

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 630**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07D 207/44** (2006.01)  
**C07D 403/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05744346 .7**  
96 Fecha de presentación: **17.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1751192**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **ANTICUERPOS RETICULADOS.**

30 Prioridad:  
**19.05.2004 GB 0411186**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.03.2012**

73 Titular/es:  
**UCB PHARMA, S.A.**  
**ALLÉE DE LA RECHERCHE 60**  
**1070 BRUSSELS, BE**

72 Inventor/es:  
**BAKER, Terence Seward;**  
**McKAY, Catherine;**  
**NORMAN, Timothy John y**  
**PORTER, John Robert**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

**ES 2 375 630 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos reticulados

La presente invención se refiere a compuestos para uso para unir moléculas efectoras a anticuerpos. Más específicamente, la invención se refiere a moléculas que comprenden anticuerpos reticulados a los que se puede unir una molécula efectora. También se proporcionan métodos para la producción de tales moléculas, y composiciones farmacéuticas que las contienen.

La especificidad de unión de los anticuerpos se puede usar para suministrar moléculas efectoras, tales como fármacos, a dianas terapéuticas específicas tales como células tumorales. Las moléculas efectoras se pueden unir a anticuerpos usando diversos métodos, incluyendo, por ejemplo, la unión directa (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.677.425; EP 0948544) o la unión vía un ligador (documento US 5.218.128).

Los anticuerpos reticulados son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento US 5.262.524). Se ha demostrado que ciertos anticuerpos reticulados tienen capacidades de unión mejoradas, un aclaramiento sanguíneo *in vivo* mejorado, y una distribución tisular mejorada en comparación con las inmunoglobulinas naturales. Véase, por ejemplo, el documento WO 92/22583 que describe proteínas de unión a antígenos mono-específicas tri- y tetra- valentes que comprenden fragmentos Fab' unidos entre sí mediante una estructura conectora. El documento WO 92/22583 también describe el uso de la estructura conectora como un sitio para la unión de moléculas efectoras.

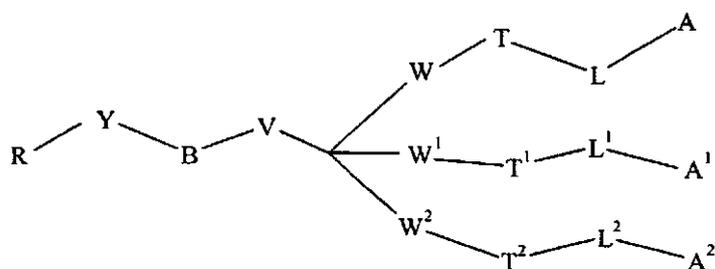
La presente invención proporciona compuestos que consisten esencialmente en los siguientes elementos: uno o más grupos reactivos; y dos o más anticuerpos reticulados o sus fragmentos; caracterizados porque el o cada grupo reactivo es adecuado para unirse a una molécula efectora pero no reacciona con ninguno de los anticuerpos o sus fragmentos.

Por lo tanto, la presente invención proporciona nuevos ligadores para reticular anticuerpos a los que se pueden unir moléculas efectoras. Ventajosamente, las moléculas ligadoras comprenden un único grupo reactivo que es adecuado para la unión específica del sitio de una molécula efectora, pero que no reacciona con los anticuerpos unidos al ligador. Además, el grupo reactivo está distante de los sitios de unión a antígenos. Estas características permiten que se unan moléculas efectoras a los anticuerpos reticulados sin destruir la capacidad de unión a antígenos de los anticuerpos. Además, los compuestos de la presente invención son más eficientes de preparar y versátiles de usar que los compuestos de la técnica anterior. Uniendo las moléculas efectoras a los anticuerpos reticulados preformados, en lugar de a la inversa (uniendo en primer lugar un ligador a una molécula efectora, y después uniendo los anticuerpos), se minimizan reacciones secundarias indeseadas, creando un producto más uniforme. Además, puesto que los anticuerpos reticulados se preparan en ausencia de la molécula efectora, se pueden seleccionar moléculas efectoras menos estables para la unión posterior. Una reserva de anticuerpo reticulado preformado permitirá también que se una un intervalo virtualmente ilimitado de moléculas efectoras sin la necesidad de sintetizar todo el compuesto *ab initio* cada vez que se necesite un compuesto diferente.

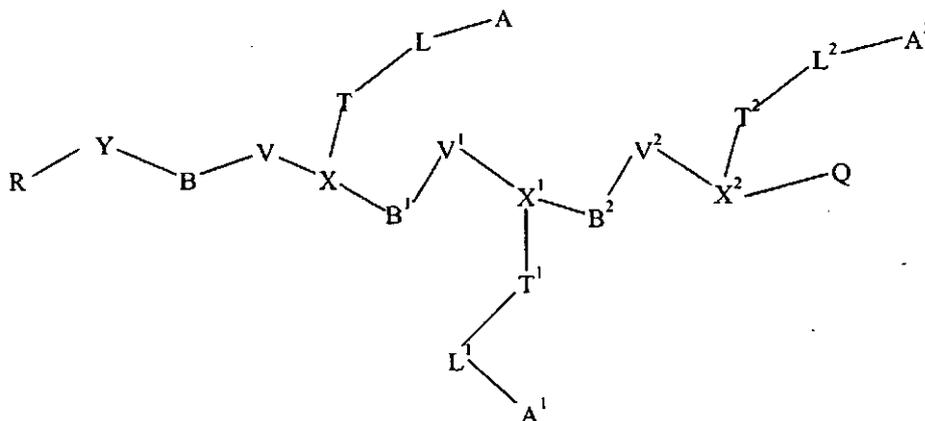
Preferiblemente, los compuestos de la presente invención comprenden uno o dos grupos reactivos, más preferiblemente un grupo reactivo.

La presente invención también proporciona por lo tanto compuestos que consisten esencialmente en los siguientes elementos: un grupo reactivo; y dos o más anticuerpos reticulados o sus fragmentos; caracterizados porque el grupo reactivo es adecuado para unirse a una molécula efectora pero no reacciona con ninguno de los anticuerpos o sus fragmentos.

Los ejemplos particulares de la presente invención se proporcionan en la fórmula (I) o (II):



(I)



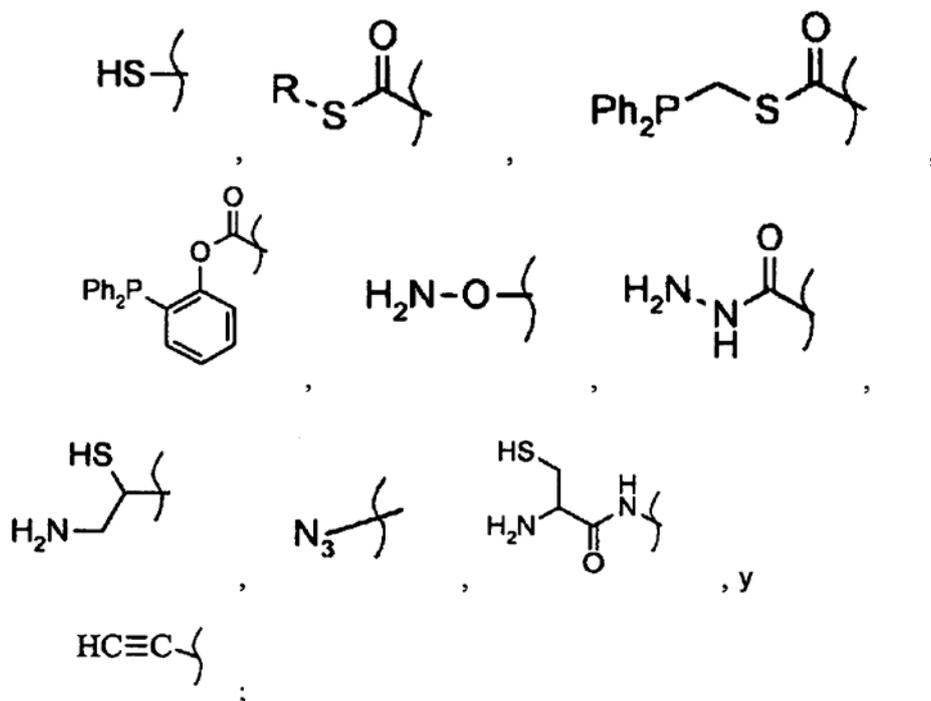
(II)

en las que:

5 A, A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> representan independientemente el resto de un anticuerpo o su fragmento seleccionado del grupo que comprende anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab'), o un fragmento de unión a epítipo de un anticuerpo o dichos fragmentos;

L, L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> son succinimida;

R representa un grupo reactivo que es adecuado para unirse a una molécula efectora pero que no reacciona con ninguno de A, A<sup>1</sup> ni A<sup>2</sup>, en el que R se selecciona de:



10 R<sup>10</sup> representa arilo o heteroarilo;

Y representa un enlace covalente o  $-(CH_2)_y-$ ;

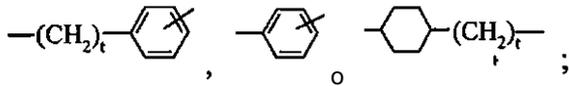
B, B<sup>1</sup> y B<sup>2</sup> representan independientemente  $-CONH-$ ,  $-NHCO-$  o  $-CO-$ ;

V, V<sup>1</sup> y V<sup>2</sup> representan independientemente un enlace covalente o  $-(CH_2)_v-$ ;

X, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan independientemente CR<sup>1</sup> o N;

5 W, W<sup>1</sup> y W<sup>2</sup> representan independientemente  $-(CH_2)_wO-$ ;

T, T<sup>1</sup> y T<sup>2</sup> representan independientemente un grupo ligador seleccionado de  $-(CH_2)_t-$ ,  $-(CH_2)_tNHCO(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)_tNHCO(CH_2)_xNHCO(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)_tNHCO(CH_2)_p(OCH_2CH_2)_zNHCO(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)_tNHCO(CH_2)_m-$ ,



t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10;

10 n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

x es 2, 3, 4, 5 ó 6;

z es 1 a 500;

p es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

m es 1, 2, 3, 4, 5, ó 6;

15 r es 2, 3, 4 ó 5;

Q representa  $CO_2R^a$  o  $CONR^aR^b$ ;

R<sup>a</sup> representa hidrógeno o alquilo de C<sub>1-4</sub>;

R<sup>b</sup> representa hidrógeno o alquilo de C<sub>1-4</sub>;

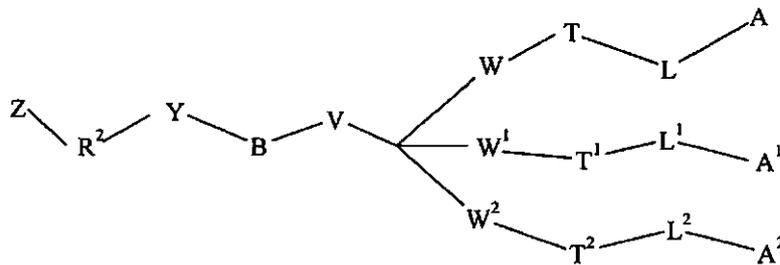
R<sup>1</sup> representa hidrógeno o alquilo de C<sub>1-4</sub>;

20 v es 1, 2, 3 ó 4;

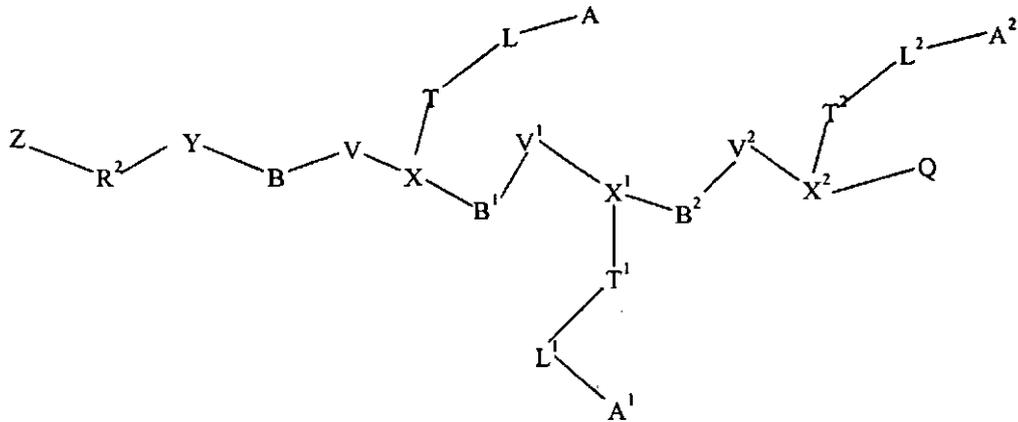
w es 1, 2, 3 ó 4; y

y es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

También se proporcionan mediante la presente invención anticuerpos reticulados a los que se une una molécula efectora. Los ejemplos particulares de este aspecto de la invención se proporcionan en las fórmulas (III) y (IV):



(III)



(IV)

en las que

Z es un resto de una molécula efectora;

R<sup>2</sup> es el grupo funcional que resulta de la unión de Z; y

5 cada una de las otras variables es como se define anteriormente en relación con la fórmula (I) o (II).

Como se usa aquí, la expresión "alquilo de C<sub>1-4</sub>" se refiere a grupos alquilo de cadena lineal y ramificados, que contienen 1 a 4 átomos de carbono. Tales grupos son metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo.

10 Como se usa aquí, el término "resto" se entenderá que significa aquella porción de una molécula efectora o un fragmento o su anticuerpo que permanece después de que haya sufrido una reacción de sustitución según tal terminología es familiar para la persona experta en la técnica.

15 Los restos A, A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> incluyen restos de anticuerpos completos y sus fragmentos funcionalmente activos o derivados, y pueden ser, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores.

Los anticuerpos incluyen moléculas inmunoglobulínicas y porciones inmunológicamente activas de moléculas inmunoglobulínicas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígenos que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas inmunoglobulínicas de la invención pueden ser cualquier clase (por ejemplo IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de moléculas inmunoglobulínicas.

20 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, *Nature*, 1975, 256, 495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor *et al.*, *Immunology Today*, 1983, **4**, 72), y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.*, "Monoclonal antibodies and Cancer Therapy", p. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

25 Los anticuerpos para uso en la invención también se pueden generar usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales clonando y expresando ADNcs de la región variable inmunoglobulínica generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**(15), 7843-7848, documentos WO 92/02551, WO 2004/051268 y WO 2004/106377.

30 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo procedentes de especies no humanas que tienen una o más regiones que determinan la complementariedad (CDRs) de la especie no humana, y una región de marco procedente de una molécula inmunoglobulínica humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089).

Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes inmunoglobulínicos que se han manipulado genéticamente de manera que los genes de cadena ligera y pesada están compuestos de segmentos de genes inmunoglobulínicos que pertenecen a diferentes especies. Estos anticuerpos quiméricos son probablemente

menos antigénicos.

Los anticuerpos para uso en la presente invención también se pueden generar usando diversos métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica, e incluyen aquellos descritos en Brinkman *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, **182**, 41-50; Ames *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1995, **184**, 177- 186; Kettleborough *et al.* *Eur. J. Immunol.*, 1994, **24**, 952-958; Persic *et al.*, *Gene*, 1997 187, 9-18; y Burton *et al.*, *Advances in Immunology*, 1994, **57**, 191-280; documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y WO 95/20401; y US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743; y 5.969.108. Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios, tales como las descritas en el documento US 4.946.778, también se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios. También, para expresar anticuerpos humanizados se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos.

En un ejemplo, los fragmentos de anticuerpo son fragmentos Fab' que poseen una región bisagra nativa o una región bisagra modificada. Ya se ha descrito un número de regiones bisagra modificadas, por ejemplo en los documentos US 5.677.425, WO 9915549, y WO 9825971, y estos se incorporan aquí como referencia.

Los fragmentos de anticuerpo particulares incluyen aquellos descritos en los documentos WO 2005003169, WO 2005003170 y WO 2005003171.

Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo para uso en la presente invención contienen un único tiol libre, preferiblemente en la región bisagra.

La expresión "anticuerpos reticulados", como se usa aquí, se refiere a dos, tres o cuatro anticuerpos, o sus fragmentos, enlazados mediante una estructura conectora. La estructura conectora puede ser cualquier estructura molecular capaz de enlazar juntos los anticuerpos o sus fragmentos, tales como los descritos aquí. Preferiblemente, la porción de anticuerpo reticulado de las moléculas según la presente invención comprende tres fragmentos de anticuerpo, preferiblemente fragmentos Fab'.

Cada uno de los anticuerpos o sus fragmentos en la porción de anticuerpo reticulado de las moléculas de la presente invención será capaz en general de unirse selectivamente a un antígeno. Cada anticuerpo se puede unir al mismo antígeno o a uno diferente. Por tanto, la porción de anticuerpo reticulado de las moléculas según la presente invención puede ser monoespecífica, biespecífica, trispecífica o tetraespecífica. Preferiblemente, la porción de anticuerpo reticulado de las moléculas según la presente invención es monoespecífica.

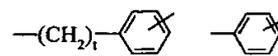
El antígeno puede ser cualquier antígeno asociado a células, por ejemplo un antígeno de superficie celular en células tales como células bacterianas, células de levadura, células T, células endoteliales o células tumorales, o puede ser un antígeno soluble. Los antígenos también pueden ser cualquier antígeno médicamente relevante, tales como aquellos antígenos aumentados durante la enfermedad o infección, por ejemplo receptores y/o sus ligandos correspondientes. Los ejemplos particulares de antígenos de la superficie celular incluyen moléculas de adhesión, por ejemplo integrinas tales como integrinas  $\beta 1$ , por ejemplo VLA-4, E-selectina, P selectina o L-selectina, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11a, CD11b, CD18, CD19, CD20, CD23, CD25, CD33, CD38, CD40, CD45, CDW52, CD69, CD70, CD134, antígeno carcinoembrionario (CEA), MUC-1, antígenos del MHC Clase I y MHC Clase II, y VEGF, y, cuando sea apropiado, sus receptores. Los antígenos solubles incluyen interleucinas tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16 o IL-17, antígenos víricos, por ejemplo antígenos del virus sincitial respiratorio o de citomegalovirus, inmunoglobulinas, tales como IgE, interferones tales como interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$  o interferón  $\gamma$ , el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral, factor  $\beta$  de necrosis tumoral, factores estimulantes de colonias, tales como G-CSF o GM-CSF, y factores de crecimiento derivados de plaquetas, tales como PDGF- $\alpha$ , y PDGF- $\beta$ , y, cuando sea apropiado, sus receptores.

De forma adecuada, A, A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> son idénticos.

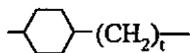
Los grupos espaciadores para uso en la presente invención comprenderán adecuadamente cualquier resto familiar para la persona experta en la técnica que sea capaz de formar un puente entre el ligador y el anticuerpo o su fragmento. En particular, los grupos espaciadores L, L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> comprenderán adecuadamente cualquier resto familiar para la persona experta en la técnica que sea capaz de formar un puente entre el ligador T, T<sup>1</sup> y T<sup>2</sup> y el resto A, A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup>, respectivamente. En un ejemplo, cuando A, A<sup>1</sup> o A<sup>2</sup> es el resto de un anticuerpo o un fragmento del mismo que contiene un resto de cisteína, el grupo espaciador correspondiente L, L<sup>1</sup> o L<sup>2</sup> será adecuadamente succinimida (es decir, el producto de reacción de un resto de maleimida con el resto polipeptídico que contiene cisteína A, A<sup>1</sup> o A<sup>2</sup> vía un enlazamiento tiólico y el ligador T, T<sup>1</sup> o T<sup>2</sup> a través del átomo de nitrógeno de la maleimida).

De forma adecuada, L, L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> son idénticos.

T, T<sup>1</sup> y T<sup>2</sup> incluyen  $-(CH_2)_t$ ,  $-(CH_2)_tNHCO(CH_2)_n$ ,  $-(CH_2)_tNHCO(CH_2)_xNHCO(CH_2)_n$ , -



y



en las que

t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10;

5 n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

x es 2, 3, 4, 5 ó 6;

z es 1 a 500;

p es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

m es 1, 2, 3, 4, 5, ó 6; y

10 r es 2, 3, 4 ó 5.

En una realización, T representa  $-(\text{CH}_2)_t-$ .

En otra realización, T representa  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ .

En otra realización, T representa  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_x\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ .

En otra realización, T representa  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_p(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ .

15 En otra realización, T representa  $-(\text{CH}_2)_r\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m-$ .

En una realización, T<sup>1</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_t-$ .

En otra realización, T<sup>1</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ .

En otra realización, T<sup>1</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_x\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ .

En otra realización, T<sup>1</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_p(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ .

20 En otra realización, T<sup>1</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_r\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m-$ .

En una realización, T<sup>2</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_t-$ .

En otra realización, T<sup>2</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ .

En otra realización, T<sup>2</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_x\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ .

En otra realización, T<sup>2</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_p(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ .

25 En otra realización, T<sup>2</sup> representa  $-(\text{CH}_2)_r\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m-$ .

Adecuadamente, T, T<sup>1</sup> y T<sup>2</sup> son idénticos.

En una realización, X representa CR<sup>1</sup>. En otra realización, X representa N.

En una realización, X<sup>1</sup> representa CR<sup>1</sup>. En otra realización, X<sup>1</sup> representa N.

En una realización, X<sup>2</sup> representa CR<sup>1</sup>. En otra realización, X<sup>2</sup> representa N.

30 Adecuadamente, X, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> son idénticos.

En una realización, B representa -CONH-. En otra realización, B representa -NHCO-. Cuando B representa -CONH-, X representa típicamente CH.

En una realización, B<sup>1</sup> representa -CONH-. En otra realización, B<sup>1</sup> representa -NHCO-. Cuando B<sup>1</sup> representa -CONH-, X<sup>1</sup> representa típicamente CH.

35 En una realización, B<sup>2</sup> representa -CONH-. En otra realización, B<sup>2</sup> representa -NHCO-. Cuando B<sup>2</sup> representa -

CONH-,  $X^2$  representa típicamente CH.

Adecuadamente, B,  $B^1$  y  $B^2$  son idénticos.

En una realización preferida, V representa un enlace covalente. En otra realización, V representa  $-(CH_2)_v-$ , en el que v es como se define anteriormente.

- 5 En una realización preferida,  $V^1$  representa un enlace covalente. En otra realización,  $V^1$  representa  $-(CH_2)_v-$ , en el que v es como se define anteriormente.

En una realización preferida,  $V^2$  representa un enlace covalente. En otra realización,  $V^2$  representa  $-(CH_2)_v-$ , en el que v es como se define anteriormente.

Adecuadamente, V,  $V^1$  y  $V^2$  son idénticos.

- 10 En una realización preferida,  $R^a$  es hidrógeno. En otra realización,  $R^a$  representa alquilo de  $C_{1-4}$ , especialmente metilo.

En una realización preferida,  $R^b$  es hidrógeno. En otra realización,  $R^b$  representa alquilo de  $C_{1-4}$ , especialmente metilo.

En una realización Q es  $CO_2H$ . En otra realización Q es  $CONH_2$ .

- 15 En una realización preferida,  $R^1$  es hidrógeno. En otra realización,  $R^1$  representa alquilo de  $C_{1-4}$ , especialmente metilo.

En una realización, y es 1.

En otra realización, y es 2.

En una realización, t es 2. En otra realización, t es 3. En una realización adicional, t es 4. Favorablemente, t es 3.

- 20 En una realización, r es 4.

En una realización, m es 5.

En una realización, n es 2.

- 25 Típicamente, z puede estar en el intervalo de 1 a 10; o en el intervalo de 10 a 25; o en el intervalo de 25 a 50; o en el intervalo de 50 a 100; o en el intervalo de 100 a 250; o en el intervalo de 250 a 500. Valores específicos de z incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 25, 50, 100, 250 y 500.

En una realización, z es 4.

En una realización, x es 5.

En una realización, p es 2.

- 30 El resto Z en los compuestos de fórmula (III) y (IV) anteriormente será adecuadamente un resto de una molécula efectora. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora, o dos o más de tales moléculas, así enlazadas para formar un único resto que se puede unir a los compuestos de la presente invención como un único resto, Z. Los ejemplos de tales restos incluyen moléculas efectoras enlazadas mediante estructuras conectoras ramificadas. Las moléculas efectoras para uso en la presente invención incluyen compuestos biológicamente activos adecuados para uso médico o de diagnóstico en el tratamiento de animales, incluyendo seres humanos.
- 35

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos, incluyendo cualquier agente que sea perjudicial (*por ejemplo* extermine) células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maitansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y sus análogos u homólogos.

- 40 Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (*por ejemplo* metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina), agentes alquilantes (*por ejemplo* mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, setreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiaminplatino (II) (DDP), cisplatino), antraciclina (*por*
- 45

*ejemplo* daunorrubicina (antiguamente daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (*por ejemplo* dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-amitóticos (*por ejemplo* vincristina y vinblastina).

5 Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados, tales como  $^{111}\text{In}$  e  $^{90}\text{Y}$ ,  $\text{Lu}^{177}$ , bismuto $^{213}$ , californio $^{252}$ , iridio $^{192}$  y volframio $^{188}$ /renio $^{188}$ ; o fármacos tales como, pero sin limitarse a, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

10 Otras moléculas efectoras pueden incluir proteínas y polímeros que se pueden usar para extender la semivida y/o disminuir la inmunogenicidad del compuesto de la presente invención. Los ejemplos de proteínas adecuadas incluyen albúmina y proteínas de unión a albúmina. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen cualquier polímero sustancialmente no antigénico, sustancialmente soluble en agua, sintético o de origen natural, incluyendo, por ejemplo, polímeros de polialquileno, polialquilenilo o polioxilquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, o polisacáridos ramificados o sin ramificar, por ejemplo un homo- o heteropolisacárido, tal como lactosa, amilosa, dextrano o glucógeno. Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) o sus derivados, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol).

15 Preferiblemente, el polímero para uso en la presente invención es un polióxido de alquileno tal como polietilenglicol (PEG). Con respecto a la unión de los restos de PEG en general, se hace referencia a "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed.), Plenum Press, Nueva York; "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds.), American Chemical Society, Washington DC; y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York.

20 El tamaño del polímero se puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo medio de pesos moleculares de 250 a 100.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 50.000 Da, más preferiblemente de 10.000 a 40.000 Da, y todavía más preferiblemente de 20.000 a 40.000 Da. El tamaño del polímero se puede seleccionar en particular basándose en el uso pretendido del producto, por ejemplo la capacidad para localizar ciertos tejidos tales como tumores, o extender la semivida circulante (para un repaso, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545).

30 Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral,  $\alpha$ -interferón,  $\beta$ -interferón, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, *por ejemplo* angiostatina o endostatina, o un modificador de la respuesta biológica tal como linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de nervios (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

35 Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables, útiles por ejemplo en el diagnóstico. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, radionúclidos, metales que emiten positrones (para uso en tomografía de emisión positrónica), e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos. Véase generalmente la patente U.S. nº 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar a anticuerpos para uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamin fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina, y acuorina; y los radionúclidos adecuados incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{99}\text{Tc}$ .

40 El grupo reactivo R para uso en la presente invención es cualquier grupo adecuado para unirse a una molécula efectora, pero que no reacciona con ninguno de los anticuerpos o sus fragmentos unidos al ligador. Típicamente, R es un grupo que reaccionará con un resto, Z, pero que no reaccionará con ninguno de los anticuerpos o fragmentos de los mismos unidos al ligador. Tales grupos son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir tioles, tioésteres, oxiaminas e hidrazidas.

45 En una realización, R es un grupo tiol  $-\text{SH}$ , en cuyo caso  $\text{R}^2$  será el resto tiólico divalente  $-\text{S}-$ . En otra realización, R es un resto tioéster, por ejemplo un grupo de fórmula  $-\text{C}(\text{O})\text{SR}^{10}$ , en la que  $\text{R}^{10}$  representa un grupo arilo o heteroarilo, por ejemplo fenilo o piridinilo. En otra realización, R es el grupo oxiamina  $-\text{ONH}_2$ . En otra realización, R es un grupo hidrazida  $-\text{CONHNH}_2$ .

5 Se apreciará por personas expertas en la técnica que R se seleccionará para reaccionar con un grupo reactivo  $Z^1$  particular presente en Z. Preferiblemente, el grupo reactivo  $Z^1$  se seleccionará de manera que no reaccione con los anticuerpos o sus fragmentos unidos al ligador. Además, el grupo reactivo  $Z^1$  y el grupo reactivo R se seleccionarán de manera que la reacción entre ellos pueda tener lugar en condiciones suaves que no afectarán a la actividad biológica de los anticuerpos o sus fragmentos o a la molécula efectora.

$R^2$  es el grupo funcional divalente que resulta de la unión de Z a R.

Los grupos adecuados son bien conocidos en la técnica, y en la Figura 1 se proporcionan algunos ejemplos de posibles grupos R y  $Z^1$  y de los grupos funcionales divalentes resultantes ( $R^2$ ).

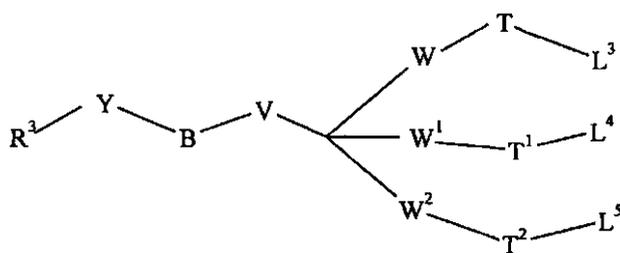
10 Otros ejemplos de grupos adecuados para uso como grupos reactivos  $Z^1$  y R incluyen grupos usados en reacciones de enlazamiento tales como química de clic (Kolb y Sharpless, 2003, DDT, 8, 1128-1137), ligaciones de Staudinger (Wang *et al.*, 2003, Bioconjugate Chemistry, 14, 697-701) y ligaciones de Staudinger sin trazas (Nilsson *et al.*, 2001, Organic Letters, 3, 9-12; Saxon *et al.*, 2000, 2, 2141-2143).

15 También se proporcionan mediante la presente invención compuestos que consisten esencialmente en los siguientes elementos: uno o más grupos reactivos como se definen aquí, o un derivado protegido de los mismos; y un ligador adecuado para reticular dos o más anticuerpos o sus fragmentos; caracterizados porque él o cada grupo reactivo es adecuado para unirse a una molécula efectora, y él o su derivado protegido no reacciona con los anticuerpos o sus fragmentos o el grupo espaciador en el ligador a los que se unirán.

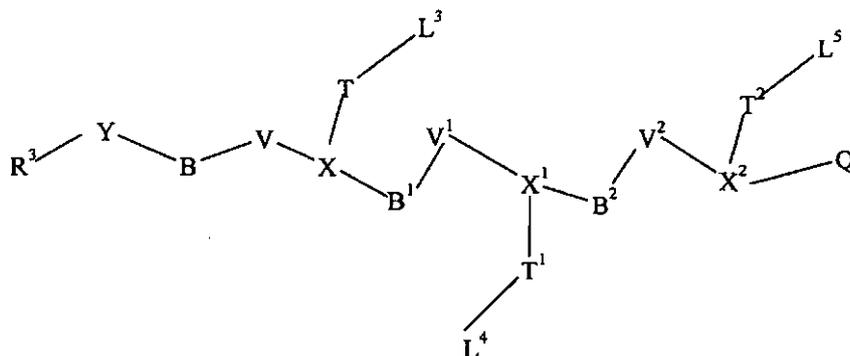
Preferiblemente, los compuestos según este aspecto de la presente invención comprenden uno o dos grupos reactivos, más preferiblemente un grupo reactivo.

20 Por lo tanto, la presente invención también proporciona compuestos que consisten esencialmente en los siguientes elementos: un grupo reactivo como se define aquí, o un derivado protegido del mismo; y un ligador adecuado para reticular dos o más anticuerpos o sus fragmentos; caracterizados porque el grupo reactivo es adecuado para unirse a una molécula efectora, y él o su derivado protegido no reacciona con los anticuerpos o sus fragmentos o el grupo espaciador en el ligador a los que se unirán.

25 Los intermedios para la unión de anticuerpos o sus fragmentos, de los cuales A,  $A^1$  y  $A^2$  son restos, incluyen compuestos de fórmula (V) y (VI):



(V)



(VI)

en las que

$L^3$ ,  $L^4$  y  $L^5$  representan grupos capaces de unirse al resto A,  $A^1$  y  $A^2$ , respectivamente, o capaces de ser convertidos en tales grupos;

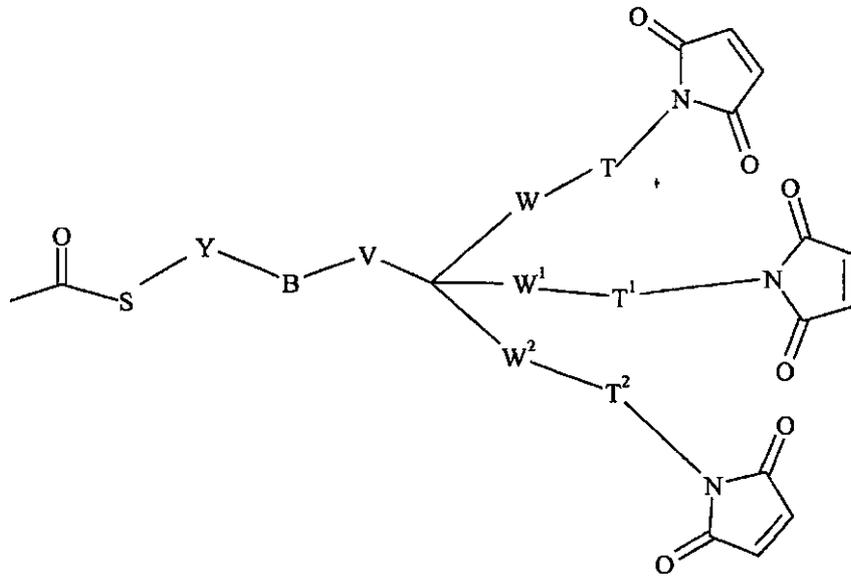
- 5  $R^3$  corresponde al grupo R como se define anteriormente, o representa un derivado protegido del mismo, que no reacciona con  $L^3$ ,  $L^4$  y  $L^5$ ; y

cada una de las otras variables es como se define anteriormente en relación con la fórmula (I) o (II).

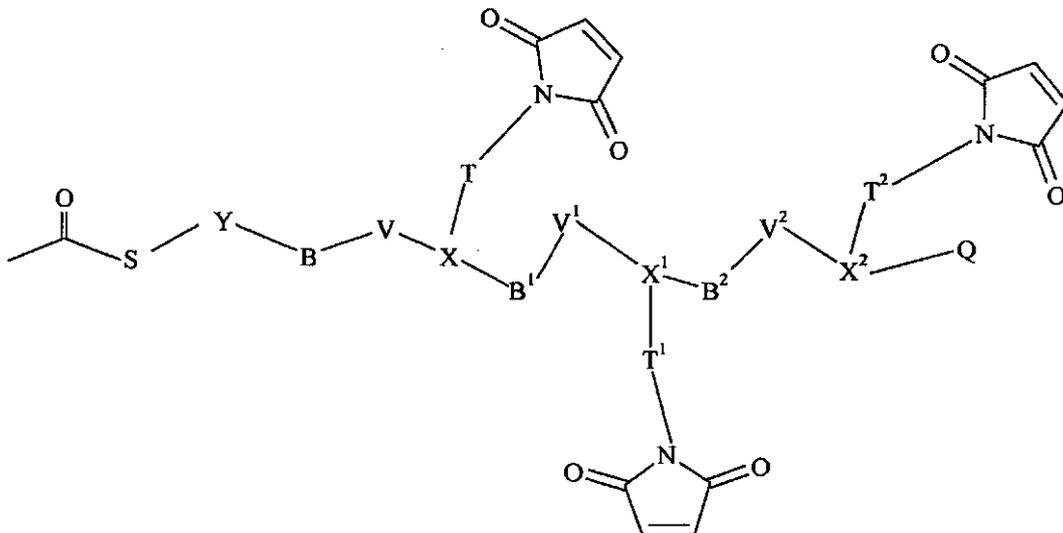
- 10 Cuando  $R^3$  es un derivado protegido de R, el grupo reactivo R está enmascarado por otro grupo, un "grupo protector", para evitar que R reaccione con los grupos espaciadores  $L^3$ ,  $L^4$  o  $L^5$ . Tales derivados protegidos son capaces de ser convertidos fácilmente en presencia de anticuerpos en el grupo reactivo R. Los ejemplos de tales grupos son tioles protegidos, en los que el grupo protector se puede eliminar fácilmente para proporcionar un tiol libre para la reacción con Z. Las condiciones para la eliminación son preferiblemente tales que la actividad biológica de los anticuerpos o sus fragmentos no se vea afectada. Los grupos protectores de tiol adecuados son conocidos en la técnica, e incluyen ésteres de tiol, disulfuros, grupos acetilo, y grupos propionilo.

- 15 Los grupos  $L^3$ ,  $L^4$  o  $L^5$  se pueden unir a los restos correspondientes A,  $A^1$  o  $A^2$  a través de cualquier grupo funcional de aminoácido terminal o cadena lateral de aminoácido disponible localizado en el anticuerpo o su fragmento, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden aparecer de forma natural en, por ejemplo, el fragmento de anticuerpo, o se puede manipular mediante ingeniería en el anticuerpo o su fragmento usando métodos de ADN recombinante (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.219.996 y US 20 5.677.425). En un aspecto preferido de la invención, los dos grupos están enlazados covalentemente a través de un grupo tiol de un resto de cisteína localizado en el anticuerpo o su fragmento, preferiblemente en la bisagra. El enlace covalente será generalmente un enlace de disulfuro o un enlace de azufre-carbono, preferiblemente este último. En un ejemplo en el que se usa un grupo tiol como el punto de unión, se pueden usar grupos apropiadamente activados, por ejemplo derivados selectivos de tiol, tales como derivados de maleimida y cisteína.

- 25 En un aspecto preferido, los grupos  $L^3$ ,  $L^4$  y  $L^5$  son idénticos, y representan derivados de maleimida unidos al resto de la molécula a través del átomo de nitrógeno de maleimida. En otro aspecto,  $R^3$  representa un grupo tiol protegido con acetilo. En consecuencia, un subconjunto ilustrativo de los compuestos de fórmula (V) y (VI) anteriores está representado por los compuestos de fórmula (VII) y (VIII):



(VII)



(VIII)

en las que cada una de las variables es como se define anteriormente.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden tomar una forma adecuada para la administración oral, bucal, parenteral, nasal, tópica, oftálmica o rectal, o una forma adecuada para la administración mediante inhalación o insuflamiento.

10 Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas para chupar o cápsulas, preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo almidón de patata o glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir

5 por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos o conservantes. Las preparaciones también pueden contener sales tamponantes, agentes saborizantes, agentes colorantes o agentes edulcorantes, según sea apropiado.

Las preparaciones para administración oral se pueden formular de forma adecuada para dar una liberación controlada del compuesto activo.

10 para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas, formulados de manera convencional.

15 Los compuestos de fórmula (III) y (IV) se pueden formular para la administración parenteral mediante inyección, por ejemplo inyección de bolo o infusión. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo en ampollas de vidrio o recipientes de múltiples dosis, por ejemplo viales de vidrio. Las composiciones para inyección pueden tomar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes, conservantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

20 Además de las formulaciones descritas anteriormente, los compuestos de fórmula (III) y (IV) también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de actuación prolongada se pueden administrar mediante implantación o mediante inyección intramuscular.

Para administración nasal o administración mediante inhalación, los compuestos según la presente invención se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol para envases a presión o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, fluorotriclorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otro gas o mezcla de gases adecuados.

25 Si se desea, las composiciones se pueden presentar en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para la administración.

30 Para la administración tópica, los compuestos según la presente invención se pueden formular convenientemente en un ungüento adecuado que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos particulares incluyen, por ejemplo, aceite mineral, vaselina líquida, propilenglicol, polioxietileno, polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, los compuestos según la presente invención se pueden formular en una loción adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos particulares incluyen, por ejemplo, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetarílico, alcohol bencílico, 2-octildodecanol y agua.

40 Para la administración oftálmica, los compuestos según la presente invención se pueden formular convenientemente como suspensiones micronizadas en disolución salina estéril isotónica, de pH ajustado, con o sin un conservante, tal como un agente bactericida o fungicida, por ejemplo nitrato fenilmercúrico, cloruro de benzalconio o acetato de clorhexidina. Como alternativa, para administración oftálmica, los compuestos se pueden formular en un ungüento tal como vaselina.

45 Para administración rectal, los compuestos según la presente invención se pueden formular convenientemente como supositorios. Estos se pueden preparar mezclando el componente activo con un excipiente no irritante adecuado, que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal, y de este modo se fundirá en el recto para liberar el componente activo. Tales materiales incluyen, por ejemplo, manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

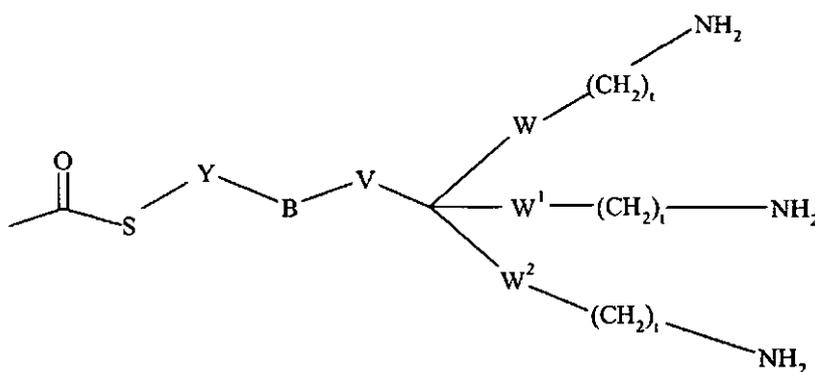
50 La cantidad de un compuesto de la invención requerida para la profilaxis o tratamiento de una afección particular variará dependiendo del compuesto elegido y la afección del paciente a tratar. En general, sin embargo, las dosis diarias pueden oscilar desde alrededor de 10 ng/kg hasta 1000 mg/kg, típicamente de 100 ng/kg a 100 mg/kg, por ejemplo alrededor de 0,01 mg/kg a 40 mg/kg de peso corporal para administración oral o bucal, de alrededor de 10 ng/kg a 50 mg/kg de peso corporal para administración parenteral, y de alrededor de 0,05 mg a alrededor de 1000 mg, por ejemplo de alrededor de 0,5 mg a alrededor de 1000 mg, para administración nasal o administración mediante inhalación o insufiamiento.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar usando métodos análogos a aquellos en los Ejemplos proporcionados aquí.

Típicamente, los compuestos de fórmula (III) y (IV) se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende la unión del resto Z a un compuesto de fórmula (I) o (II) respectivamente usando procedimientos que son bien conocidos para la persona experta en la técnica.

5 Los compuestos de fórmula (I) y (II), en las que R es un grupo tiol -SH, se pueden preparar a partir de los compuestos correspondientes de fórmula (VII) o (VIII), respectivamente, en la que R<sup>3</sup> es un grupo tiol protegido con acetilo -SCOCH<sub>3</sub>, mediante metodología de desprotección convencional, por ejemplo mediante incubación en tampón que contiene EDTA con hidrocloreuro de hidroxilamina.

Los compuestos de fórmula (VII), en la que T, T<sup>1</sup> y T<sup>2</sup> son cada uno -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-, se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (IX):



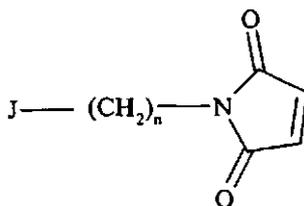
(IX)

10

en la que cada una de las variables es como se define anteriormente, con *N*-metoxicarbonilmaleimida.

La reacción se efectúa convenientemente en condiciones básicas, por ejemplo en presencia de carbonato de sodio acuoso.

15 Los compuestos de fórmula (VII), en la que T, T<sup>1</sup> y T<sup>2</sup> son cada uno -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (IX) como se define anteriormente con un compuesto de fórmula (X):



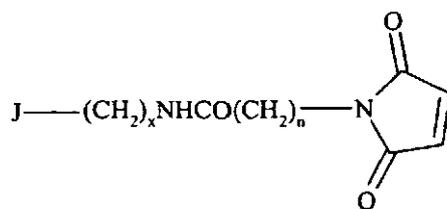
(X)

en la que n es como se define anteriormente, y J representa un resto carboxilato activado.

20 Los ejemplos de restos de carboxilato activado para el sustituyente J incluyen cloruros de ácido; anhídridos de ácido; y el éster formado cuando se hace reaccionar un ácido carboxílico (J = -CO<sub>2</sub>H) con *N*-hidroxisuccinimida o un análogo de sulfosuccinimida de la misma.

La reacción entre compuestos (IX) y (X) se efectúa convenientemente en un disolvente adecuado, por ejemplo *N,N*-dimetilformamida, típicamente en presencia de una base orgánica, por ejemplo trietilamina.

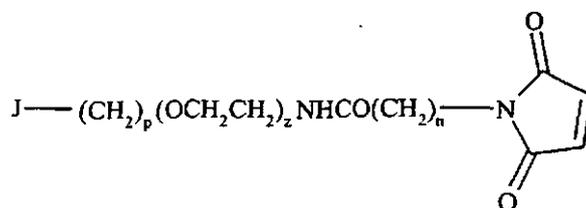
25 Los compuestos de fórmula (VII), en la que T, T<sup>1</sup> y T<sup>2</sup> son cada uno -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (IX) como se define anteriormente con un compuesto de fórmula (XI):



(XI)

en la que x, n y J son como se definen anteriormente, en condiciones análogas a las descritas anteriormente para la reacción entre compuestos (IX) y (X).

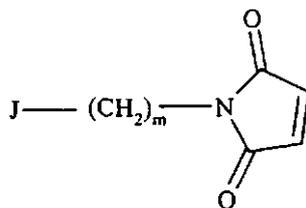
- 5 Los compuestos de fórmula (VII), en la que T, T<sup>1</sup> y T<sup>2</sup> son cada uno -(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (IX) como se define anteriormente con un compuesto de fórmula (XII):



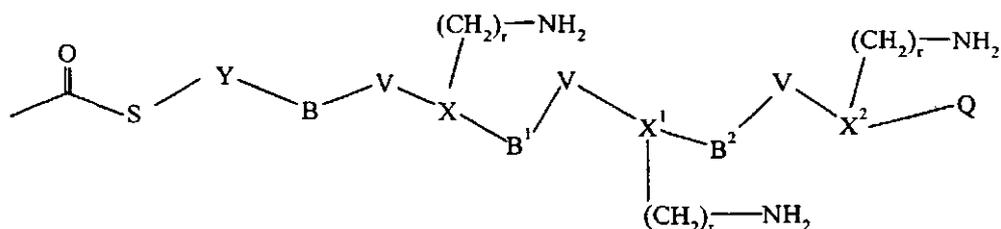
(XII)

en la que p, z, n y J son como se definen anteriormente, en condiciones análogas a las descritas anteriormente para la reacción entre los compuestos (IX) y (X).

- 10 Los compuestos de fórmula (VIII), en la que T, T<sup>1</sup> y T<sup>2</sup> son cada uno -(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (XIII) con un compuesto de fórmula (XIV):



(XIII)



(XIV)

en las que cada una de las variables es como se define anteriormente.

La reacción se efectúa convenientemente en condiciones básicas, por ejemplo diisopropiletilamina en dimetilsulfóxido.

- 5 Aunque no están comercialmente disponibles, los compuestos de fórmula (IX), (X), (XI), (XII), (XIII) y (XIV) se pueden preparar por métodos análogos a los descritos en los Ejemplos que se acompañan, o mediante métodos estándar bien conocidos en la técnica.

- 10 Cuando se obtiene una mezcla de productos a partir de cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente para la preparación de compuestos según la invención, el producto deseado se puede separar de ella en una etapa apropiada por métodos convencionales tales como cromatografía de permeación en gel; intercambio catiónico o aniónico; HPLC preparativa; o cromatografía en columna, utilizando, por ejemplo, sílice y/o alúmina juntamente con un sistema disolvente apropiado.

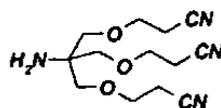
- 15 Durante cualquiera de las secuencias sintéticas anteriores puede ser necesario y/o deseable proteger grupos sensibles o reactivos en cualquiera de las moléculas implicadas. Esto se puede lograr por medio de grupos protectores convencionales, tales como los descritos en *Protective Groups in Organic Chemistry*, ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; y T.W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, 3ª edición, 1999. Los grupos protectores se pueden eliminar en cualquier etapa subsiguiente conveniente utilizando métodos conocidos de la técnica.

Los siguientes Ejemplos no limitantes ilustran la invención.

20

#### Intermedio 1

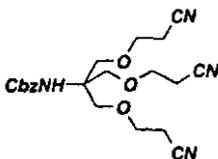
3-[2-Amino-3-(2-cianoetoxi)-2-(2-cianoetoximetil)-propoxi]-propionitrilo



- 25 Se añadió tris(hidroximetil)aminometano (24,2 g, 0,2 moles) a una mezcla de dioxano (25 ml) e hidróxido de potasio acuoso (1,2 g de KOH en 3 ml agua). Se añadió acrilonitrilo (40 ml, 0,61 moles) gota a gota. Después de 2 h, la disolución se dejó reposar en un baño de agua fría, para moderar cualquier reacción exotérmica, y se agitó durante 16 h a RT. La disolución se neutralizó con HCl dil. y se filtró. El aceite se disolvió en DCE, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró. El aceite marrón se purificó mediante cromatografía (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH al 1% hasta 4%) para dar el producto del título (26,9 g, 0,096 moles, 48%) como un aceite incoloro. δ<sub>H</sub> (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3,71 (6H, t, J 6,0), 3,47 (6H, s), 2,63 (6H, t, J 6,0); TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH al 10%) 0,55.
- 30

#### Intermedio 2

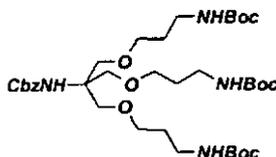
{2-(2-Cianoetoxi)-1,1-bis[(2-cianoetoxi)metil]etil}carbamato de bencilo



5 Se añadieron cloroforniato de bencilo (5 ml, 35,0 mmoles) y NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado (150 ml) a una disolución de producto del intermedio 1 (10 g, 35,7 mmoles) en diclorometano (150 ml) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 16 h a RT. Las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con HCl acuoso diluido y agua, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró. El material bruto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/hexano 1:4 después 1:2) para dar el producto del título (1,88 g, 7,66 mmoles, 57%) como un sólido blanco.  $\delta_H$  (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2,67 (6H, t, J 6,0), 3,77 (6H, t, J 6,0), 3,89 (6H, s), 5,16 (2H, s), 5,22 (1H, br.s), 7,43 (5H, m); LCMS (ESI+) 415 (M+H)<sup>+</sup>, tiempo de ret. 3,17 min.

#### Intermedio 3

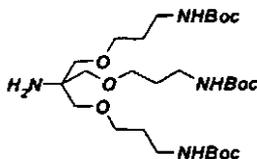
10 [2-{3-[(*tert*-Butoxicarbonil(amino)propoxi-1,1-bis({3-[(*tert*-butoxicarbonil)amino]propoxi)metil)etil]carbamato de bencilo



15 Se añadió lentamente a 0°C BH<sub>3</sub>.THF (1,0M en THF, 40 ml, 39,78 mmoles) a una disolución de producto del intermedio 2 (5 g, 12,05 mmoles) en THF anhidro (40 ml) en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 30 min. a 0°C, y 5 h a RT. Se añadieron nuevamente BH<sub>3</sub>.THF (1,0M en THF, 8 ml, 8 mmoles) y THF (10 ml), y la disolución se agitó durante 16 h a RT. La mezcla se vertió sobre una mezcla de hielo y HCl diluido (2M) hasta que paró la efervescencia, y se concentró hasta sequedad. Se añadieron a su vez diclorometano (80 ml), NEt<sub>3</sub> (17 ml, 120,5 mmoles) y Boc<sub>2</sub>O (13,15 g, 60,25 mmoles). La mezcla resultante se agitó durante 16 h a RT, se lavó con agua y salmuera, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró. El material bruto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/hexano 1:3, después 1:2) para dar el producto del título (1,71 g, 2,35 mmoles, 20%) como un aceite pegajoso incoloro.  $\delta_H$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1,35 (27H, s), 1,64 (6H, quintet., J 6,1), 3,10 (6H, t, J 6,1), 3,41 (6H, t, J 6,1), 3,58 (6H, s), 4,81 (3H, br. m), 4,98 (2H, s), 5,24 (1H, br. m), 7,24 (5H, m); TLC (EtOAc/hexano 1:1) r.f. 0,37.

#### Intermedio 4

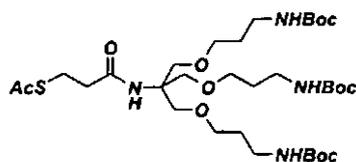
25 [6-Amino-6-({3-[(*tert*-butoxicarbonil)aminolpropoxi)metil]-15,15-dimetil-13-oxo-4,8,14-trioxa-12-azahexadec-1-il)-carbamato de *tert*-butilo



30 El producto del intermedio 3 (1,77 g, 2,43 mmoles) se disolvió en etanol (20 ml), y el matraz se sometió a tres ciclos de vacío/nitrógeno. Se añadió paladio sobre carbón (10%/C, 259 mg, 0,24 mmoles). El matraz se sometió a tres ciclos de vacío/hidrógeno. La mezcla de reacción se agitó bajo una ligera presión de hidrógeno durante 16 h a RT, y se filtró a través de una almohadilla de celite. El filtrado se concentró. El aceite bruto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc) para dar el producto del título (1,08 g, 1,82 mmoles, 75%) como un aceite amarillo pegajoso.  $\delta_H$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1,36 (27H, s), 1,68 (6H, t, J 5,8), 3,15 (6H, br. S), 3,41-3,39 (12H, m), 4,96 (3H, br. s); TLC (EtOAc/MeOH 20%) r.f. 0,29; LCMS (ESI+) 593 M<sup>+</sup>, tiempo de ret. 2,73 min.

#### Intermedio 5

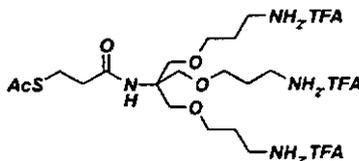
35 S-[5,5-bis({3-*tert*-Butoxicarbonil)amino]propoxi)metil]-14,14-dimetil-3,12-dioxo-7,13-dioxa-4,11-diazapentadec-1-il]jetanotioato



5 El producto del intermedio 4 (469 mg, 1,91 mmoles) y  $\text{NEt}_3$  (0,4 ml, 2,92 mmoles) se añadieron a una disolución de éster NHS del ácido 3-(acetiltio)propiónico (1,08 g, 1,82 mmoles) en diclorometano (5 ml). La mezcla resultante se agitó durante 24 h a RT. Se añadieron nuevamente producto XX (469 mg, 1,91 mmoles) y  $\text{NEt}_3$  (0,8 ml, 5,84 mmoles), y la mezcla se agitó durante 24 h a RT. La disolución se lavó con agua y salmuera, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se filtró y se concentró. El sólido bruto se purificó mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/hexano 1:4 hasta 1:1) para dar el producto del título (910 mg, 1,26 mmoles, 69%) como una espuma incolora.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1,23 (27H, s), 1,52 (6H, t, J 5,9), 2,10 (3H, s), 2,34 (2H, t, J 6,9), 2,91 (2H, t, J 7Hz), 3,00 (6H, t, J 6,0), 3,28 (6H, t, J 5,6), 3,49 (6H, s), 4,67 (3H, br. s); TLC (EtOAc/hexano 1:1) r.f. 0,21; LCMS (ESI+) 723  $\text{M}^+$ , 623 (M-Boc+H) $^+$ , tiempo de ret. 4,15 min.

#### Intermedio 6

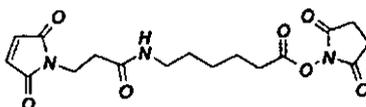
S-[3-((2-(3-Aminopropoxi)-1,1-bis[(3-aminopropoxi)metil]etil)amino)-3-oxopropil]etanotioato (sal del TFA)



15 Se añadió lentamente ácido trifluoroacético (8 ml) a una disolución del producto del intermedio 5 (900 mg, 1,24 mmoles) en diclorometano (8 ml). La mezcla resultante se agitó durante 6 h a RT y se concentró. El material oleoso bruto se usó en la siguiente reacción.  $\delta_{\text{H}}$  (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 1,91-1,96 (6H, m), 2,33 (3H, s), 2,52 (2H, t, J 6,29), 3,04-3,11 (8H, m), 3,33 (3H, br. s), 3,59 (6H, m), 3,72 (6H, br. s), 4,00 (1H, br. s).

#### Intermedio 7

3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-{6-[(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi]-6-oxohexil}propanamida



20 Se disolvieron éster NHS del ácido N-maleimidopropiónico (500 mg, 1,88 mmoles) y ácido 6-aminohexanoico (235 mg, 1,79 mmoles) en DCM (200 ml), y se agitó durante 16 h a RT. El disolvente se evaporó, y se añadió DMF (30 ml) y se evaporó. Se añadieron DCM (25 ml) y EDCI (613 mg, 3,2 mmoles), y la mezcla se agitó a RT durante 4 h. Se añadió agua (20 ml), y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con DCM (3 x 15 ml). La capa orgánica se lavó con agua (2 x 40 ml) y salmuera (2 x 40 ml), se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se concentró. El sólido bruto se purificó mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc) para dar el producto del título (400 mg, 1,05 mmoles, 59%) como un sólido blanco.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1,34-1,49 (4H, m), 1,70 (2H, quintet., J 7), 2,44 (2H, t, J 7), 2,55 (2H, t, J 7), 2,79 (4H, br. s), 3,18 (2H, q, J 6,2), 3,76 (2H, t, J 7,1), 5,87 (1H, br. s), 6,62 (2H, s); LCMS (ESI+) 380 (M+H) $^+$ , tiempo de ret. 2,56 min.

#### Intermedio 8

N- $\alpha$ -[S-Acetilpropionil] lisina lisina lisina (ATP-KKK-OH)

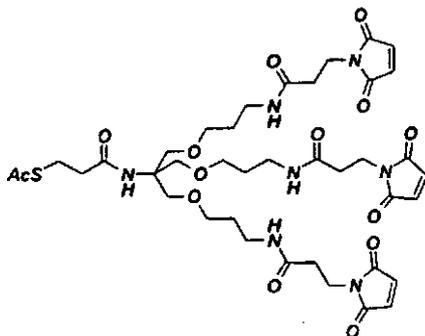
35 Se preparó  $\text{H}_2\text{N}$ -[Lys(Boc)] $_3$ -Resina Wang (300 mg) a partir de Fmoc-Lys(Boc) Resina Wang (0,53 mMol/g de sustitución) usando química estándar de Fmoc con 20% piperidina DMF para las etapas de desprotección de Fmoc, y un exceso de tres veces del Fmoc-aminoácido (Fmoc-Lys[Boc]OH) (0,52 mMol, 227 mg), TBTU (0,52 mMol, 163 mg), HOBT, (0,52 mMol, 70,2 mg) y DIPEA (0,7 mMol, 90,3 mg) en DMF (15 ml) para cada una de las etapas de acoplamiento. Se añadió S-acetilpropionato de N-succinimidilo (0,2 mMol, 50 mg) en DMF (2,5 ml), y la reacción se agitó durante 2 horas (negativa a ninhidrina). La resina se filtró, se lavó con DMF, DCM y se secó con éter dietílico. El péptido se separó de la resina agitando con TFA al 95%/agua durante 2 horas, la resina se eliminó mediante filtración, y el disolvente se eliminó mediante evaporación. El residuo se aisló mediante trituración con éter

dietílico, y se purificó mediante RP-hplc preparativa (columna C-18 Vydac 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 280 mm x 25 mm; gradiente de elución durante 40 min., 0-40% de acetonitrilo/agua/TFA al 0,1%; 20 ml/min.) para dar el compuesto del título, 70 mg, 75%, tras liofilización. ESMS 533 [M+1]; tiempo de retención de RP-hplc 10,99 min. (columna C-18 Hichrome, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, 250 mm x 6 mm, 10-90% de acetonitrilo/agua/TFA al 0,1% durante 20 min.; 1 ml/min).

5

### Ejemplo 1

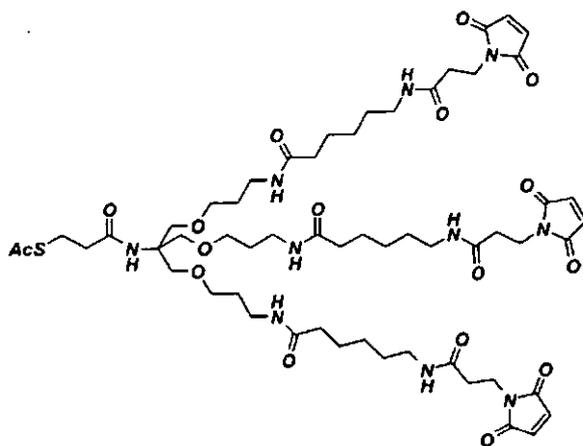
S-[3-((2-(3-((3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil)amino)propoxi)-1,1-bis[(3-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil)amino)propoxi)metil]etil)amino)-3-oxopropil]etanotioato



- 10 Se añadieron éster NHS del ácido N-maleimidopropiónico (230 mg, 0,87 mmoles) y  $\text{NEt}_3$  (0,17 ml, 1,24 mmoles) a una disolución del producto del intermedio 6 (100 mg, 0,25 mmoles) en dimetilformamida (3 ml). La mezcla resultante se agitó durante 1,25 h a RT. Se añadieron agua (3 ml) y diclorometano (3 ml), y las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 3 ml). La capa orgánica se lavó con agua (3 x 10 ml), se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se concentró. El aceite bruto se purificó mediante cromatografía en columna ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/hexano 1:1, después EtOAc, después EtOAc/MeOH al 20%) para dar el producto del título (95 mg, 0,11 mmoles, 44%) como un sólido amarillo claro.  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 1,73 (6H, quintet., J 6,24), 2,32 (3H, s), 2,48 (6H, t, J 7,0), 2,54 (2H, t, J 7,0), 3,09 (2H, t, J 7,0), 3,23 (6H, t, J 5,8), 3,46 (6H, t, J 5,9), 3,69 (6H, s), 3,79 (6H, t, J 6,9), 6,84 (6H, s), 7,34 (1H, br. s), 7,95 (3H, br. s); TLC (EtOAc/MeOH 20%) r.f. 0,23; LCMS (ESI+) 876  $\text{M}^+$ , 877 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , 878 ( $\text{M}+2\text{H}$ ) $^+$ , tiempo de ret. 2,63 min.

### 20 Ejemplo 2

S-[21-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,5-bis((3-((6-((3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propanoil)amino)hexanoil)amino)propoxi)metil)-3,12,19-trioxo-7-oxa-4,11,18-triazahenicos-1-il]etanotioato



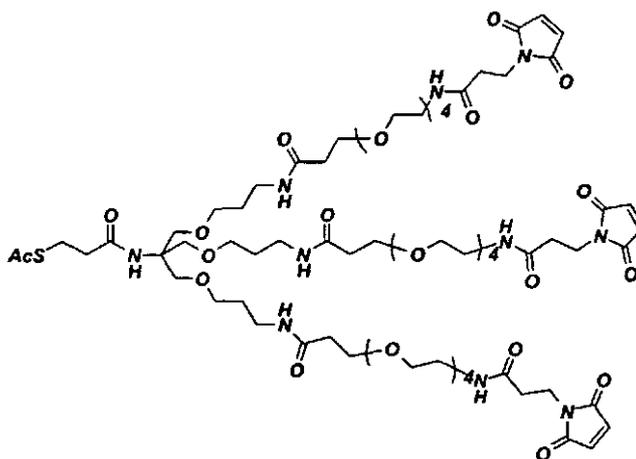
- 25 Se añadió el compuesto del intermedio 7 (78,5 mg, 0,207 mmoles) y  $\text{NEt}_3$  (0,07 ml, 0,483 mmoles) a una disolución del compuesto del intermedio 6 (53 mg, 0,069 mmoles) en DMF (3 ml). La mezcla se agitó durante 2,5 h a RT y se evaporó. Se añadieron agua (3 ml) y DCM (3 ml). La capa acuosa se extrajo con DCM (3 x 3 ml). La capa orgánica se lavó con agua (3 x 10 ml), se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se concentró. El residuo se pasó a través de un tapón de gel de sílice (EtOAc, después EtOAc/MeOH 1:1) para dar un primer lote de producto del título. La capa acuosa se volvió a extraer con DCM (3 x 7 ml). Esta capa orgánica se secó ( $\text{MgSO}_4$ ), se concentró, se diluyó con DCM (2 ml) y metanol (1 ml), se trató con resina PS-TsCl (HL) (2,40 mmoles/g, 300 mg) durante 3 h, se filtró y se evaporó para dar un

30

segundo lote de producto del título. Los dos lotes se combinaron para dar el producto del título (11 mg, 0,01 mmoles, 13%) como un sólido blanco.  $\delta_H$  (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) 1,19-1,25 (6H, m), 1,38 (6H, quintet., J 7,2), 1,55 (6H, quintet., J 7,6), 1,64 (6H, quintet., J 6,4), 2,08 (6H, t, J 7,4), 2,20 (3H, s), 2,35 (6H, t, J 6,9), 3,01 (6H, t, J 6,9), 3,15 (6H, t, J 6,9), 3,37 (6H, t, 5,9), 3,58 (6H, s), 3,66 (6H, t, J 6,9), 6,71 (6H, s); LCMS (ESI+) 1215 M<sup>+</sup>, tiempo de ret. 2,63 min.

### 5 Ejemplo 3

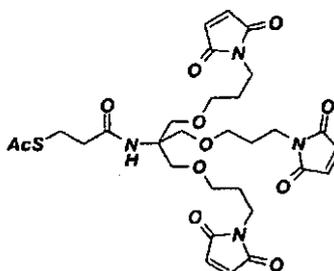
S-[30-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,5-bis[25-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-7,23-dioxo-2,10,13,16,19-pentaoxa-6-22-diazapentacos-1-il]-3,12,28-trioxo-7,15,18,21,24-pentaoxa-4,11,27-triazatriacont-1-il]etanolioato



- Se añadieron éster Mal-d-PEG<sub>4</sub>-NHS (Quanta Biodesign, USA) (100 mg, 0,194 mmoles) y NEt<sub>3</sub> (0,07 ml, 0,483 mmoles) a una disolución del compuesto del intermedio 6 (52 mg, 0,065 mmoles) en DMF (3 ml). La mezcla se agitó durante 2 h a RT y se evaporó. Se añadieron HCl ac. (0,1M, 8 ml) y DCM (7 ml). La capa orgánica se lavó con HCl ac. (0,1M, 3 x 8 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo se disolvió en DCM (5 ml) y se lavó con HCl ac. (0,1M, 3 x 5 ml). Las capas acuosas de los dos primeros lavados se combinaron y se extrajeron con DCM (2 x 5 ml). Los extractos orgánicos se combinaron, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron para dar el producto del título (10 mg, 0,006 mmoles, 9%) como un aceite incoloro.  $\delta_H$  (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 2,24 (3H, s), 2,38 (6H, t, J 6,1), 2,45 (6H, t, J 7,3), 2,51-2,56 (2H, m), 3,01 (6H, t, J 7,1), 3,23 (6H, q, J 6,4), 3,34 (6H, t, J 5,3), 3,39 (6H, m), 3,47 (6H, t, J 9,3), 3,54-3,58 (42H, m), 3,60 (6H, s), 3,67 (6H, t, J 2,88), 3,77 (6H, t, J 6,8), 6,53 (1H, s), 6,63 (6H, s), 6,70-6,73 (6H, br. s); LCMS (ESI+) 809 M<sup>2+</sup>, 540 M<sup>3+</sup>, tiempo de ret. 2,43 min.

### Ejemplo 4

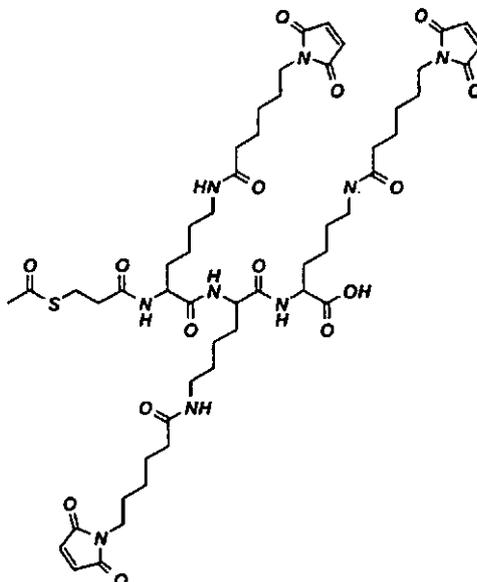
- S-{3-[(2-[3-(2,5-Dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)propoxi]-1,1-bis[3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-propoxi]-metil)-etil]amino]-3-oxopropil}etanolioato



- El compuesto del intermedio 6 (84 mg, 0,11 mmoles) se disolvió en hidrogenocarbonato de sodio ac. (1M, 2 ml). Se añadió a 0°C N-metoxicarbonil maleimida (102 mg, 0,66 mmoles). La mezcla se agitó durante 5 min., se diluyó con agua (1 ml) y acetonitrilo (3 ml), y se agitó a RT durante un tiempo no mayor que 30 min. Se añadió DCM (10 ml). La capa acuosa se extrajo con DCM (3 x 6 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl ac. (0,1M, 3 x 15 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se concentraron. El aceite bruto se purificó mediante cromatografía en columna (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/hexano 1:1) para dar el producto del título (10 mg, 0,01 mmoles, 14%) como un aceite incoloro.  $\delta_H$  (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1,77 (6H, quintet., J 6,4), 2,23 (3H, s), 2,50 (2H, t, J 6,9), 3,05 (2H, t, J 6,9), 3,33 (6H, t, J 5,9), 3,56 (6H, t, J 6,8), 3,62 (6H, s), 6,33 (1H, s), 6,63 (6H, s); LCMS (ESI+) 663 M<sup>+</sup>, tiempo de ret. 3,26 min.

Ejemplo 5

N- $\alpha$ -[S-Acetilpropionil]-trisN-[ $\epsilon$ -maleimidocaproiloxi]lisina lisina lisina (ATP-(K-[EMC])<sub>3</sub>-OH)



5 El compuesto del intermedio 8, (70 mg, 0,13 mMoles), éster N-[ $\epsilon$ -maleimidocaproiloxi]succinimídico (25 mg, 0,08 mMoles) y DIPEA (15 mg, 0,12 mMoles) se disolvió en DMSO (2 ml) y se agitó durante 2 horas. A esto se añadió más éster N-[ $\epsilon$ -maleimidocaproiloxi]succinimídico (25 mg, 0,08 mMoles) y DIPEA (15 mg, 0,12 mMoles), y la reacción se agitó durante 1 hora adicional. La disolución se diluyó con agua (10 ml), y la mezcla se purificó mediante RP-hplc hplc (columna C-18 Vydac 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, 280 mm x 25 mm; gradiente de elución durante 40 min., 20-60% de acetonitrilo/agua/TFA al 0,1%; 20 ml/min.) para dar el compuesto del título, 50 mg, 35%, tras liofilización.

ESMS 1112 [M+]; tiempo de retención de RP-hplc 18,7 min. (columna C-18 Hichrome, 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, 250 mm x 6 mm, 5-85% de acetonitrilo/agua/TFA al 0,1% durante 20 min.; 1 ml/min).

Ejemplo 6: Conjugación de anticuerpos to los compuestos de los Ejemplos 1-4.

15 Un Fab' manipulado mediante ingeniería, que contiene un único tiol bisagra (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.677.425; WO 9825971) a 10 mg/ml en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0 (que contiene EDTA 2 mM), se redujo selectivamente con 2-mercaptoetilamina hasta una concentración final de 5 mM a 37°C durante 30 minutos. El reductor en exceso se eliminó mediante filtración en gel, y el éxito de la reducción se midió valorando el tiol generado con 4,4'-ditiodipiridina. El ligador (10 mM en DMF) se añadió al Fab' reducido (4,9 mg/ml en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0 que contiene EDTA 2 mM) en dos alícuotas separadas durante 20 minutos para dar como resultado una relación molar final de 3,3:1 (Fab':ligador). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 18 horas. El grado de extensión de la reacción se monitorizó mediante filtración en gel de HPLC (GF250:tampón de fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,0, que contiene 10% de etanol), y la reticulación se confirmó mediante SDS PAGE (tanto en condiciones no reductoras como reductoras).

La reacción dio como resultado 33% de tri-Fab'; 13% de di-Fab' y 54% de Fab'.

25 El tri-Fab' resultante se purificó vía intercambio catiónico (SP-Sepharose HP) utilizando un gradiente de cloruro de sodio en acetato de sodio 50 mM, pH 4,50, y se caracterizó mediante HPLC (filtración en gel: GF250; eluido con fosfato de sodio 0,2 M, que contiene 10% de etanol) y SDS PAGE.

Ejemplo 7: Conjugación de anticuerpos al compuesto del Ejemplo 5

30 Un Fab' manipulado mediante ingeniería, que contiene un único tiol bisagra, a 10 mg/ml en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0 (que contiene EDTA 2 mM), se redujo selectivamente con 2-mercaptoetilamina hasta una concentración final de 5 mM a 37°C durante 30 minutos. El reductor en exceso se eliminó mediante filtración en gel, y el éxito de la reducción se midió valorando el tiol generado con 4,4'-ditiodipiridina.

El ligador (2 mM en DMF) se añadió al Fab' reducido (5,50 mg/ml en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0 que

5 contiene EDTA 2 mM) en dos alícuotas separadas durante 20 minutos para dar como resultado una relación molar final de 3,3:1 (Fab':ligador). La mezcla de reacción se mantuvo a 37°C durante 18 horas. El grado de extensión de la reacción se monitorizó mediante filtración en gel de HPLC (GF250:tampón de fosfato de sodio 0,2 M, pH 7,0, que contiene 10% de etanol), y la reticulación se confirmó mediante SDS PAGE (tanto en condiciones no reductoras como reductoras). La reacción dio como resultado 53% de tri-Fab'; 13% de di-Fab' y 34% de Fab', según se comprueba mediante filtración en gel de HPLC.

10 La molécula de tri-Fab' resultante se purificó mediante intercambio catiónico: SP-Sepharose HP. El di-Fab' y el Fab' se eluyeron en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 4,50 que contiene cloruro de sodio 125 mM, y el tri-Fab' se eluyó en acetato de sodio 50 mM, pH 4,50 usando un gradiente de cloruro de sodio de 125 mM a 250 mM a lo largo de 20 volúmenes de columna.

#### Ejemplo 8: Unión de PEG al tri-Fab de los Ejemplos 6 y 7

15 El tri-Fab' purificado, preparado como antes, se intercambió mediante tampón en tampón de fosfato de sodio 0,1M, pH 7,50, que contiene EDTA 2 mM, y después se incubó con hidrocloreto de hidroxilamina (concentración final de 50 mM) durante 2 horas a temperatura ambiente. El éxito de la reacción de desprotección para liberar un grupo tiol se midió valorando con 4,4'-ditiodipiridina: la mezcla de desprotección dio como resultado 0,26 tioles por tri-Fab', mientras que la mezcla de post-desprotección dio 1,10 tioles por tri-Fab'.

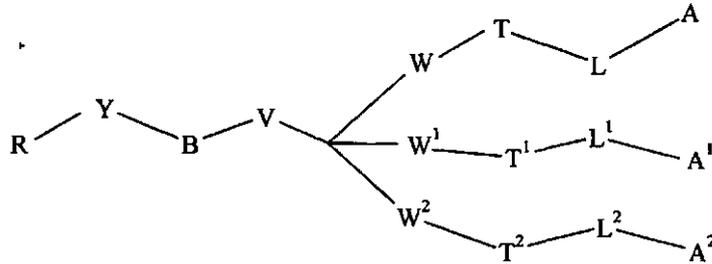
20 El tri-Fab' desprotegido, en fosfato de sodio 0,1M, pH 7,50 (que contiene hidrocloreto de hidroxilamina 50 mM y EDTA 2 mM), se incubó con un exceso molar de tres veces de derivados de monomaleimida de PEG (5-49 K), a temperatura ambiente durante 18 horas. El grado de extensión de la reacción se analizó mediante filtración en gel de HPLC (GF250:fosfato de sodio 0,2M, pH 7,0, que contiene 10% de etanol) y SDS PAGE (en condiciones no reductoras y reductoras). La reacción dio como resultado >80% de productos PEGilados, según se comprueba mediante filtración en gel de HPLC. El tri-Fab' no PEGilado se eliminó por aplicación de la mezcla de reacción a la filtración en gel S-300HR (cebada con 1% de PEG<sub>20K</sub>) o intercambio catiónico SP-Sepharose HP, y el producto PEGilado resultante se caracterizó mediante filtración en gel de HPLC y SDS PAGE como antes.

#### Ejemplo 9: Unión de un colorante fluorescente al tri-Fab' de los Ejemplos 6 y 7

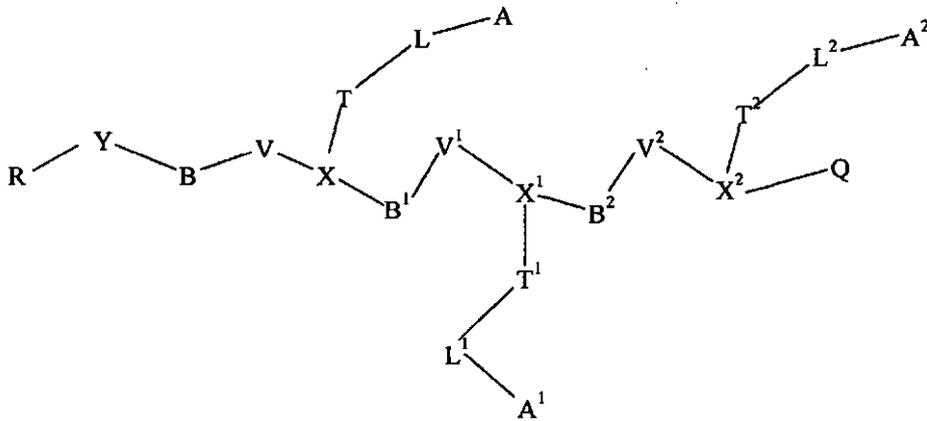
30 El tri-Fab' desprotegido se preparó como se describe en el Ejemplo 8. El tri-Fab' desprotegido, en fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,50 (que contiene hidrocloreto de hidroxilamina 50 mM y EDTA 2 mM), se incubó con un exceso molar de seis veces de Alexa Fluor® 488 C<sub>5</sub> maleimida (Molecular Probes A-10254), durante 18 horas a temperatura ambiente. El reactivo en exceso se eliminó mediante filtración en gel. El grado de marcaje se calculó usando las concentraciones de proteína y de colorante con los coeficientes de extinción molar apropiados en los máximos de absorción, para dar como resultado 1,11 colorantes por molécula de TFM.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de la fórmula (I) o (II):



(I)



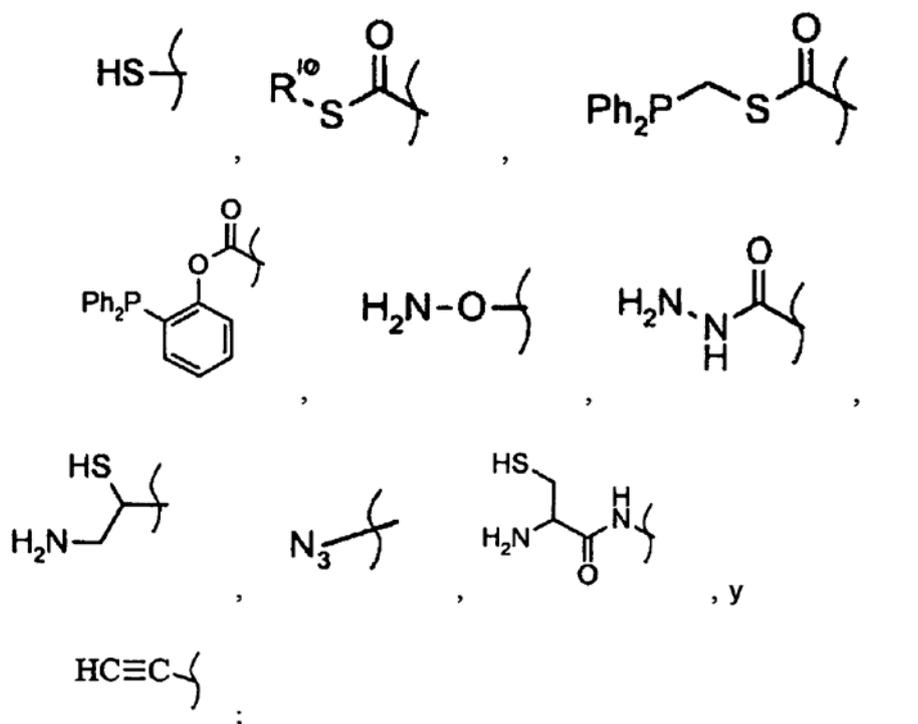
(II)

5 en las que:

A, A<sup>1</sup> y A<sup>2</sup> representan independientemente el resto de un anticuerpo o su fragmento seleccionado del grupo que comprende anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab'), o un fragmento de unión a epítipo de un anticuerpo o dichos fragmentos;

L, L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> son succinimida;

10 R representa un grupo reactivo que es adecuado para unirse a una molécula efectora pero que no reacciona con ninguno de A, A<sup>1</sup> ni A<sup>2</sup>, en el que R se selecciona de:



$\text{R}^{10}$  representa arilo o heteroarilo;

Y representa un enlace covalente o  $-(\text{CH}_2)_y\text{-}$ ;

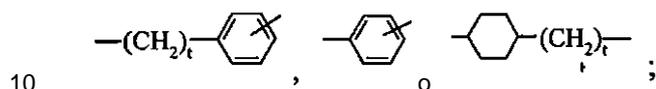
B,  $\text{B}^1$  y  $\text{B}^2$  representan independientemente  $-\text{CONH-}$ ,  $-\text{NHCO-}$  o  $-\text{CO-}$ ;

5 V,  $\text{V}^1$  y  $\text{V}^2$  representan independientemente un enlace covalente o  $-(\text{CH}_2)_v\text{-}$ ;

X,  $\text{X}^1$  y  $\text{X}^2$  representan independientemente  $\text{CR}^1$  o N;

W,  $\text{W}^1$  y  $\text{W}^2$  representan independientemente  $-(\text{CH}_2)_w\text{O-}$ ;

T,  $\text{T}^1$  y  $\text{T}^2$  representan independientemente un grupo ligador seleccionado de  $-(\text{CH}_2)_t\text{-}$ ,  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n\text{-}$ ,  $(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_x\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n\text{-}$ ,  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_p(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_z\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n\text{-}$ ,  $-(\text{CH}_2)_t\text{NHCO}(\text{CH}_2)_m\text{-}$ ,



t es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10;

n es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

x es 2, 3, 4, 5 ó 6;

z es 1 a 500;

15 p es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6;

m es 1, 2, 3, 4, 5, ó 6;

r es 2, 3, 4 ó 5;

Q representa  $\text{CO}_2\text{R}^a$  o  $\text{CONR}^a\text{R}^b$ ;

$\text{R}^a$  representa hidrógeno o alquilo de  $\text{C}_{1-4}$ ;

20  $\text{R}^b$  representa hidrógeno o alquilo de  $\text{C}_{1-4}$ ;

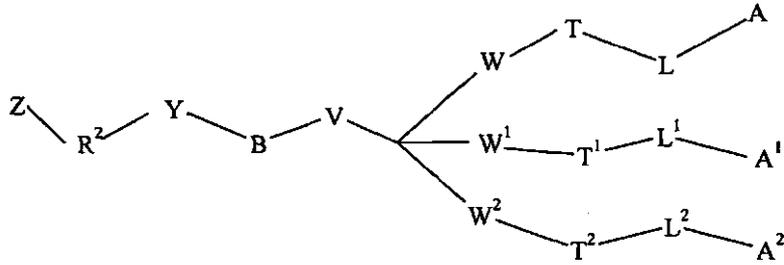
$R^1$  representa hidrógeno o alquilo de  $C_{1-4}$ ;

v es 1, 2, 3 ó 4;

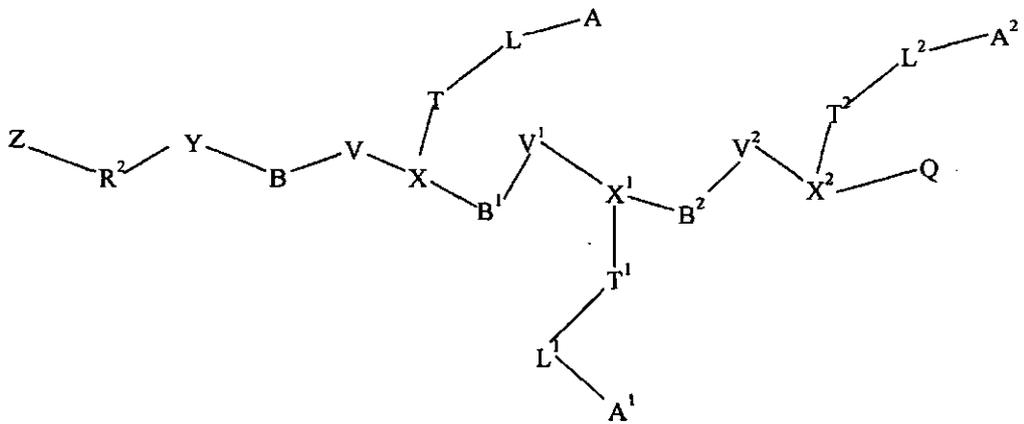
w es 1, 2, 3 ó 4; y

y es 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

- 5 2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que A,  $A^1$  y  $A^2$  son cada uno el resto de un fragmento Fab'.  
 3. Un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (III) o (IV):



(III)

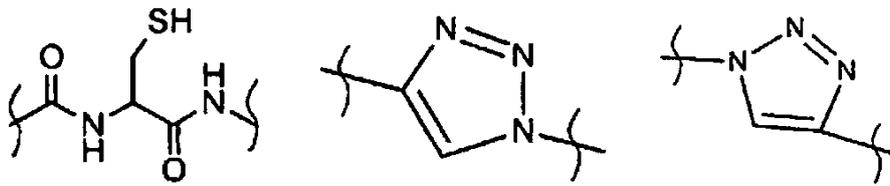
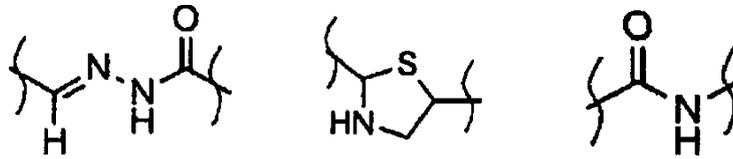
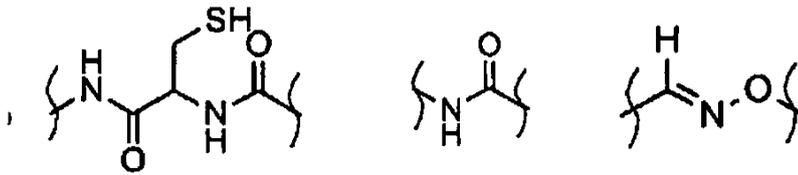
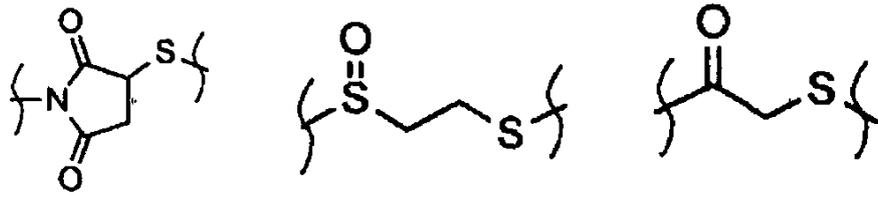


(IV)

en las que

- 10 Z es el resto de una molécula efectora;

$R^2$  se selecciona de:



y cada una de las otras variables es como se define en la reivindicación 1;

que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula Z-Z<sup>1</sup>, en la que Z<sup>1</sup> se selecciona de:



Figura 1

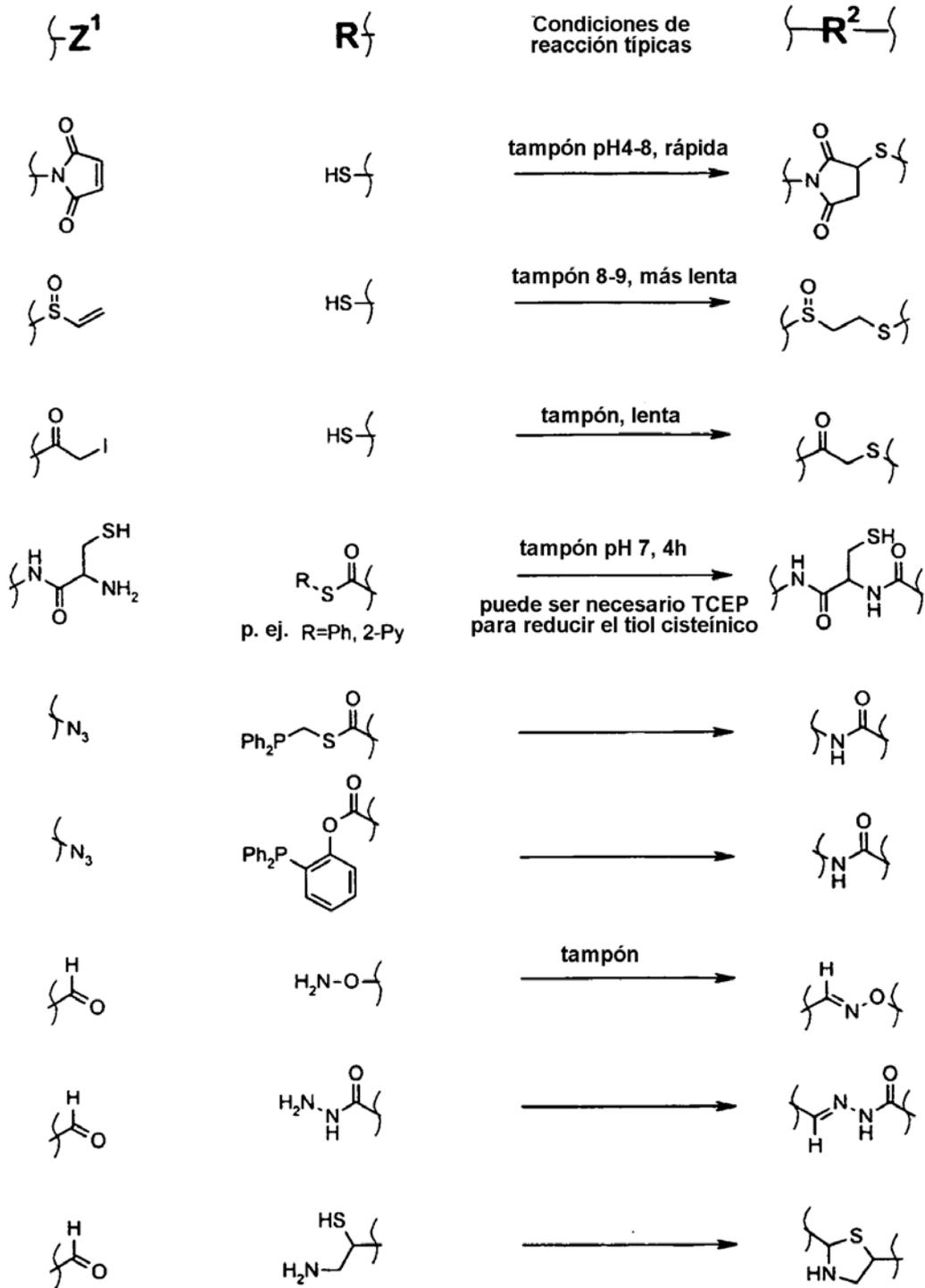


Figura 1 continuación

