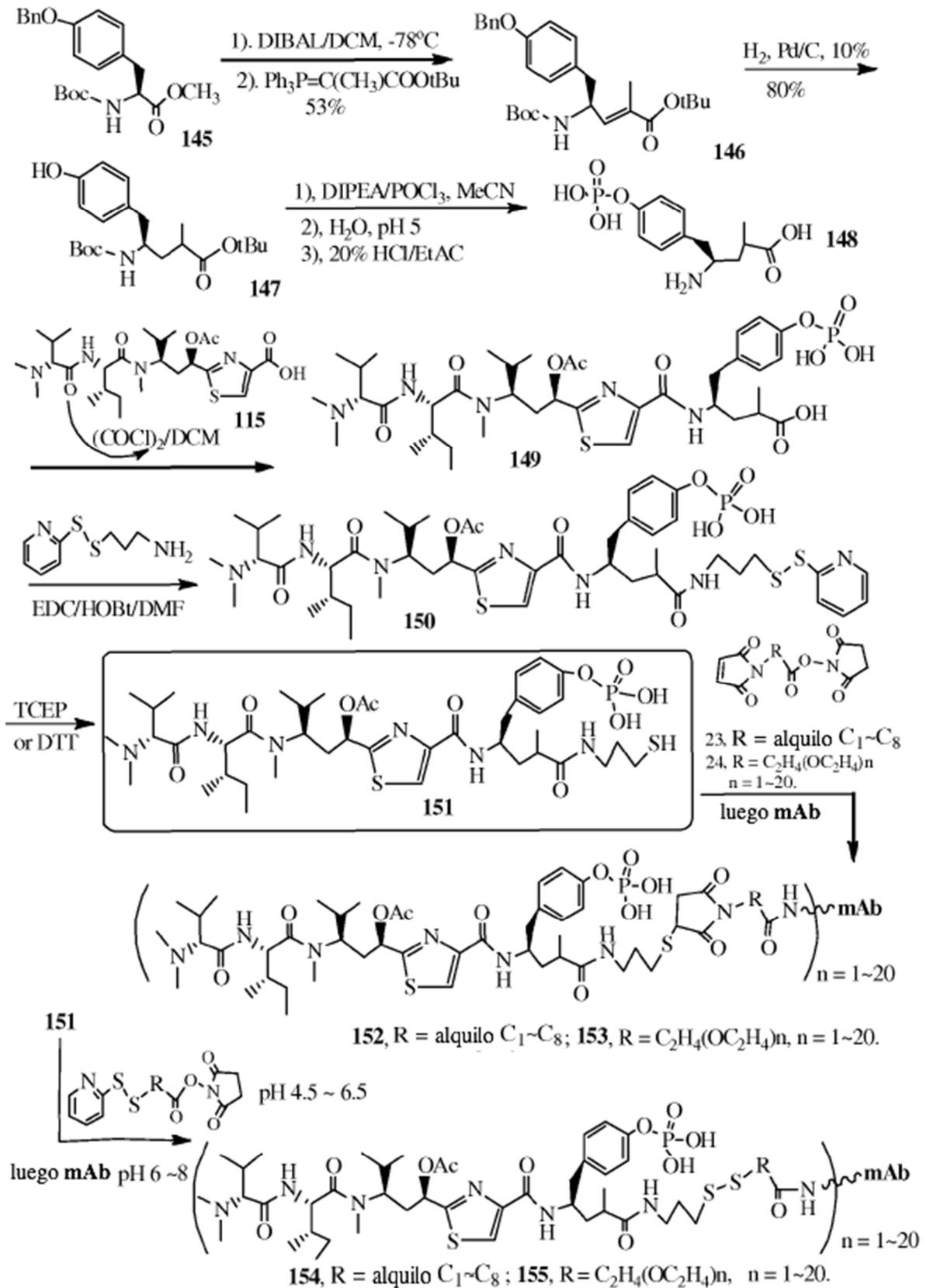


Figura 13. La síntesis de anticuerpo de conjugados de agente antimitótico.

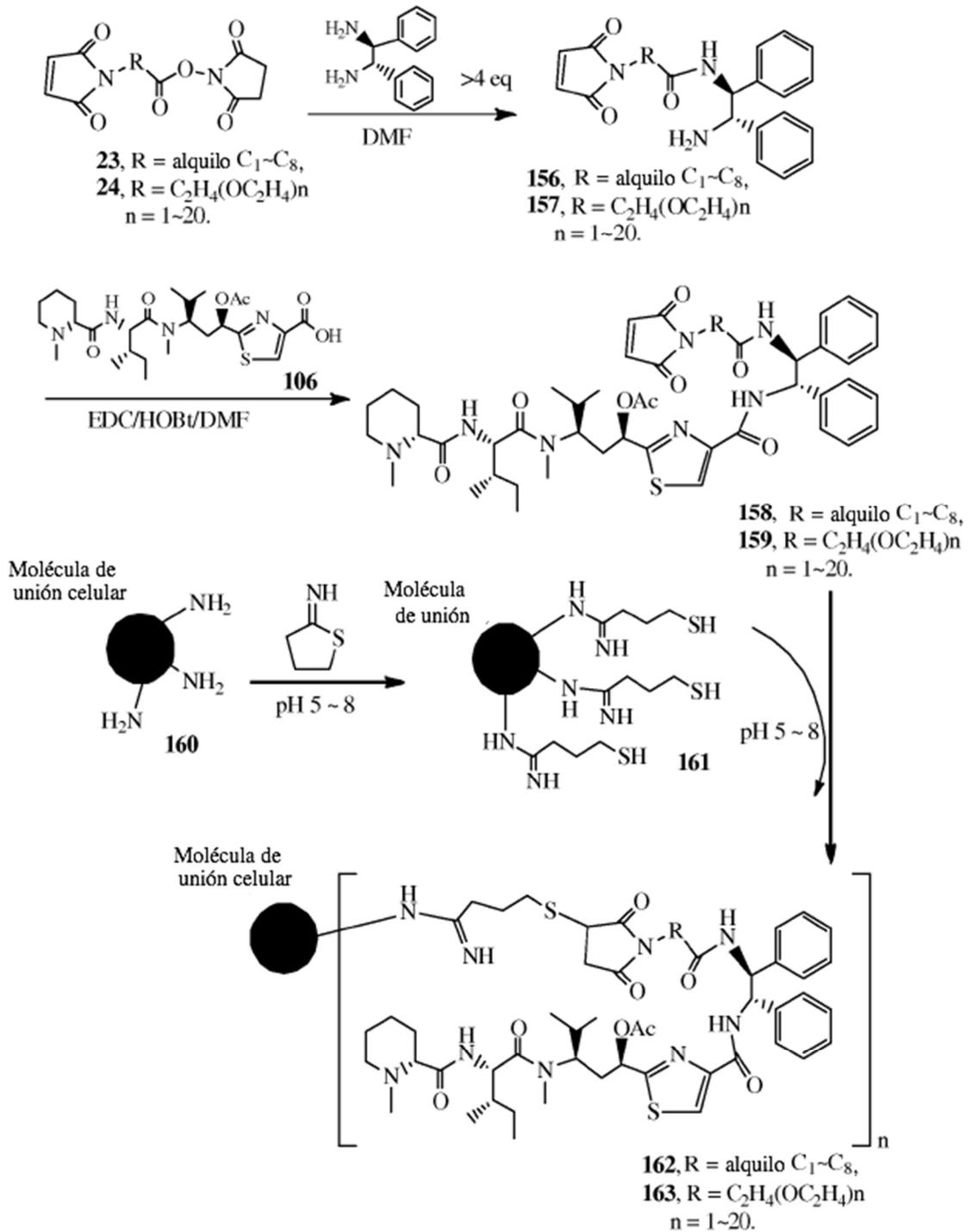


Figura 14. La síntesis de la molécula de unión de conjugados de agente antimetabólico.

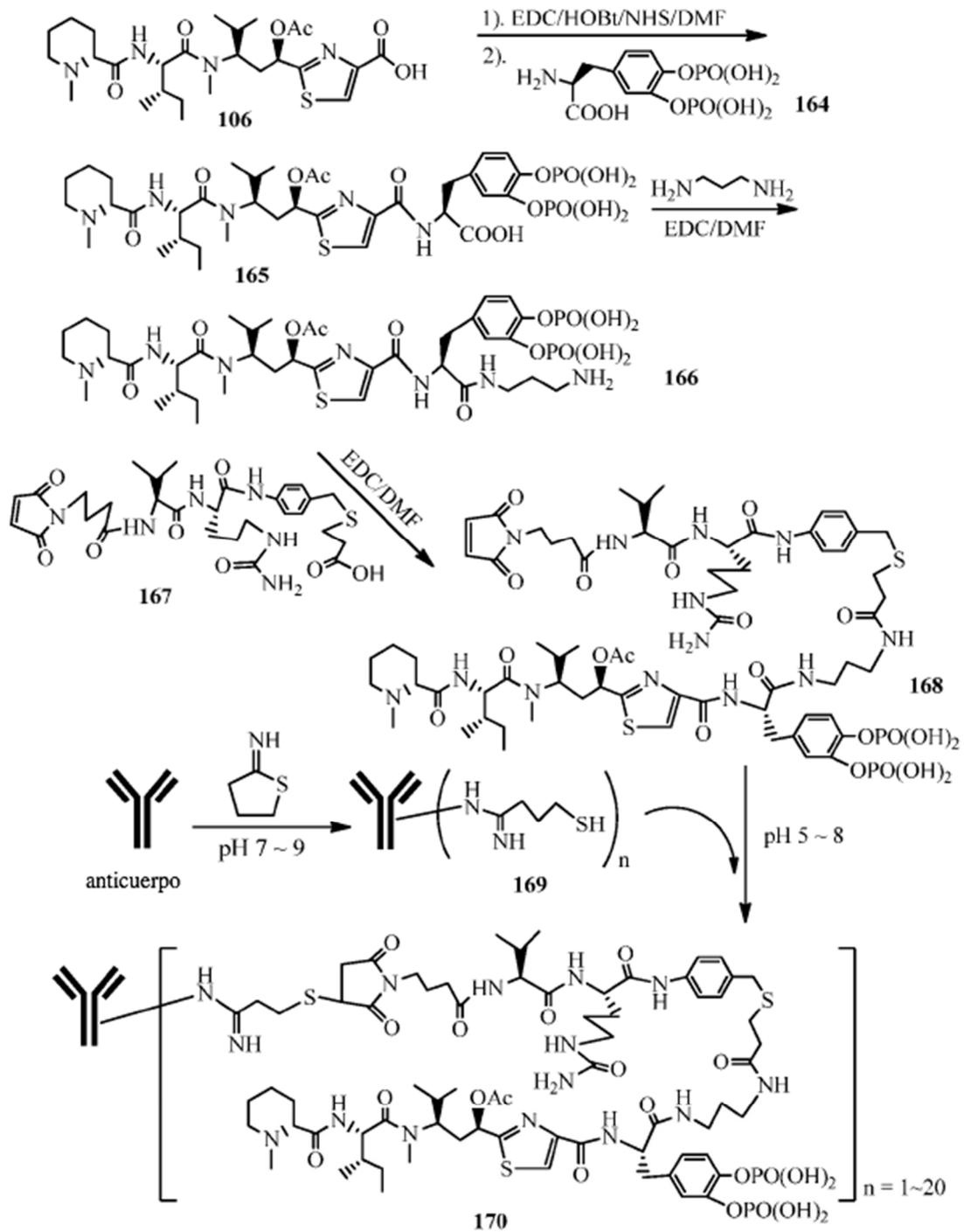


Figura 15. La síntesis de una molécula de unión (anticuerpo) de conjugado de agente antimetabólico.

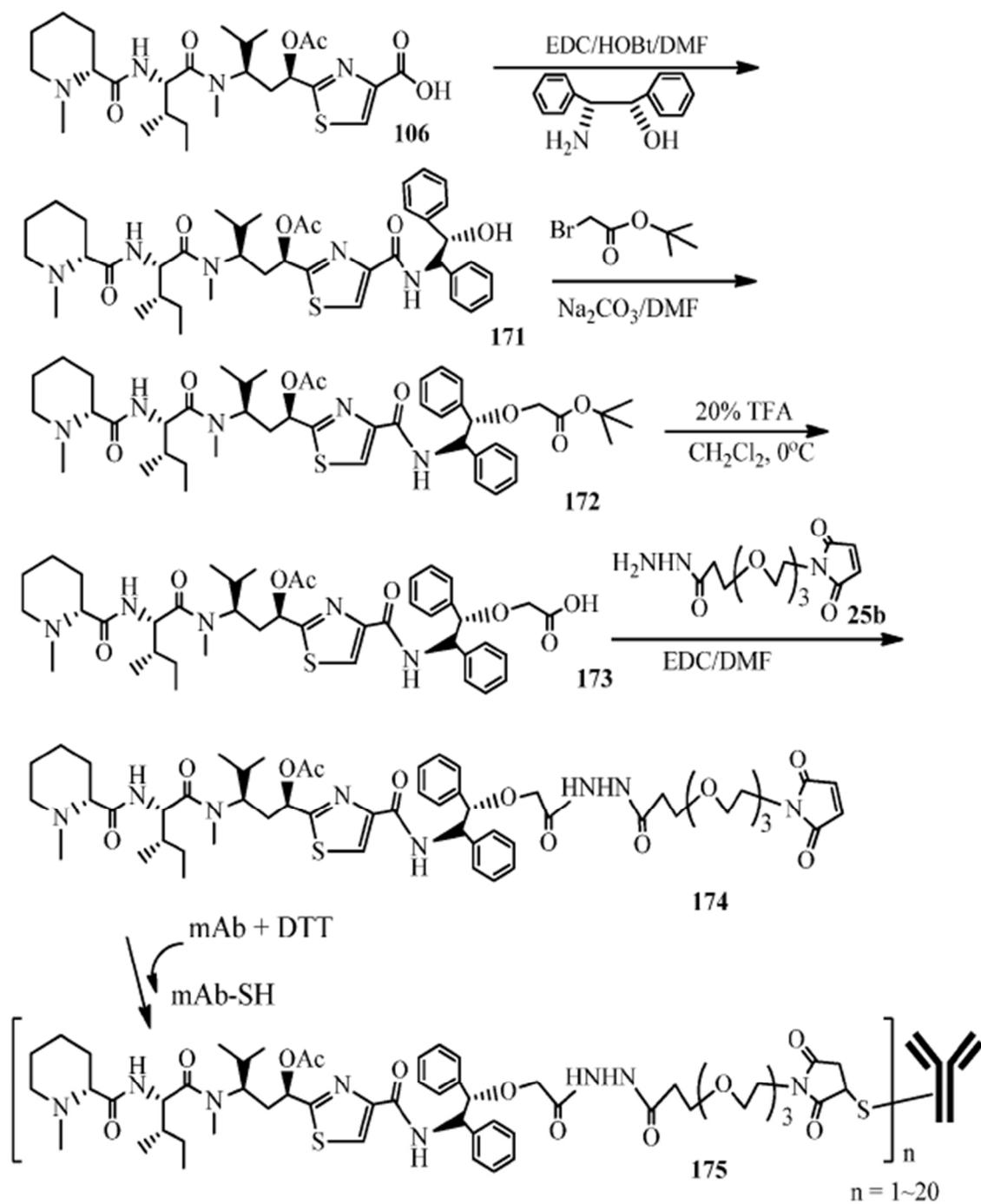


Figura 16. La síntesis de anticuerpo de conjugados de agente antimetabólico.

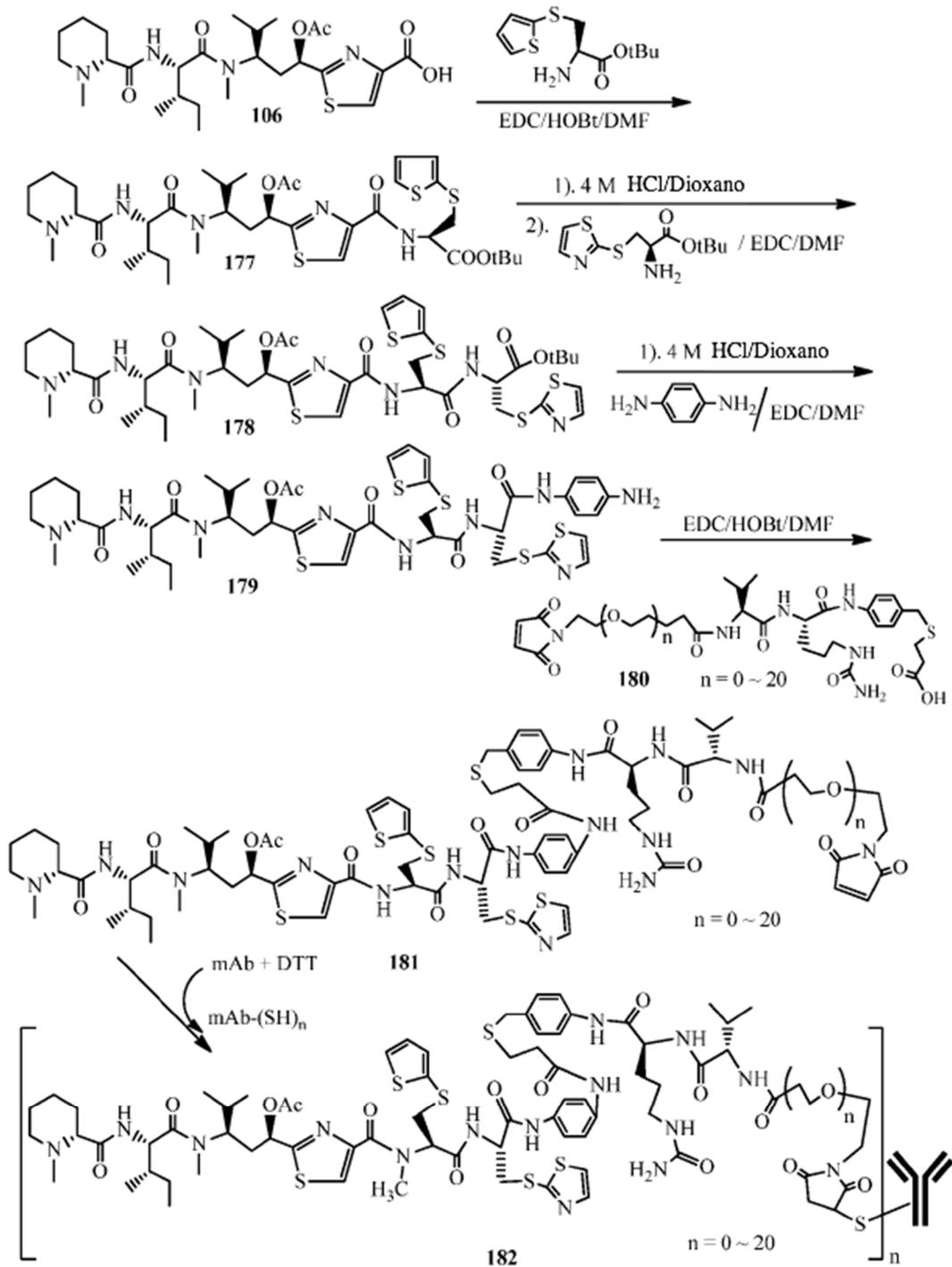


Figura 17. La síntesis de un anticuerpo de conjugados de agente antimetabólico.

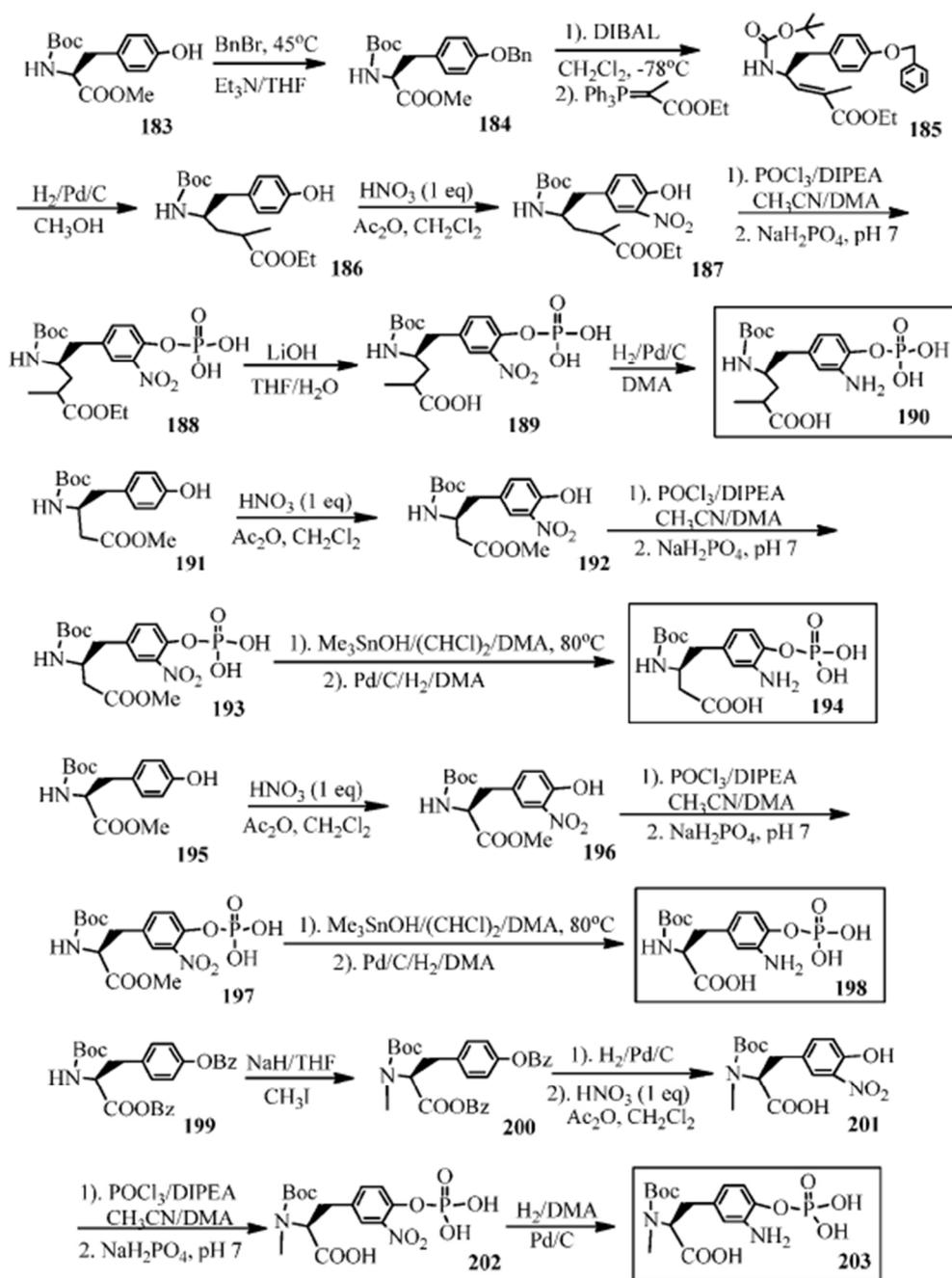


Figura 18. Síntesis de análogos Tut hidrófilos para la síntesis de los agentes antimitóticos hidrófilos (fosfato profármaco de)

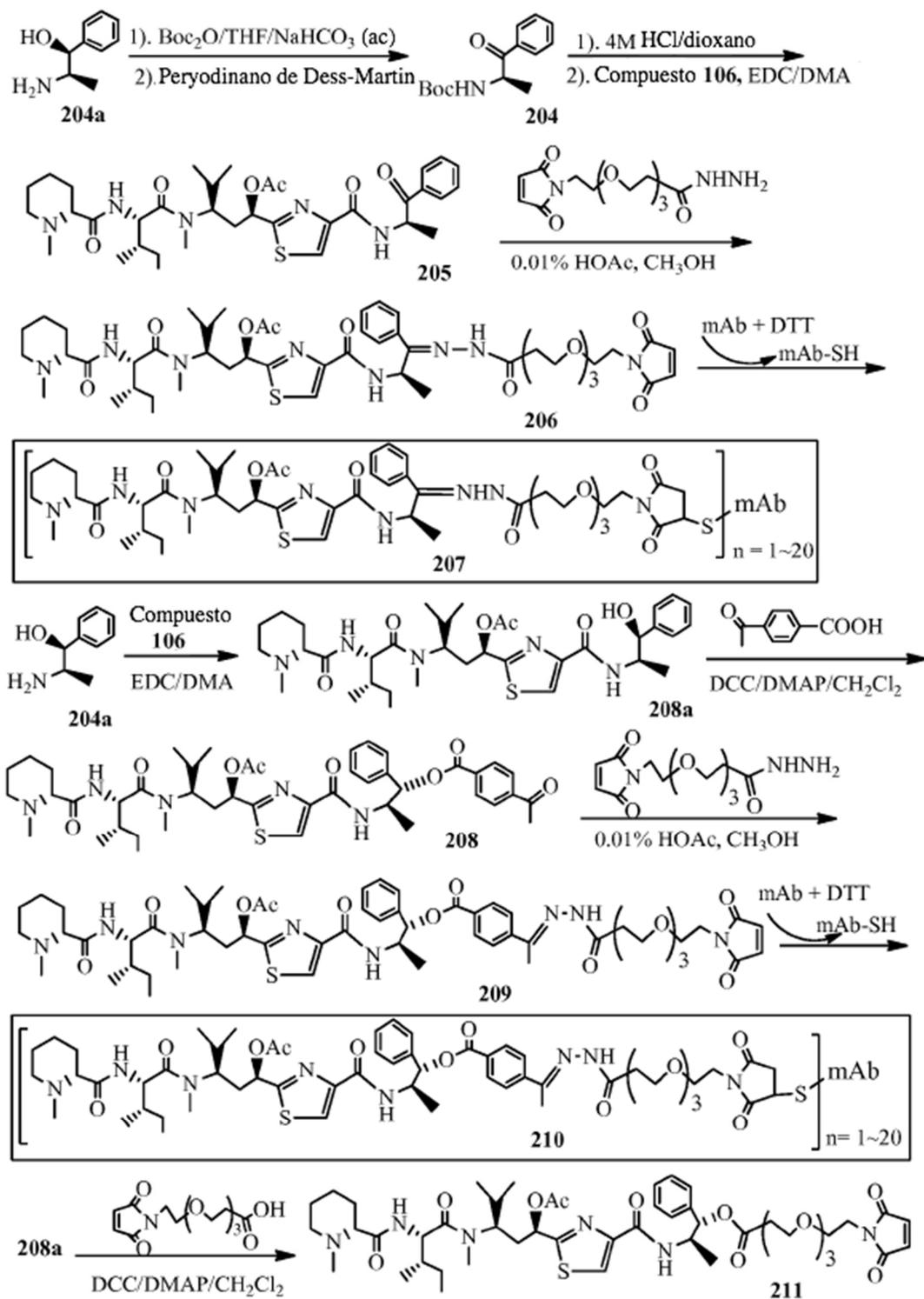
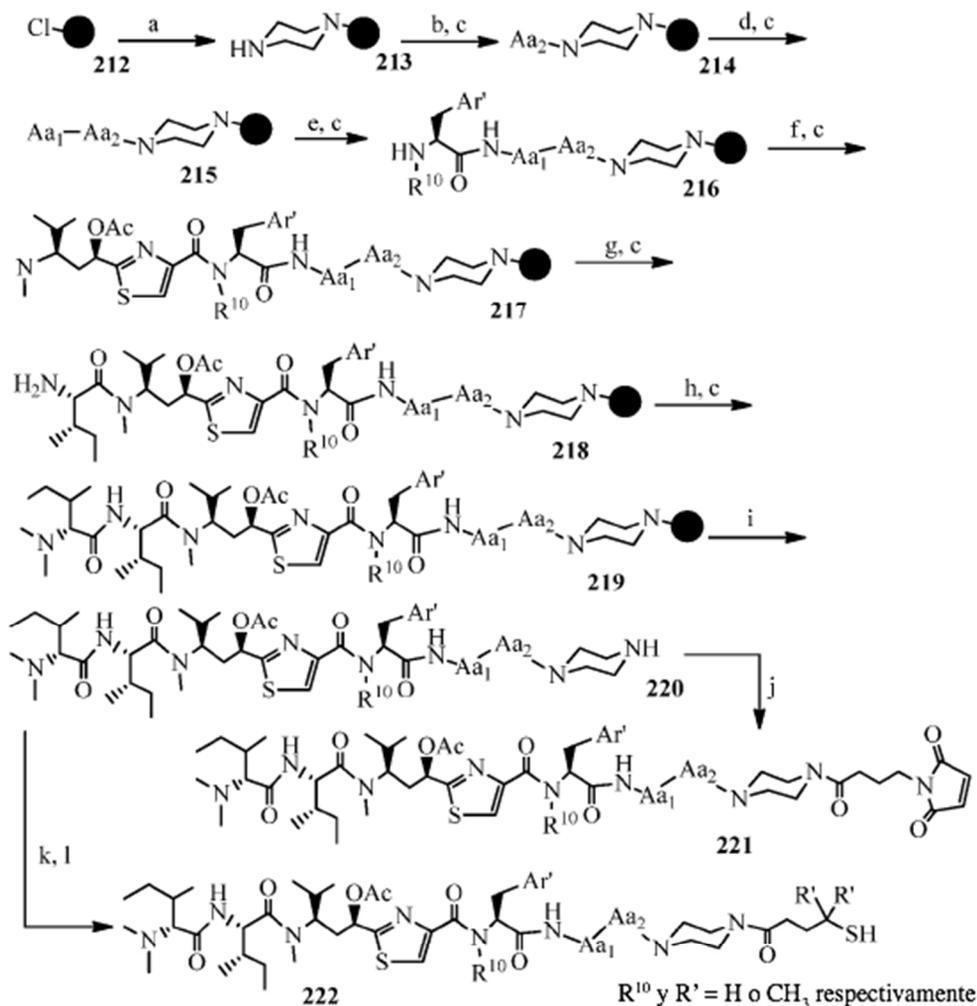
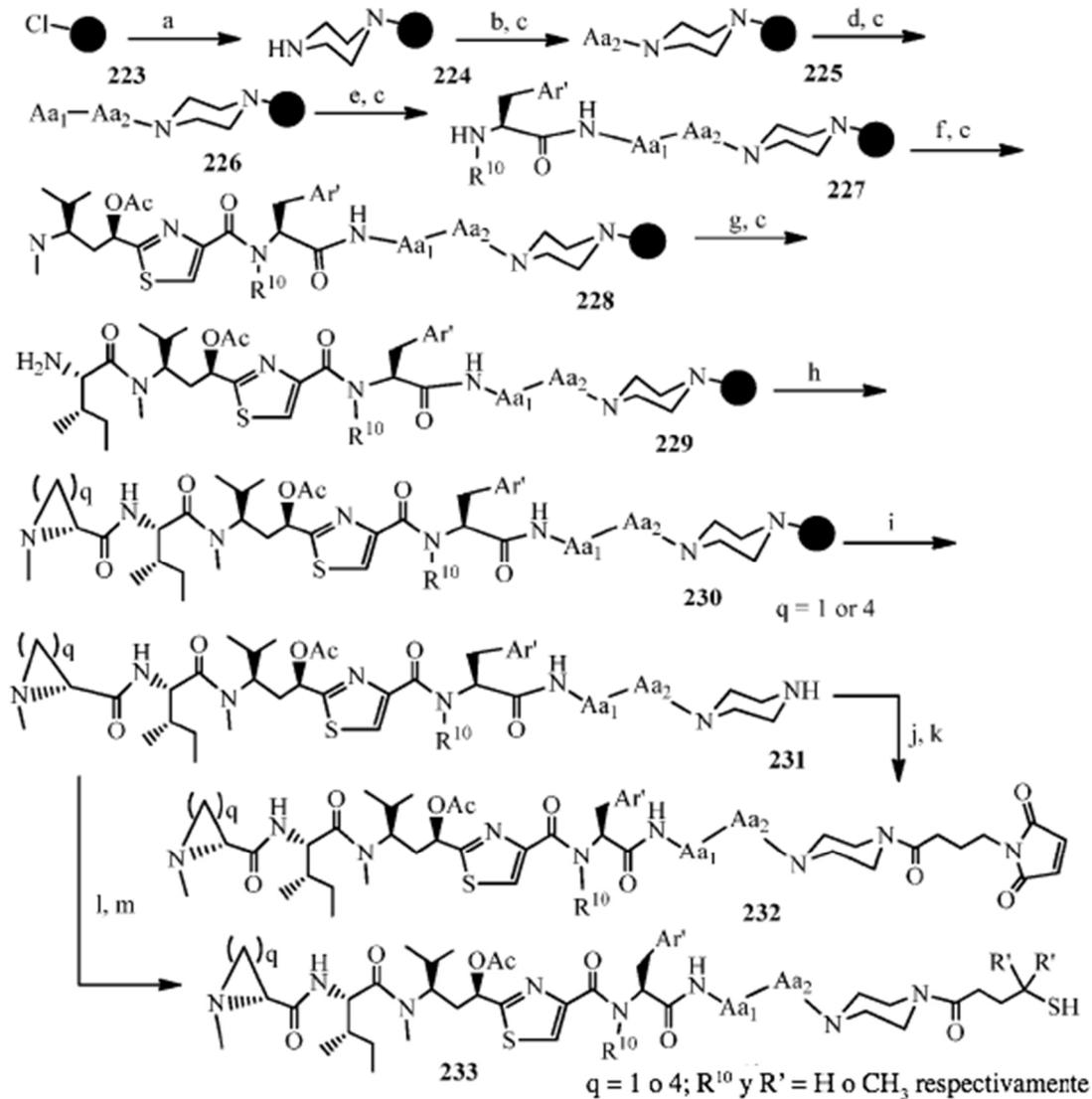


Figura 19. La síntesis de los conjugados de los agentes antimetabólicos con un anticuerpo.



Condiciones: a): Piperacina (5 ~ 20 eq), CH_2Cl_2 , 4h; b): Boc-Aa2-OH (2 ~ 5 eq), PyBroP (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; c): 4M HCl/dioxano, 0.5h; luego lavar con DIPEA (2 ~ 3eq), DMF; d): Boc-Aa1-OH (2 ~ 5 eq), TBTU (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; e): (2 ~ 5 eq) BocNMe-Phe-OH, o Boc-Trp-OH, o BocNMe-Tyr(PO(OBz)OH)-OH, o BocNMe-(Pyr)Ala-OH, o Boc-(Tienil)-Ser-OH, or Boc-(Tiazolil)-Ala-OH, Boc-Hyp-OH, PyBroP (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; f): Boc-N(Me)-Tuv-OH (1.5 ~ 3 eq), PyBroP (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 2 h; g): Boc-Ile-OH (2 ~ 5 eq), PyBroP (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 3 h; h): NMe_2 -Ile-OH, TBTU (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 2h; i): TFA, anisol; j): éster NHS de ácido 4-maleimida butírico (1.5 ~ 2 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 2 h; k): éster NHS de ácido 4-(metildisulfanil)butanoico (1.5 ~ 2 eq), o 4,4-dimetil éster NHS de ácido 4-(metildisulfanil)butanoico (1.5 ~ 2 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 2 h; l): TCEP (3 ~ 10 eq), Dioxano/amortiguador pH 7,0, luego guanidina soportada en sólido.

Figura 20. Síntesis en fase sólida de BOC de los agentes antimitóticos conjugados.



Condiciones: a): $(MeNCH_2)_2$ (5 ~ 20 eq), DCM, 4h; b): Fmoc-Aa2-OH (2 ~ 5 eq), PyBroP (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; c): 20% piperidina, DMF, 2h; d): Fmoc-Aa1-OH (2 ~ 5 eq), TBTU (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; e): (2 ~ 5 eq) FmocNMe-Tyr(SO₃H)-OH, o Fmoc-TrpOH-OH, o FmocNMe-Tyr(PO(OBz)-OH)-OH o FmocNMe-Tyr(Glucosa)-OH, or Boc-(quinolilo)Ala-OH, o Fmoc-(tienilo)Ser-OH, (Fenilo)-Cys-OH, PyBroP (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; f): Fmoc- N(Me)-Tuv-OH (1.5 ~ 3 eq), PyBroP (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; g): Fmoc-Ile-OH (2 ~ 5 eq), PyBroP (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; h): Mep-OH (2 ~ 4 eq), or (R)-1- metilaciradina -2- carboxilato, TBTU (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 2h; i): TFA, DCM, anisol ; j): éster NHS de ácido 4-maleimida butírico (1.5 ~ 2 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; k): 20% TFA, DCM; l): éster NHS de ácido 4-(metildisulfanil)butanoico (1.5 ~ 2 eq), o 4,4-dimetil éster NHS de ácido butanoico 4-(metildisulfanil) (1.5 ~ 2 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; m): TCEP (8 eq), Dioxano/amortiguador pH 7,0, luego guanidina soportada en sólido.

Figura 21. Síntesis de fase sólida de Fmoc de los agentes antimitóticos conjugados.

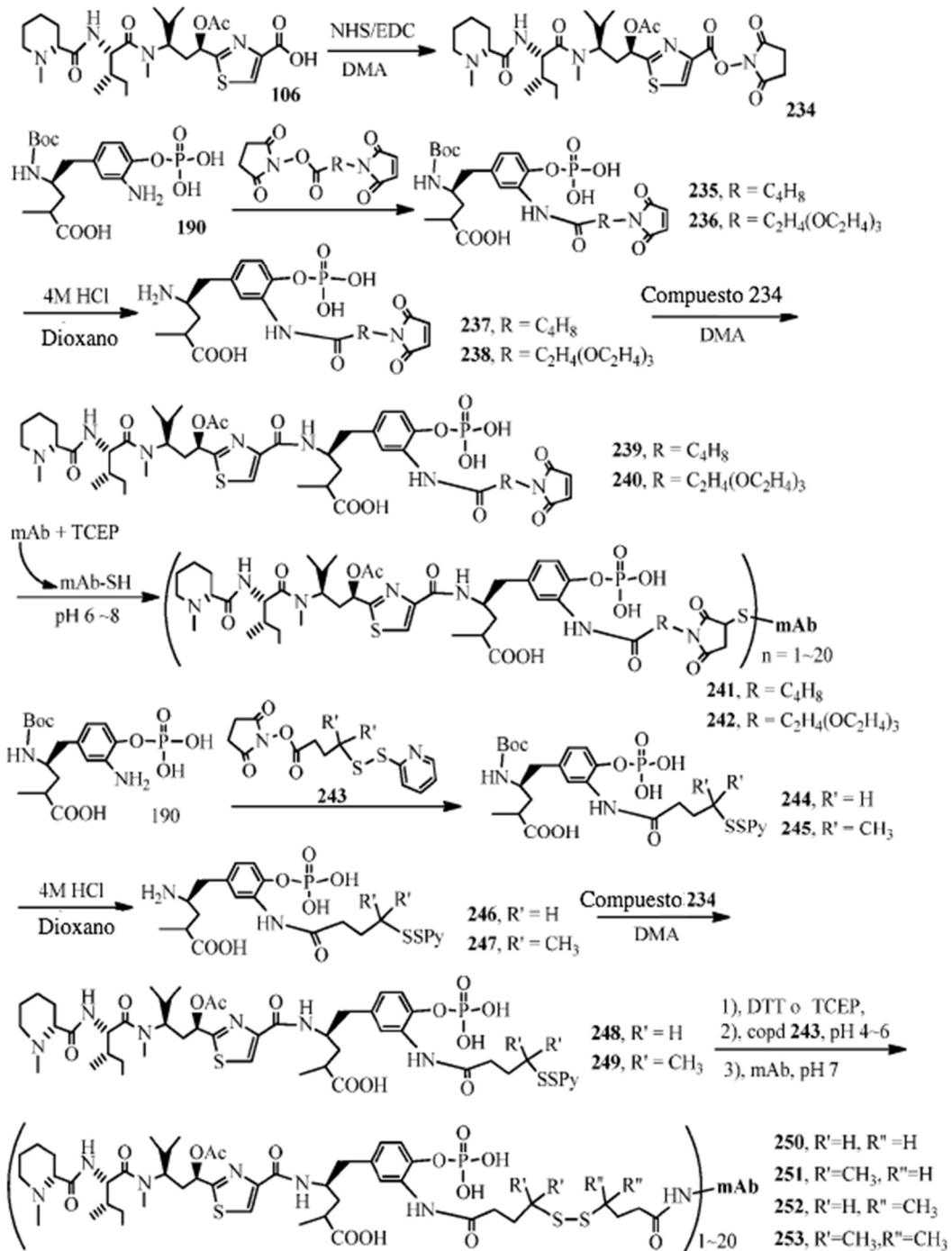
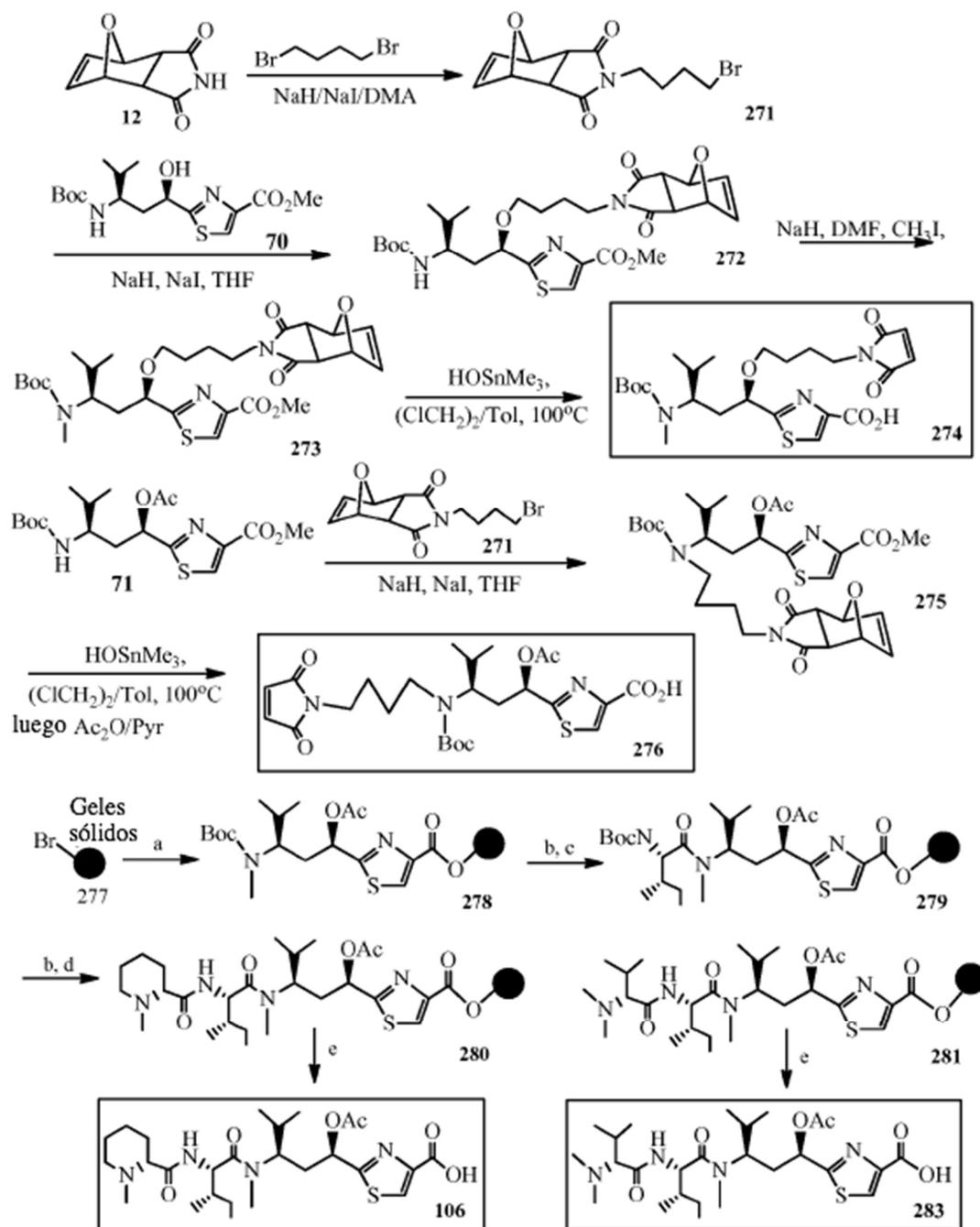
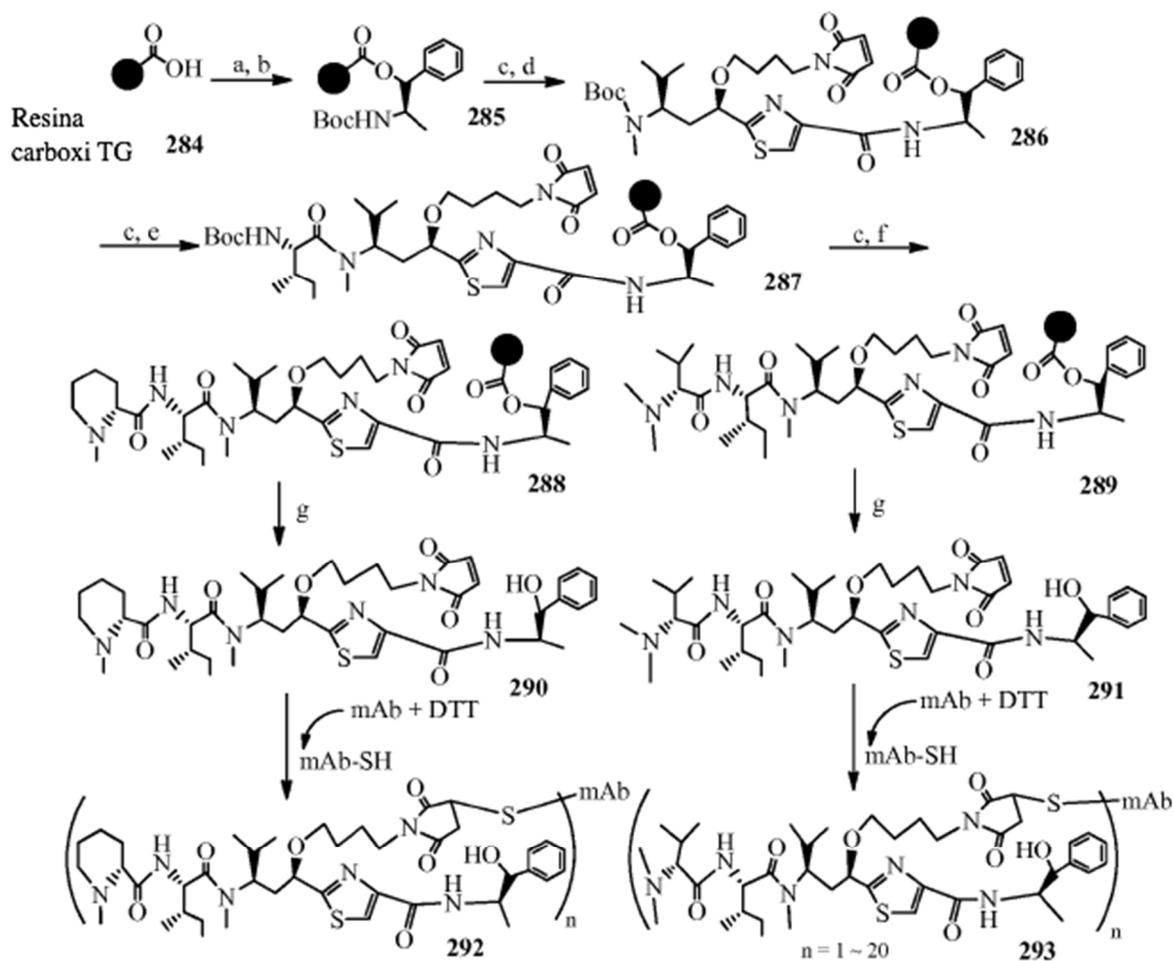


Figura 22. La síntesis de los fármacos antimetabólicos hidrofílicos y sus conjugados con un anticuerpo.



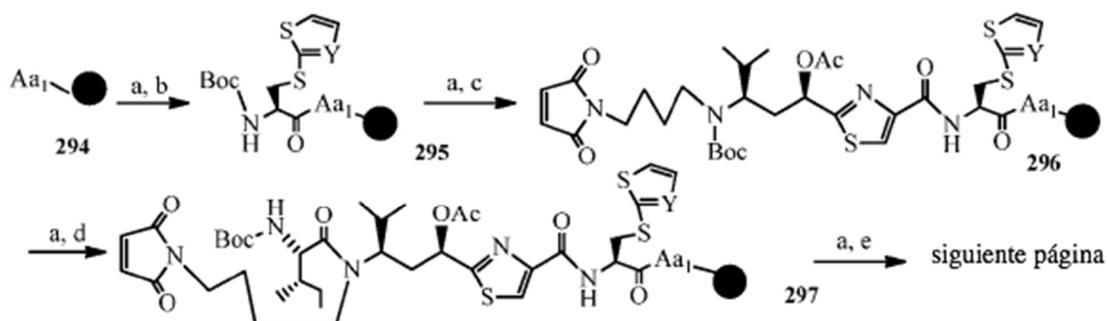
Condiciones: a): compuesto **72**, DIPEA, CsI, DMF, 2 h; b): 20% TFA/DCM, 0.5 h, luego lavar con DIPEA, MeOH, DCM; c): Boc-Ile-OH (3 ~ 5 eq), PyBroP (3 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 6 h; d): Mep-OH (2 ~ 4 eq), or NMe₂-Leu-OH, TBTU (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 6 h; e): 95%TFA/anisol/DCM.

Figura 23. La síntesis de derivados Tuv y la síntesis en fase sólida de componentes en Mep-Ile-Tuv y NMe₂-Val-Ile-Tuv.



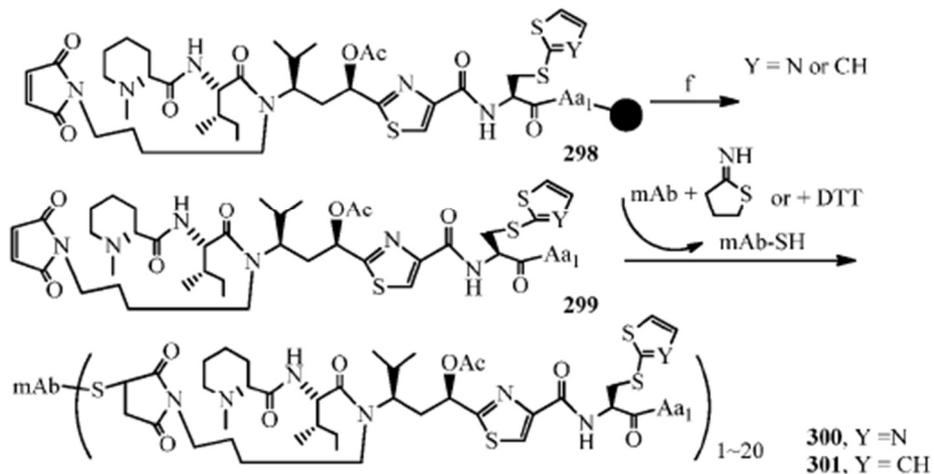
Condiciones: a): $(\text{COCl})_2$ 6 eq, DMF (cat), DCM, 1h; b): D-(+)-Boc-norefedrina 4 eq, DIPEA, DCM, 4h; c): 20% TFA/DCM, 0.5 h, luego lavar con DIPEA, MeOH, DCM; d): compuesto 274 (1.2 eq), TBTU (5 eq), DMF, 6h; e): Boc-Ile-OH (3 ~ 5 eq), PyBroP (3 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 4 h; f): Mep-OH (2 ~ 4 eq), o $\text{NMe}_2\text{-Leu-OH}$, TBTU (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 2h; g): HOSnMe_3 , $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, 80°C , 8h.

Figura 24. La síntesis de los agentes antimitóticos y su conjugación con un anticuerpo.



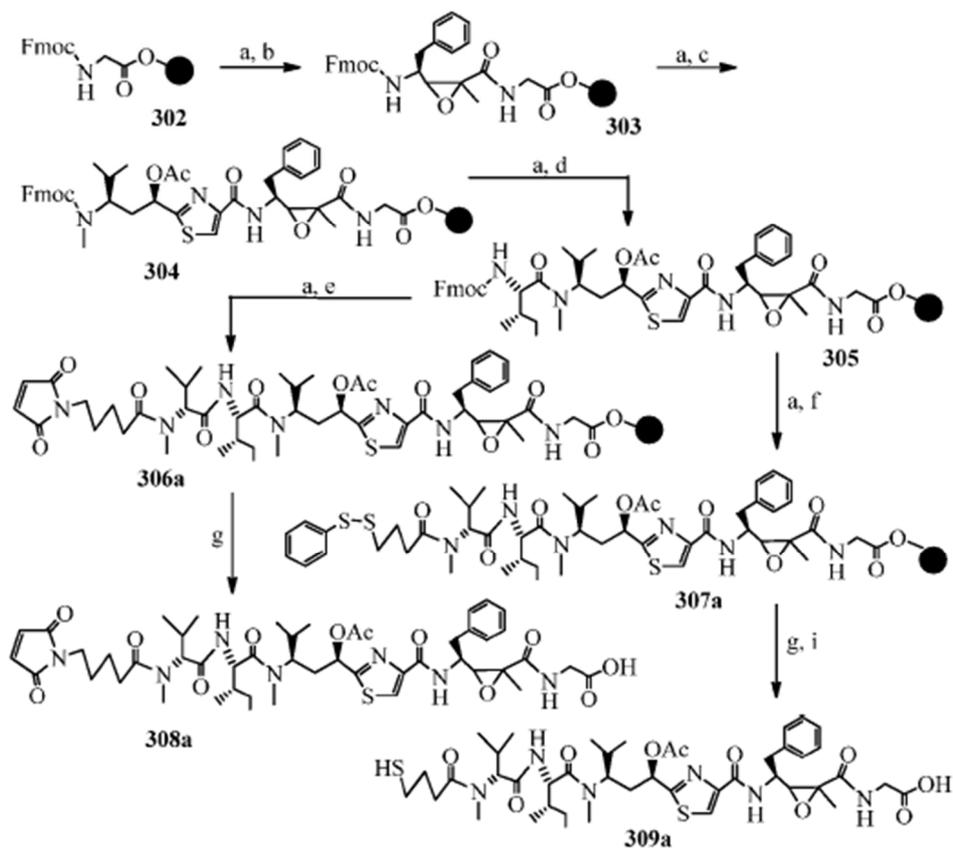
Condiciones: a): 20% TFA/DCM, 0.5 h, luego lavar con DIPEA, MeOH, DCM; b): Boc-(2-tiazolilo)-Cys-OH (2 eq), o 2-Tienilo)-L-Cys-OH (2 eq) PyBroP (4 eq), DIPEA (4 eq), DMF, 6

h; c): compuesto 276, TBTU (4 eq), DIPEA (4 eq), DMF, 6 h; d): Boc-Ile-OH (4 eq), PyBroP (4 eq), DIPEA (4 eq), DMF, 6 h;



Condiciones: e): Mep-OH (2 ~ 4 eq), or NMe₂-Leu-OH, TBTU (2 ~ 5 eq), DIPEA (3 ~ 10 eq), DMF, 2h; f): TFA/DCM/anisol/p- tiolcresol (95:4:0.5:0.5)

Figura 25. La síntesis en fase sólida de un agente antimitótico y su conjugado con un anticuerpo.



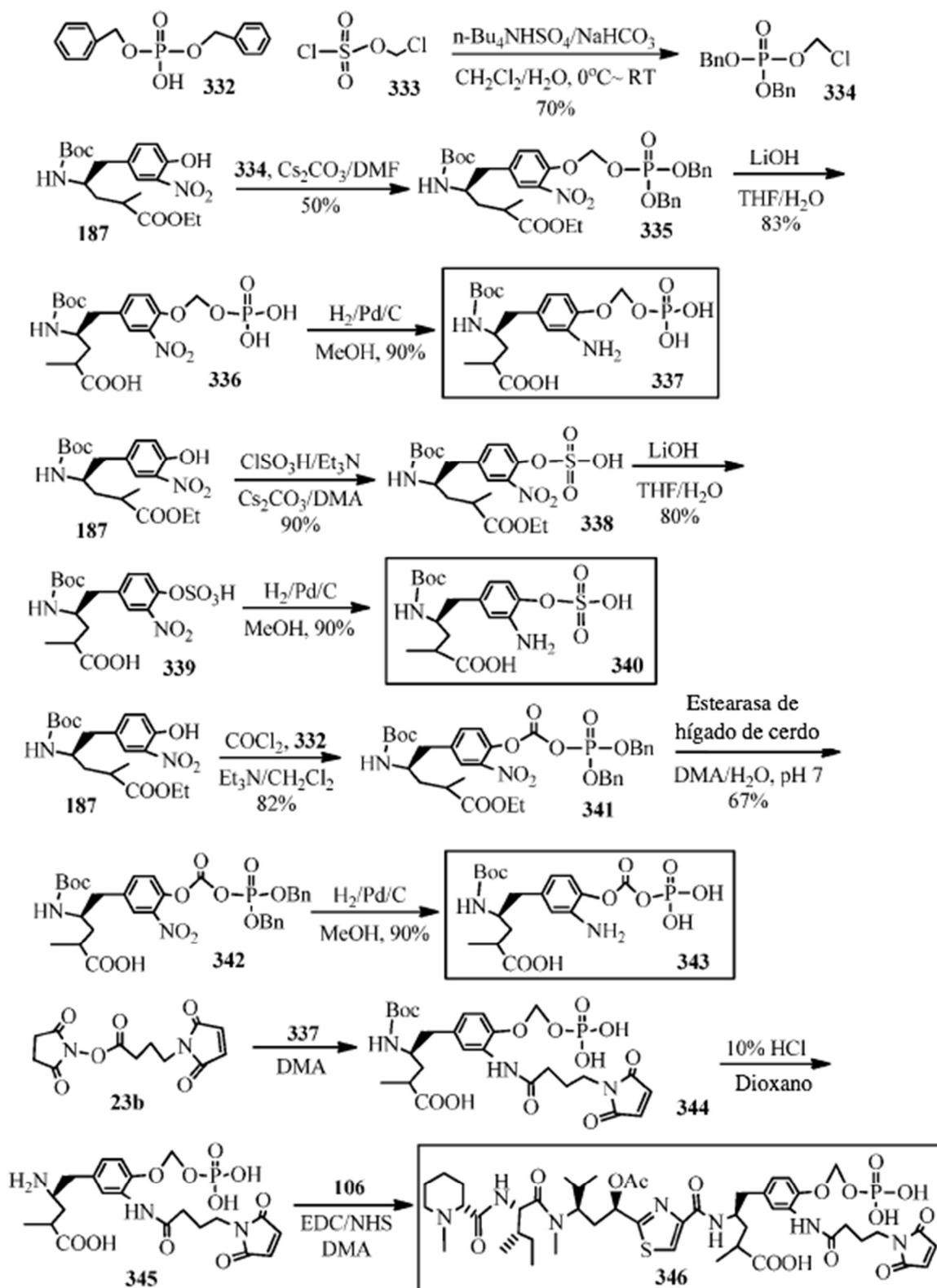


Fig 29. Síntesis de análogos Tut hidrofílicos para la síntesis de los profármacos hidrofílicos de agentes antimitóticos.

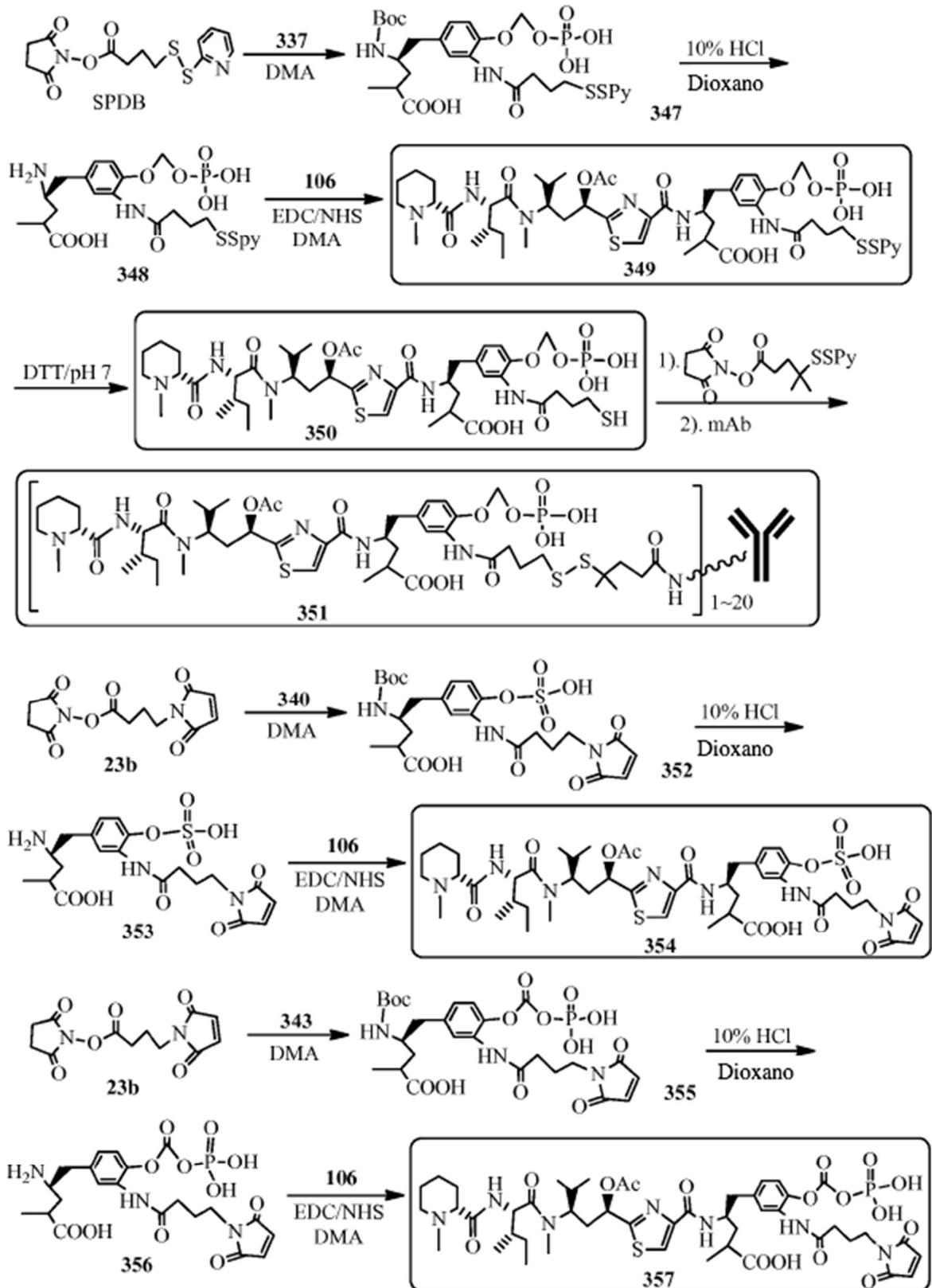


Fig 30. Síntesis de los profármacos hidrófilos de agentes antimitóticos para la conjugación con un agente de unión celular.

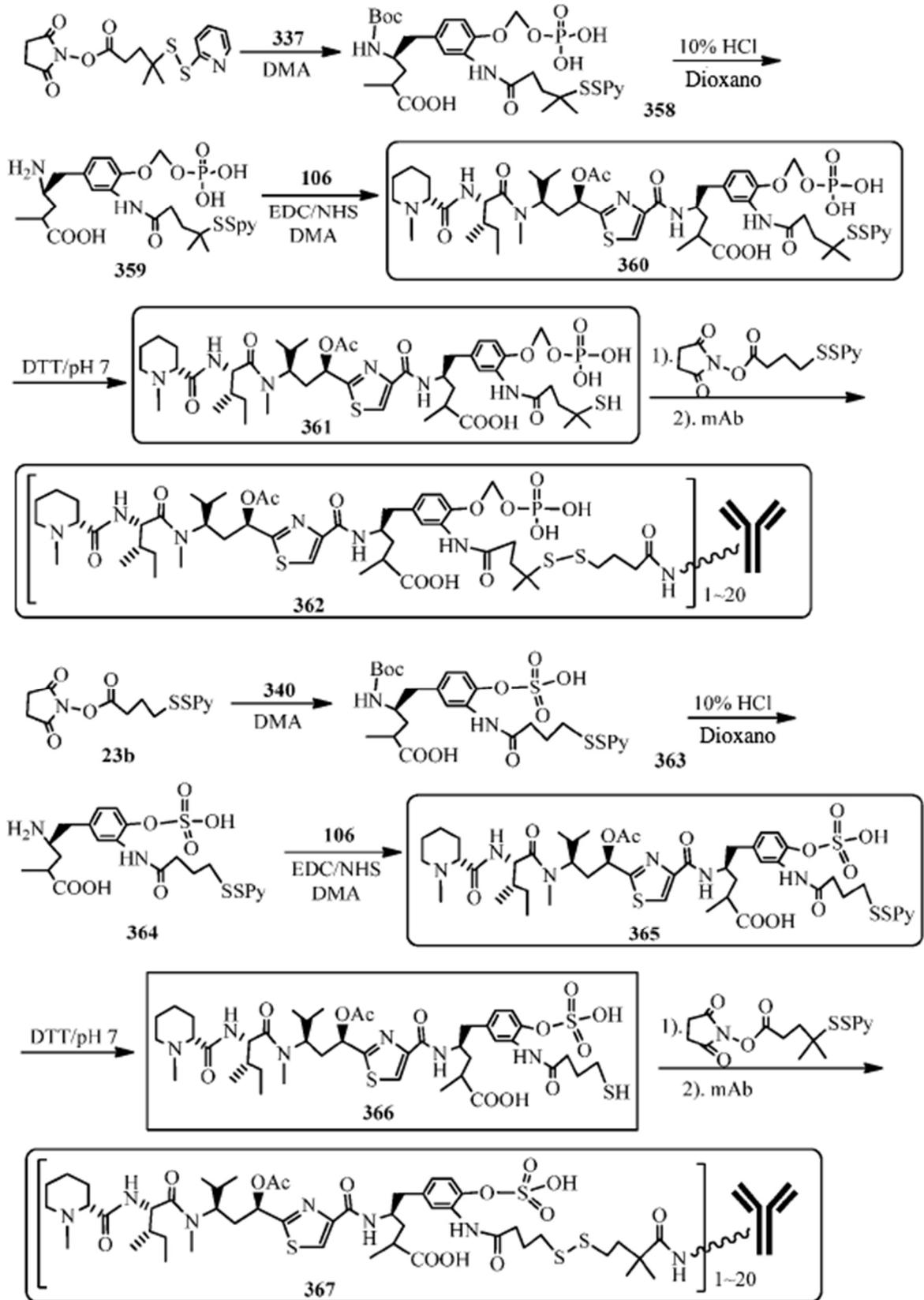


Figura 31. La síntesis de los profármacos hidrófilos de agentes antimitóticos para la conjugación con un agente de unión celular.

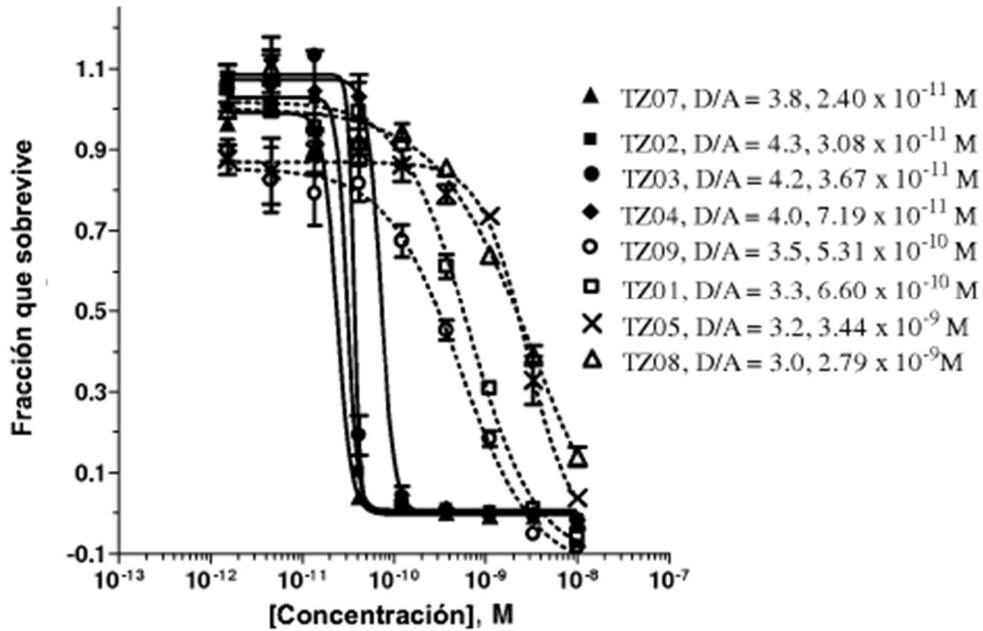


Figura 33. Efectos citotóxicos de conjugados de agente antimitótico del anticuerpo antiCD22 (TZ01 TZ09) con proporción fármaco/anticuerpo (D/A) 3.0 ~ 4.3 en Ramos (línea celular de linfoma de Burkitt). Las células fueron incubadas con los conjugados por 5 días y los valores IC_{50} se indican en la figura.

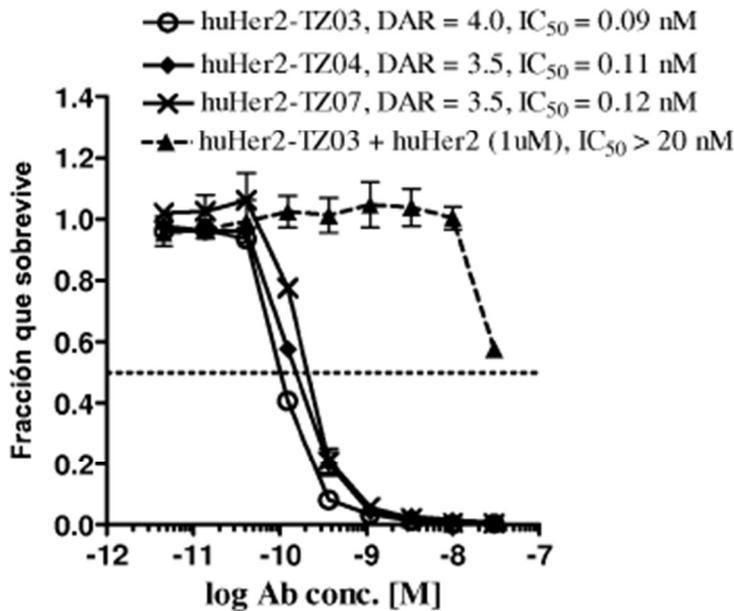


Figura 34. Efectos citotóxicos de los conjugados del agente antimitótico Trastuzumab (TZ03, TZ04, y TZ07) con proporción fármaco/anticuerpo (DAR) 3.5 ~ 4.0 en KPL-4 (línea celular de cáncer de seno). También muestra que el conjugado Trastuzumab-TZ03 induce un efecto antiproliferativo potente específicamente con $IC_{50} = 90$ pM en la ausencia de Trastuzumab no conjugado e $IC_{50} > 20$ nM en

presencia de concentración de 1 micromol de Trasuzumab (para saturar la unión de antígeno) respectivamente. La ventana de especificidad es >222 ($IC_{50} > 20$ nM/ $IC_{50}=0.09$ nM).

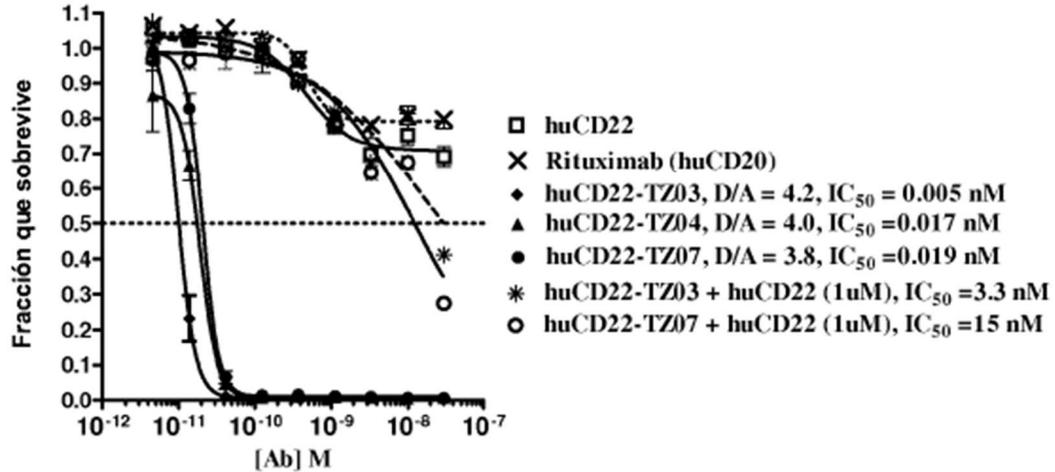
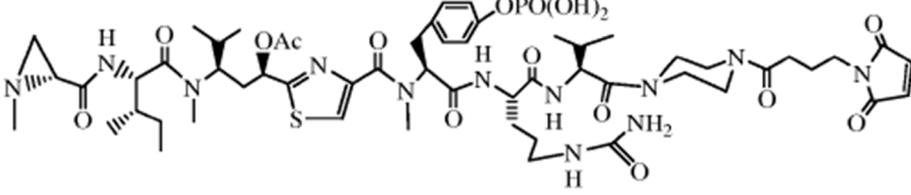
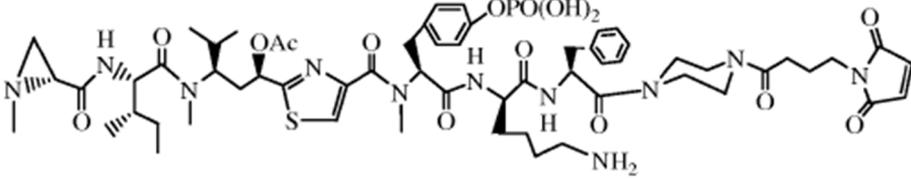
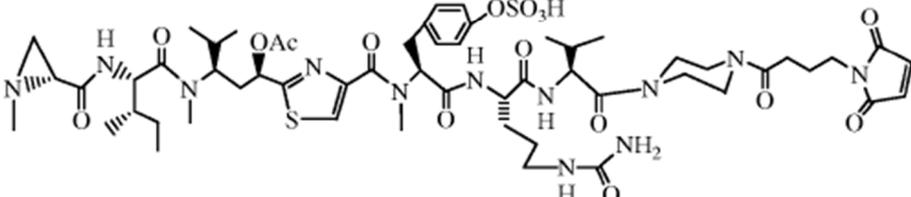
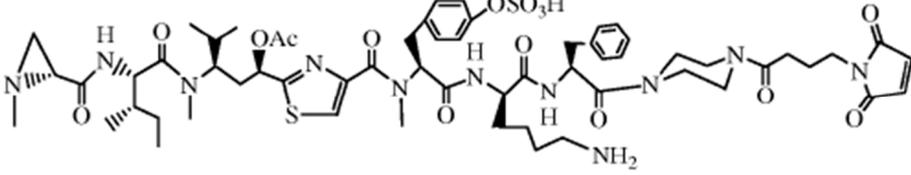
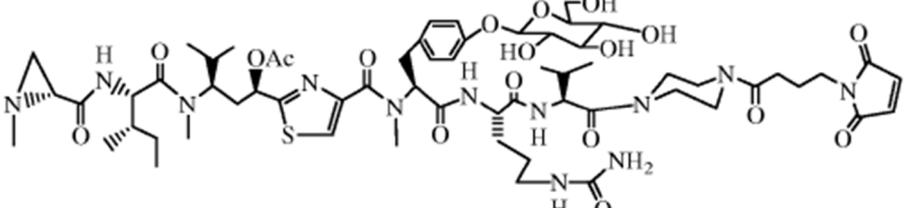
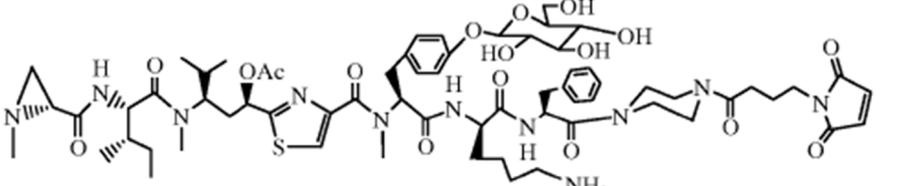
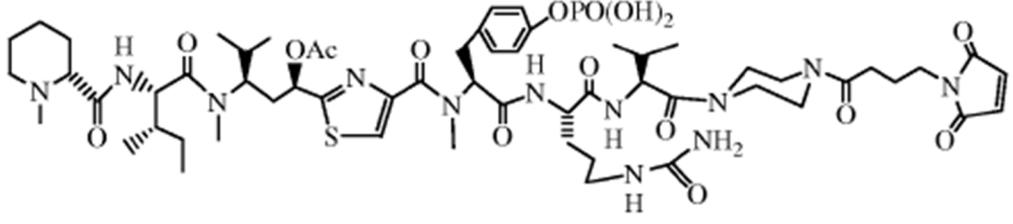
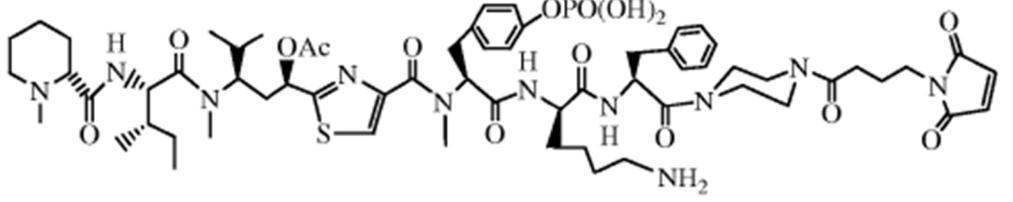
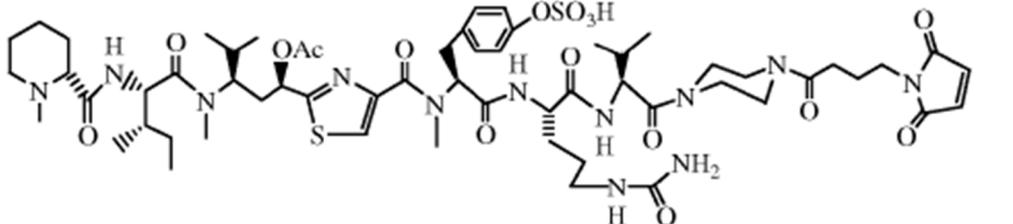
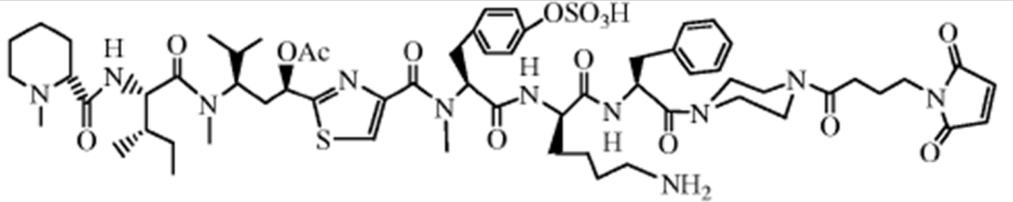
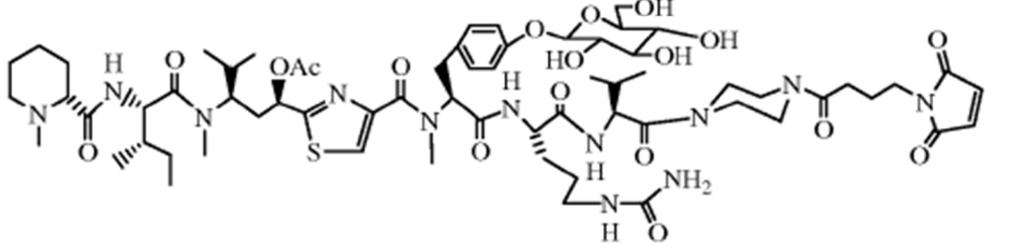


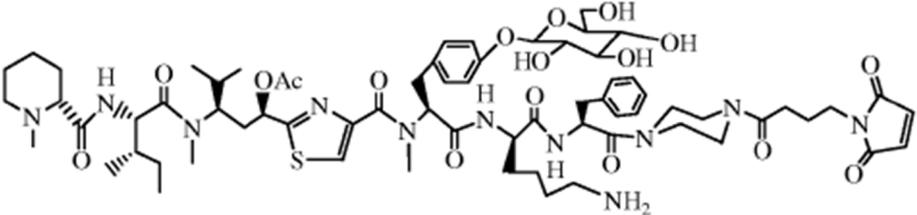
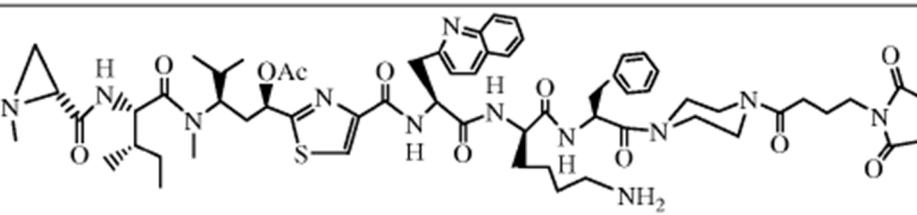
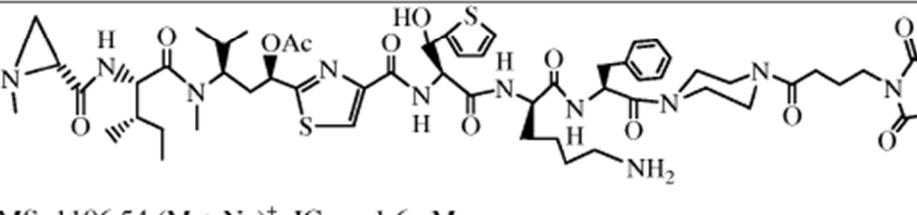
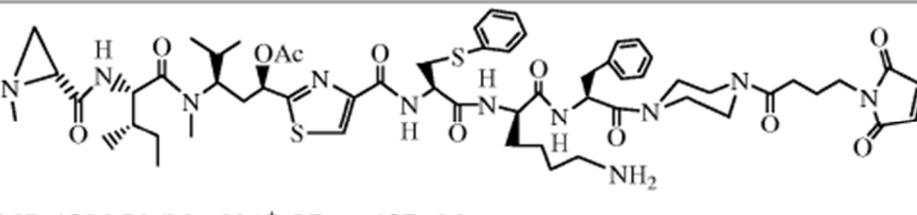
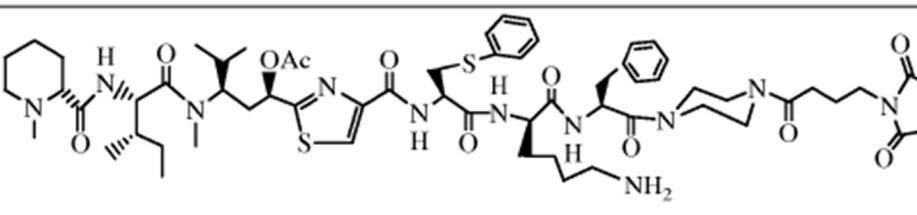
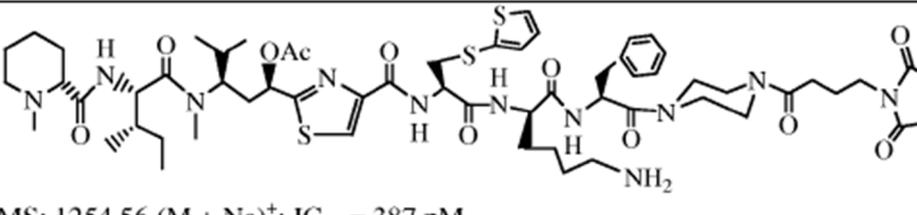
Figura 35. Efectos citotóxicos de los conjugados del agente antimetabólico del anticuerpo antiCD22 (TZ03, TZ04, y TZ07) con proporción fármaco/anticuerpo (D/A) 3.8 ~ 4.2 y del CD22 no conjugado así como de anticuerpo CD20 (Rituximab) en BJAB (línea celular de linfoma de Burkitt). También muestra que el conjugado induce mucho más efecto antiproliferativo potente con $IC_{50} = 5 \sim 19$ pM que los anticuerpos no conjugados con $IC_{50} > 20$ nM. La ventana de especificidad cuando se utiliza concentración de 1 micromol de anticuerpo CD22 no conjugado para saturar la unión de antígeno son 600 ($IC_{50} = 3.3$ nM/ $IC_{50} = 0.005$ nM) para conjugado huCD22-TZ03 y > 790 ($IC_{50} = 15$ nM/ $IC_{50}=0.019$ nM) para conjugado huCD22-TZ07.

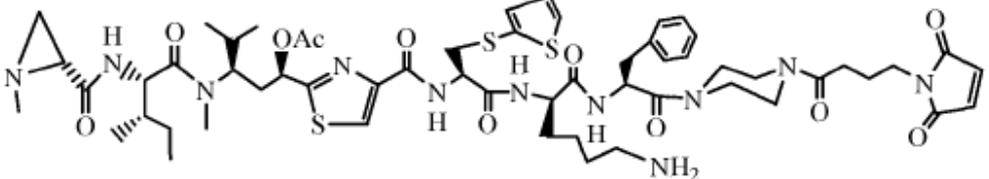
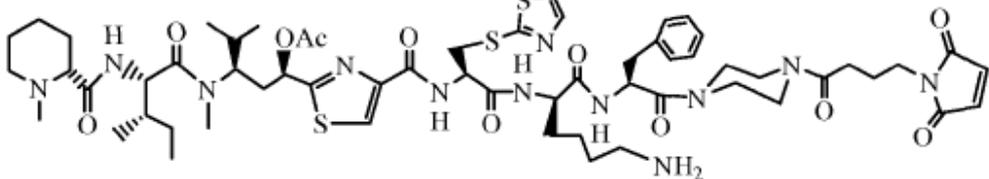
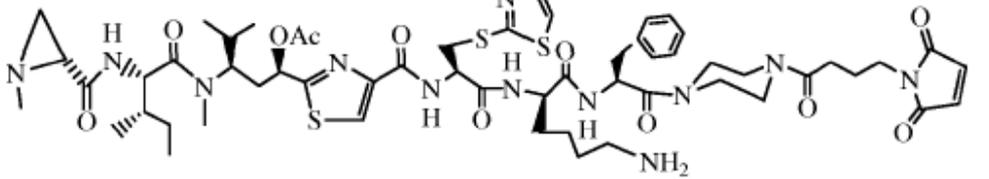
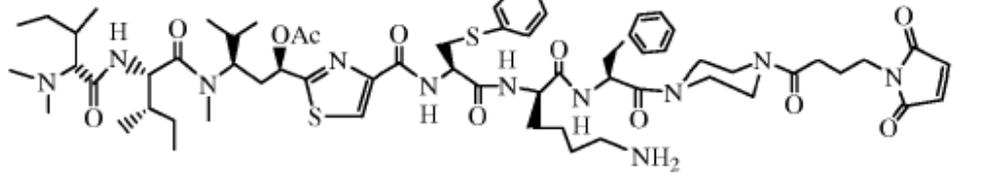
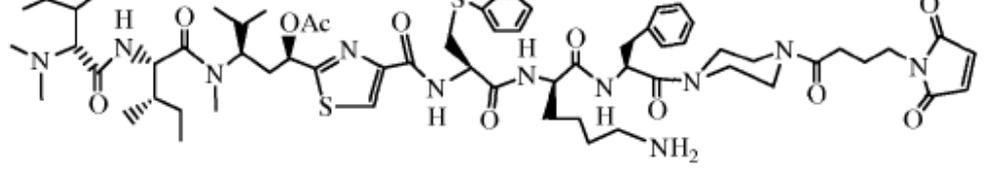
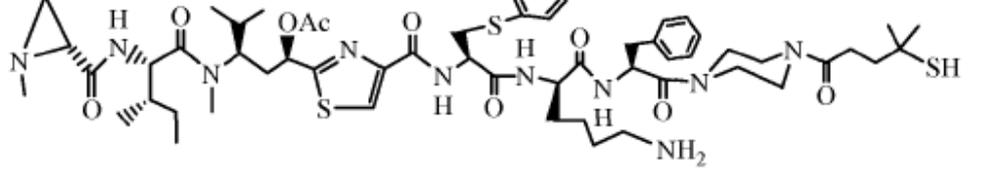
Tabla 1: La estructura de los fármacos antimetabólicos hecho a través de síntesis en fase sólida, su ion molecular de los espectros de masa y citotoxicidad in vitro de estos fármacos contra células Ramos (ATCC, una célula de linfoma de Burkitt humano)

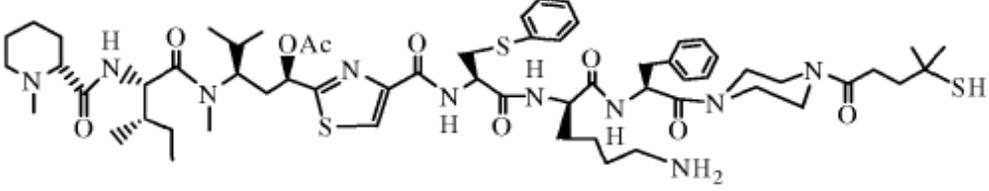
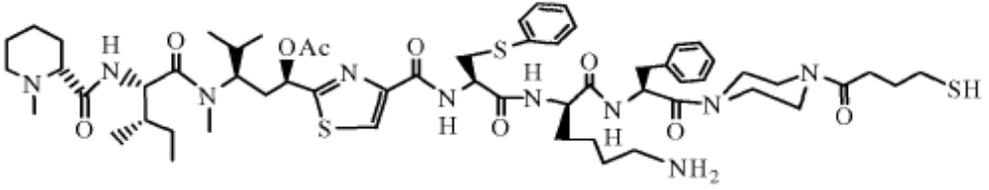
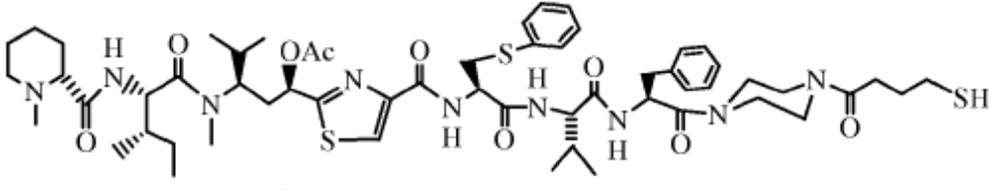
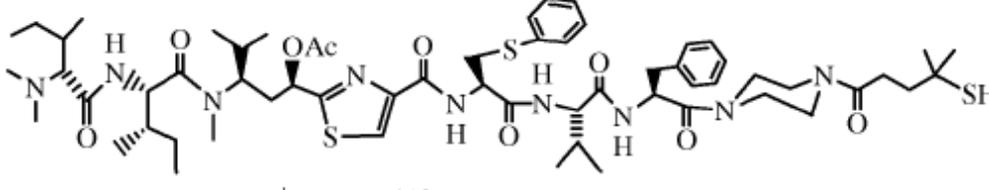
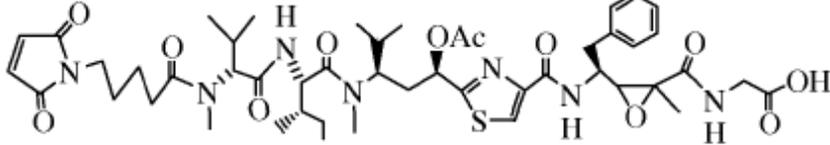
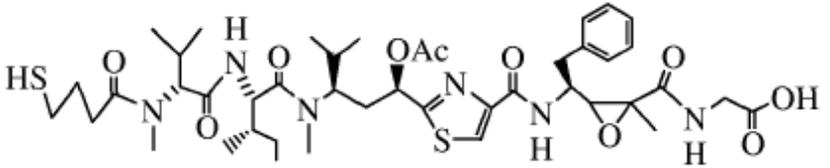
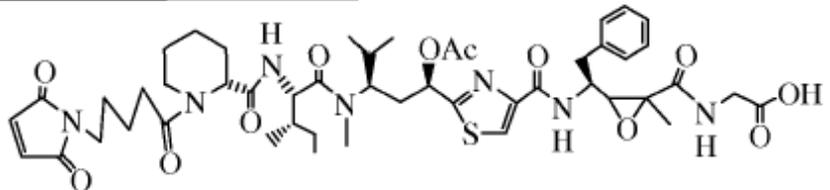
106	<p>MS 537.28 (M-H)⁻; $IC_{50} > 500$ nM</p>
283	<p>MS 539.30 (M-H)⁻; $IC_{50} > 500$ nM</p>

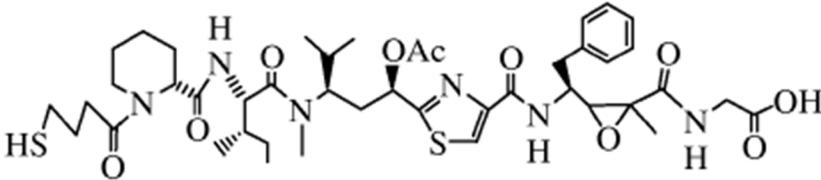
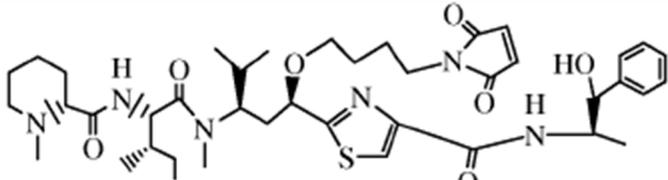
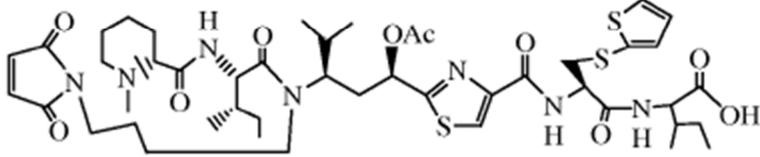
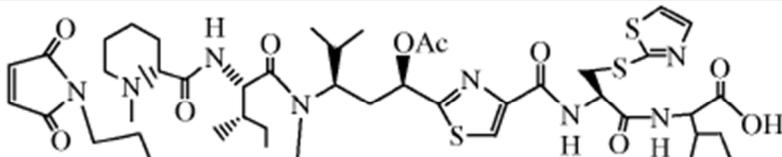
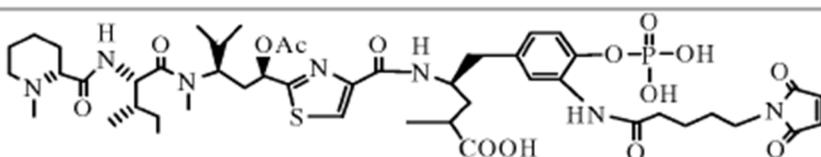
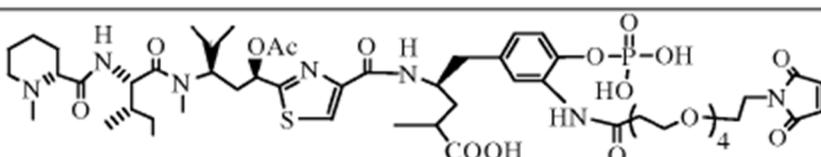
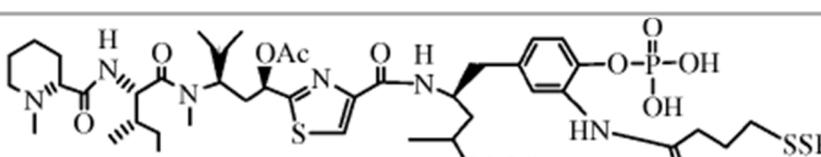
232a	 <p>MS: 1241.55 (M-H)⁻; IC₅₀ = 27 nM, o 321 pM (en presencia de 1u de fosfatasa ácida)</p>
232b	 <p>MS: 1260.56 (M-H)⁻; IC₅₀ = 47 nM, o 375 pM (en presencia de 1u de fosfatasa ácida)</p>
232c	 <p>MS: 1241.54 (M-H)⁻; IC₅₀ = 90 nM.</p>
232d	 <p>MS: 1260.55 (M-H)⁻; IC₅₀ = 107 nM</p>
232e	 <p>MS: 1347.64 (M+Na)⁺; IC₅₀ = 77 nM, o 121 pM (en presencia de 1u de glicosidasa)</p>
232f	

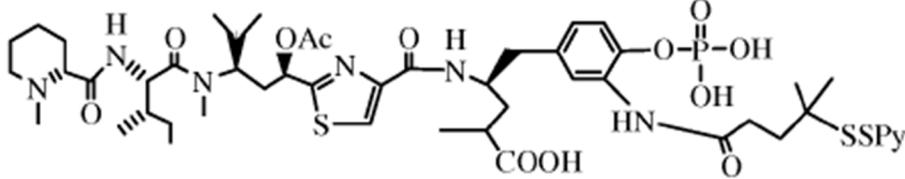
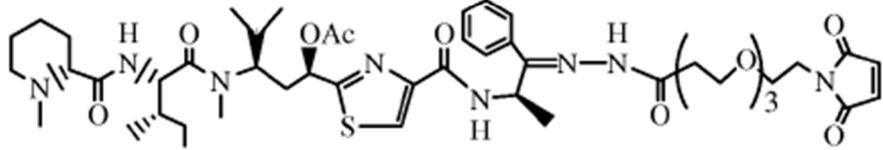
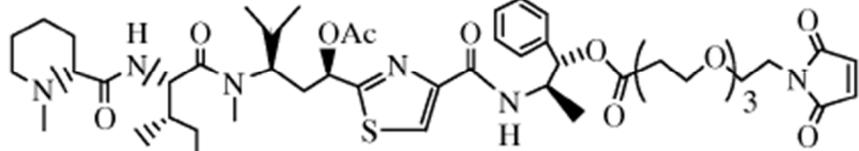
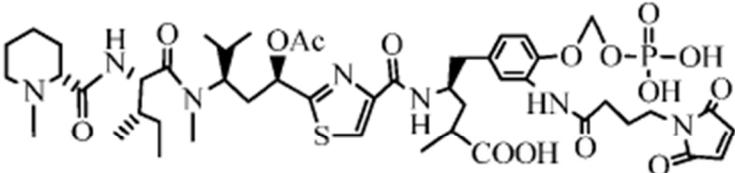
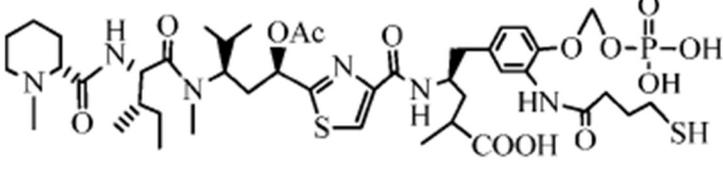
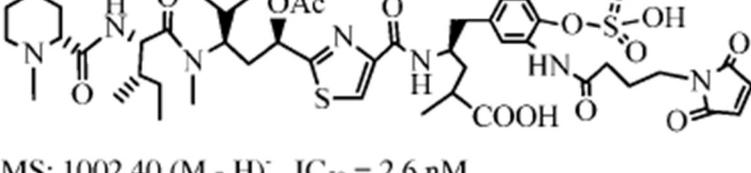
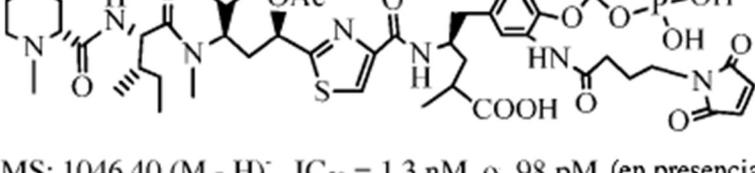
	MS: 1366.65 (M+Na) ⁺ ; IC ₅₀ = 99 nM, o 115 pM (en presencia de 1u de glicosidasa)
232g	 <p>MS: 1283.60 (M-H)⁻; IC₅₀ = 37 nM, o 101 pM (en presencia de 1u de fosfatasa ácida)</p>
232h	 <p>MS: 1302.61 (M-H)⁻; IC₅₀ = 56 nM, o 116 pM (en presencia de 1u de fosfatasa ácida)</p>
232i	 <p>MS: 1283.59 (M-H)⁻; IC₅₀ = 7.4 nM,</p>
232j	 <p>MS: 1302.60 (M-H)⁻; IC₅₀ = 9.7 nM,</p>
232k	 <p>MS: 1389.68 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 7.9 nM, o 161 pM (en presencia de 1u de glicosidasa)</p>

232l	 <p>MS: 1408.69 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 7.1 nM, o 142 pM (en presencia de 1u de glicosidasa)</p>
232m	 <p>MS: 1225.59 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 1.1 nM</p>
232n	 <p>MS: 1196.54 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 1.6 nM</p>
232o	 <p>MS: 1206.56 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 127 pM</p>
232p	 <p>MS: 1248.60 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 191 pM</p>
232q	 <p>MS: 1254.56 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 387 pM</p>

232r	 <p>MS: 1212.51 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 219 pM</p>
232s	 <p>MS: 1255.55 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 268 pM</p>
232t	 <p>MS: 1213.51 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 391 pM</p>
221a	 <p>MS: 1264.63 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 167 pM</p>
221b	 <p>MS: 1270.60 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 317 pM</p>
233a	 <p>MS: 1171.56 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 242 pM</p>

233b	 <p>MS: 1213.61 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 236 pM</p>
233c	 <p>MS: 1185.57 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 337 pM</p>
233d	 <p>MS: 1156.55 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 310 pM</p>
222a	 <p>MS: 1200.61 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 412 pM</p>
308a	 <p>MS: 988.46 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 167 pM</p>
309a	 <p>MS: 911.41 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 257 pM</p>
308b	 <p>MS: 986.44 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 19 pM</p>

309b	 <p>MS: 909.40 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 119 pM</p>
290	 <p>MS: 817.44 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 0.62 nM</p>
299a	 <p>MS: 996.41 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 1.1 nM</p>
299b	 <p>MS: 997.41 (M + Na)⁺; IC₅₀ = 637 pM</p>
241	 <p>MS: 1017.43 (M-H)⁻; IC₅₀ = 0.8 nM, o 21 pM (en presencia de 1u de fosfatasa ácida)</p>
242	 <p>MS: 1164.50 (M-H)⁻; IC₅₀ = 1.5 nM, o 78 pM (en presencia de 1u de fosfatasa ácida).</p>
247	 <p>MS: 1048.38 (M-H)⁻; IC₅₀ = 1.1 nM, o 68 pM (en presencia de 1u de fosfatasa ácida).</p>

248	 <p>MS: 1076.40 (M-H)⁻; IC₅₀ = 1.0 nM, o 19 pM (en presencia de 1u de fosfatasa ácida).</p>
206	 <p>MS: 1033.50 (M+Na)⁺, IC₅₀ = 307 pM</p>
211	 <p>MS: 977.47 (M+Na)⁺, IC₅₀ = 201 pM</p>
346	 <p>MS: 1032.42 (M - H)⁻, IC₅₀ = 1.0 nM, o 28 pM (en presencia de una fosfatasa ácida) .</p>
350	 <p>MS: 969.40 (M - H)⁻, IC₅₀ = 1.8 nM, o 110 pM (en presencia de una fosfatasa ácida)</p>
354	 <p>MS: 1002.40 (M - H)⁻, IC₅₀ = 2.6 nM,</p>
357	 <p>MS: 1046.40 (M - H)⁻, IC₅₀ = 1.3 nM, o 98 pM (en presencia de una fosfatasa ácida)</p>

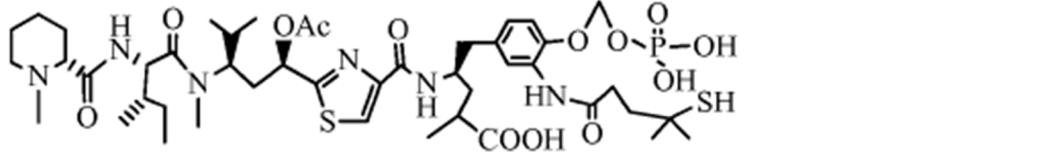
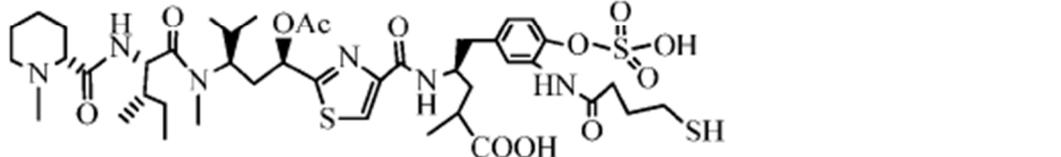
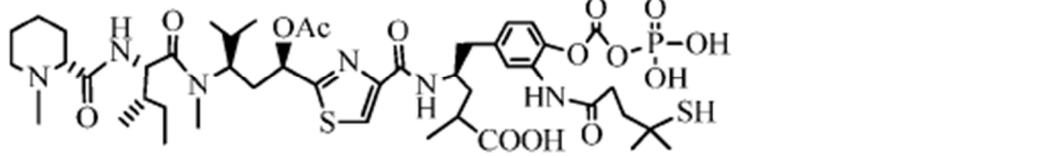
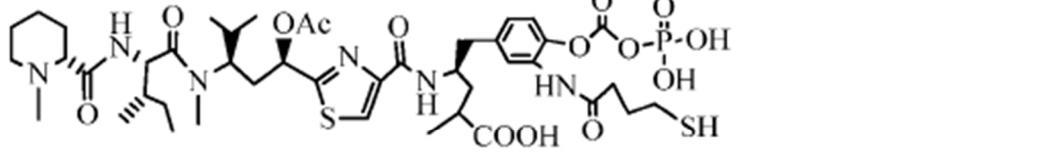
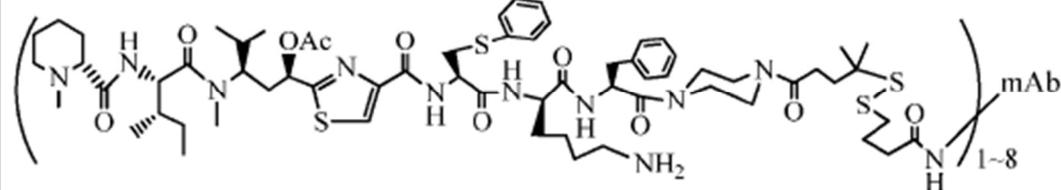
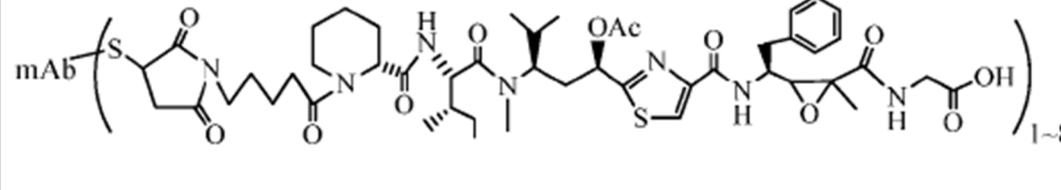
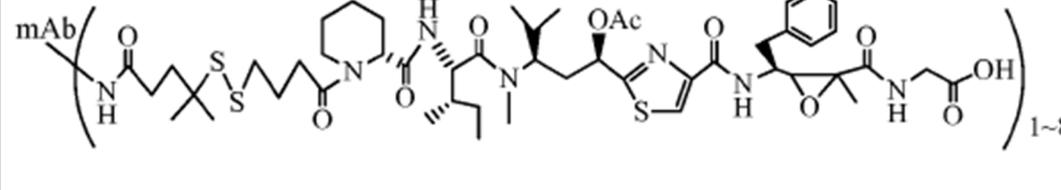
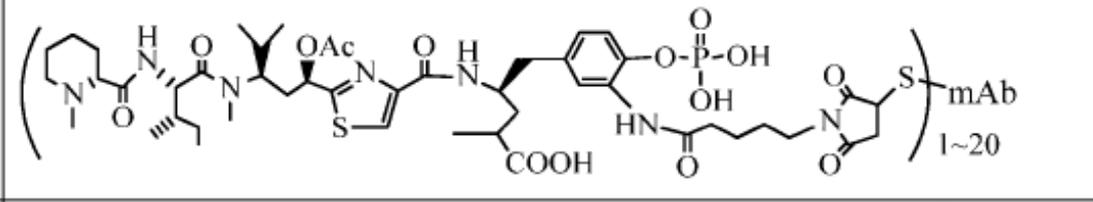
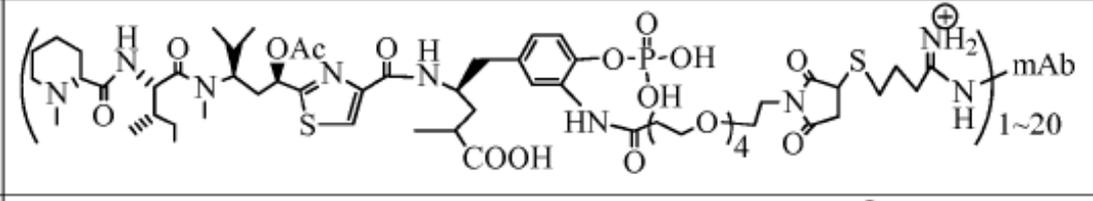
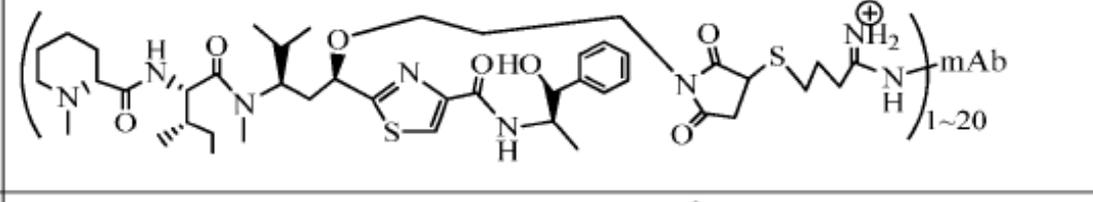
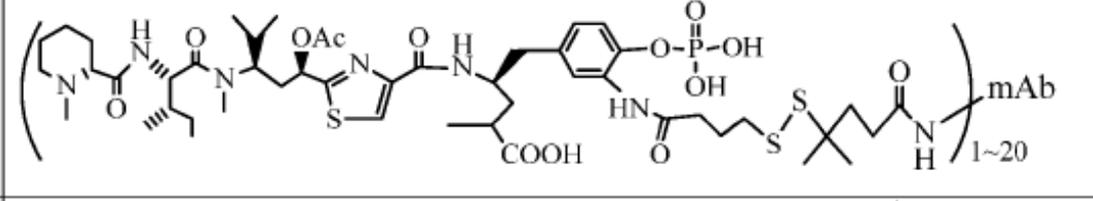
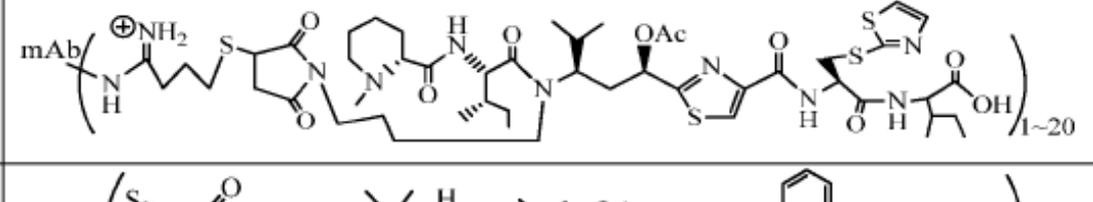
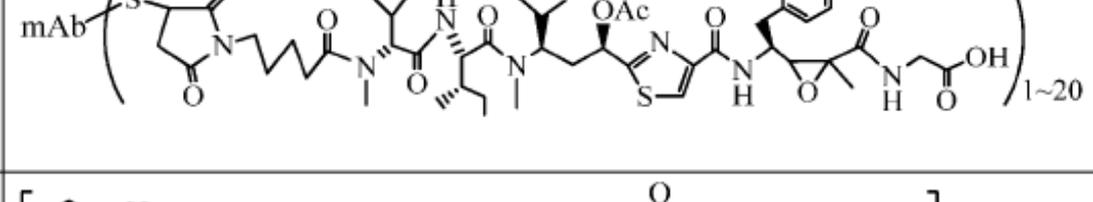
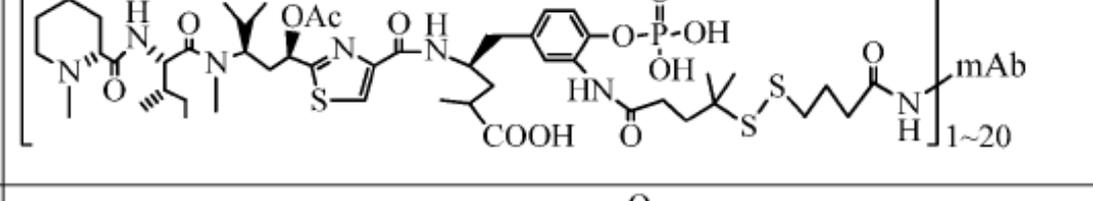
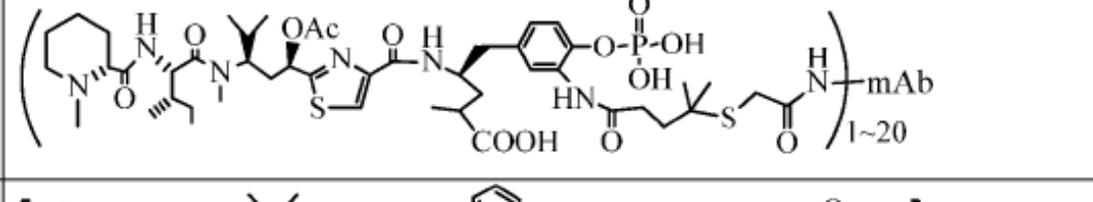
<p>361</p>	 <p>MS: 997.43 (M - H)⁻, IC₅₀ = 1.5 nM, o 142 pM (en presencia de una de fosfatasa ácida)</p>
<p>366</p>	 <p>MS: 939.37 (M - H)⁻, IC₅₀ = 1.9 nM</p>
<p>371</p>	 <p>MS: 1011.41 (M - H)⁻, IC₅₀ = 1.4 nM, o 95 pM (en presencia de una de fosfatasa ácida)</p>
<p>376</p>	 <p>MS: 983.37 (M - H)⁻, IC₅₀ = 1.5 nM, o 191 pM (en presencia de una de fosfatasa ácida)</p>

Tabla 2. Estructuras para algunos conjugados de agente antimetabólico-anticuerpo experimentales.

<p>mAb-TZ01</p>	
<p>mAb-TZ02</p>	
<p>mAb-TZ03</p>	

mAb-TZ04	
mAb-TZ05	
mAb-TZ06	
mAb-TZ07	
mAb-TZ08	
mAb-TZ09	
mAb-TZ10 (a)	
mAb-TZ10 (b)	
mAb-TZ11	