

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 209**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2013 PCT/GB2013/052661**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064423**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2013 E 13786530 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2911700**

54 Título: **Conjugados fármaco-proteína**

30 Prioridad:

**24.10.2012 US 201261717710 P**  
**24.10.2012 US 201261717743 P**  
**12.04.2013 US 201361811285 P**  
**19.06.2013 WO PCT/GB2013/051593**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.07.2017**

73 Titular/es:

**POLYTHERICS LIMITED (100.0%)**  
**Babraham Research Campus**  
**Babraham, Cambridge CB22 3AT, GB**

72 Inventor/es:

**BURT, JOHN;**  
**GODWIN, ANTONY;**  
**FRIGERIO, MARK y**  
**BADESCU, GEORGE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 623 209 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Conjugados fármaco-proteína

Esta invención se refiere a conjugados fármaco-proteína novedosos.

5 La especificidad de las proteínas de unión para marcadores específicos en la superficie de células y moléculas diana ha conducido a su uso extenso como vehículos para una diversidad de agentes de diagnóstico y terapéuticos. Por ejemplo, dichas proteínas conjugadas con marcadores y grupos informadores tales como fluoróforos, radioisótopos y enzimas, encuentran uso en aplicaciones de marcado y formación de imágenes, mientras que la conjugación con agentes citotóxicos y fármacos de quimioterapia permite la administración dirigida de dichos agentes a tejidos o estructuras específicas, por ejemplo, tipos celulares o factores de crecimiento particulares, minimizando el impacto en el tejido sano normal y reduciendo significativamente los efectos secundarios asociados a los tratamientos de quimioterapia. Dichos conjugados tienen amplias aplicaciones terapéuticas potenciales en varias áreas de enfermedad, particularmente en cáncer.

10 Los polímeros sintéticos solubles en agua, particularmente polialquilenglicoles, se usan ampliamente para conjugar moléculas terapéuticamente activas tales como ligandos de péptidos o proteínas, incluyendo anticuerpos. Se ha demostrado que estos conjugados terapéuticos alteran la farmacocinética favorablemente prolongando el tiempo de circulación y disminuyendo las tasas de depuración, disminuyendo la toxicidad sistémica y, en varios casos, mostrando una mayor eficacia clínica. El proceso de conjugación covalente de polietilenglicol, PEG, con proteínas se conoce comúnmente como "PEGilación".

15 Es importante para una eficacia optimizada y para asegurar la consistencia de dosis a dosis que el número de restos conjugados por proteína de unión sea el mismo, y que cada resto esté específicamente conjugado al mismo residuo aminoacídico en cada proteína de unión. Por consiguiente, se han desarrollado varios métodos para mejorar la homogeneidad de dichos conjugados. Liberatore et al, Bioconj. Chem 1990, 1, 36-50, y del Rosario et al, Bioconj. Chem. 1990, 1, 51-59 describen el uso de reactivos que pueden usarse para reticular a través de los enlaces disulfuro en proteínas, incluyendo anticuerpos. El documento WO 2005/007197 describe un proceso para la conjugación de polímeros en proteínas, usando novedosos reactivos de conjugación que tienen la capacidad de conjugarse con ambos átomos de azufre derivados de un enlace disulfuro en una proteína para dar novedosos conjugados tioéter. Khalili et al, Bioconj. Chem. 23(11), 1043-1802, también describen tal proceso.

20 Las auristatinas son agentes antineoplásicos, y son una clase de fármaco altamente potente, que destruye las células. Se están desarrollando varios miembros de esta clase, incluyendo el producto natural dolastatina 10 (aislado de Dolabella auricularia), monometilauristatina E, monometilauristatina F, monometilauristatina D, auristatina PYE y auristatina PHE, para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo el cáncer. Son altamente tóxicas, y muchas investigaciones están dirigidas actualmente al desarrollo de conjugados que contienen auristatinas.

25 El documento WO 2009/117531 está dirigido a conjugados de fármacos que tienen auristatinas unidas a través del extremo C a un enlazador y de allí a un anticuerpo. Se indica que estos conjugados muestran eficacia sin la necesidad de un grupo auto-inmolativo para liberar el fármaco. El documento WO 2009/052431 se refiere a agentes de unión a CD19 y desvela conjugados de auristatina. El documento EP 2.354.163 también menciona conjugados de auristatina.

30 Dos conjugados de fármacos de anticuerpos han recibido aprobación reguladora: uno es brentuximab vedotin, en el que el fármaco es una auristatina, y uno es trastuzumab emtansina, en el que el fármaco es una maytansina. En estos dos conjugados disponibles en el mercado, el enlace del fármaco al anticuerpo utiliza un enlazador basado en maleimida. Las maleimidias se usan ampliamente en los reactivos de conjugación. Sin embargo, como con muchos otros reactivos de conjugación, el uso de maleimidias presenta una serie de dificultades: el control de la reacción de conjugación es difícil, dando lugar a productos de baja homogeneidad, y la estabilidad de los conjugados resultantes puede ser un problema.

35 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de conjugados de auristatina-anticuerpo mejorados con mejor estabilidad y homogeneidad, que se puedan preparar eficazmente y que demuestren la eficacia requerida.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un conjugado que contiene auristatina que tiene la fórmula general:

50 
$$(((D_q-Lk^1)_m-P)_p-Lk^2-Lk^3)_n-Ab(I)$$

en la que D representa un resto de auristatina;

q representa un número entero de 1 a 10;

Lk<sup>1</sup> representa un enlazador;

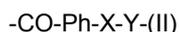
m representa un número entero de 1 a 10;

P representa un enlace o un grupo valente z -P<sup>1</sup>-NH- donde z es de 2 a 11 y P<sup>1</sup> es un grupo que contiene al menos una unidad de etileno -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- o una unidad de etilenglicol -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;

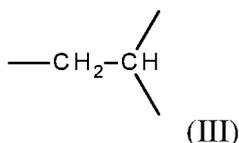
p representa un número entero de 1 a 10;

- 5 Lk<sup>2</sup> representa un enlace o un enlazador valente y donde y es de 2 a 11 y que consiste en 1 a 9 residuos de aspartato y/o glutamato;

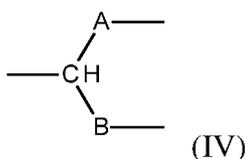
Lk<sup>3</sup> representa un enlazador de la fórmula general:



- 10 en la que Ph es un grupo fenilo opcionalmente sustituido; X representa un grupo CO o un grupo CH.OH; e Y representa un grupo de fórmula:



o



en el que cada uno de A y B representa un grupo alquileo o alquenileno C<sub>1-4</sub>;

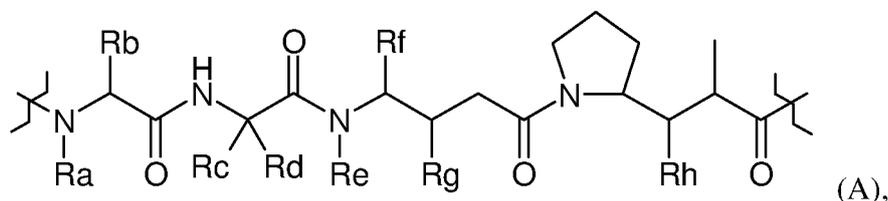
- 15 Ab representa una proteína o péptido de unión capaz de unirse a un compañero de unión en una diana, estando dicha proteína de unión unida a Lk<sup>3</sup> a través de dos átomos de azufre derivados de un enlace disulfuro en la proteína o péptido de unión; y

n representa un número entero de 1 a s donde s es el número de enlaces disulfuro presentes en la proteína o péptido de unión antes de la conjugación en Lk<sup>3</sup>;

- 20 escogiéndose los significados de m, n, p, c, y z de tal forma que el conjugado contiene de 1 a 10 grupos D.

D representa un resto de auristatina (es decir, el grupo Lk<sup>1</sup> está unido al residuo de una auristatina). El término auristatina incluye compuestos tales como auristatina D, auristatina E, auristatina F, monometil auristatina D, monometil auristatina E, monometil auristatina F, auristatina PYE auristatina PHE, el producto natural relacionado dolastatina 10, y derivados de las mismas.

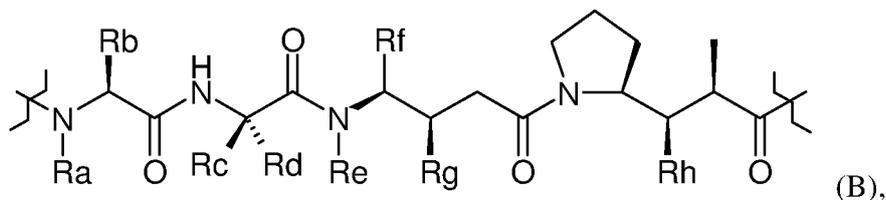
- 25 Preferiblemente, la auristatina es un compuesto que contiene la subestructura (A)



- 30 en la que Ra representa alquilo C<sub>1-8</sub>; Rb representa H, alquilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub> o cicloalquenilo, arilo, -X-arilo, -X-cicloalquilo C<sub>3-8</sub> o cicloalquenilo, heterociclilo C<sub>3-8</sub> o -X-heterociclilo C<sub>3-8</sub>; Rc representa H o metilo; Rd representa H, alquilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub> o cicloalquenilo, arilo, -X-arilo, -X-heterociclilo C<sub>3-8</sub>, -heterociclilo C<sub>3-8</sub>, -X-heterociclilo C<sub>3-8</sub>, -X-S-alquilo C<sub>1-8</sub>; o Rc y Rd juntos forman un anillo carbocíclico de fórmula -(CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)<sub>r</sub>, donde R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> independientemente representan H o alquilo C<sub>1-8</sub> y r es un número entero de 2 a 6; Re representa H o alquilo C<sub>1-8</sub>; Rf representa H, alquilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub> o cicloalquenilo, arilo, -X-arilo, -X-cicloalquilo C<sub>3-8</sub> o cicloalquenilo, heterociclilo C<sub>3-8</sub> o -X-heterociclilo C<sub>3-8</sub>; Rg representa H, -OH, -alquilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub> o cicloalquenilo, o -O-(alquilo C<sub>1-8</sub>); Rh representa H, -OH, -alquilo C<sub>1-8</sub>, cicloalquilo C<sub>3-8</sub> o cicloalquenilo, o -O-(alquilo C<sub>1-8</sub>); y cada X es independientemente alquileo C<sub>1-10</sub>.
- 35

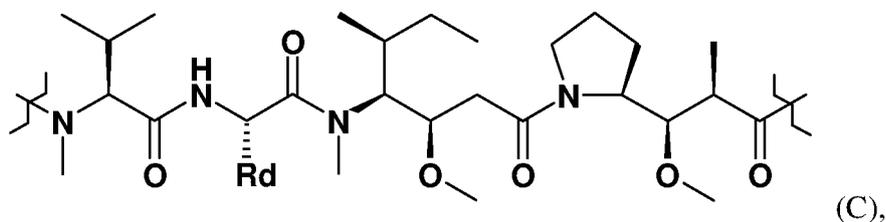
- 5 Preferiblemente Ra representa alquilo C<sub>1-4</sub>, especialmente metilo. Preferiblemente Rb representa alquilo C<sub>1-4</sub>, especialmente isopropilo. Preferiblemente Rc representa H. Preferiblemente Rd representa alquilo C<sub>1-4</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, más preferiblemente -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, mucho más preferiblemente -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Preferiblemente Re representa H o alquilo C<sub>1-4</sub>; mucho más preferiblemente Re representa metilo. Preferiblemente Rf representa alquilo C<sub>1-4</sub>, especialmente 1-metilpropilo. Preferiblemente Rg representa -OH o -O- (alquilo C<sub>1-4</sub>); mucho más preferiblemente Rg representa metoxi. Preferiblemente Rh representa -OH o -O- (alquilo C<sub>1-4</sub>); mucho más preferiblemente Rh representa metoxi.

Más preferiblemente, la auristatina comprende la subestructura (B)



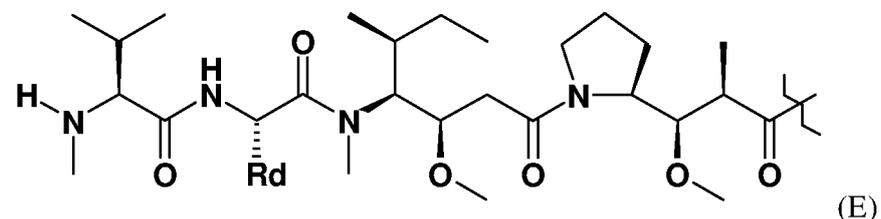
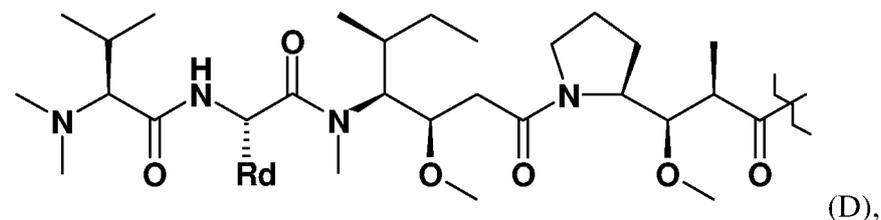
- 10 en la que Ra-Rh tienen los significados que se han expuesto anteriormente.

Aún más preferiblemente, la auristatina comprende la subestructura (C)

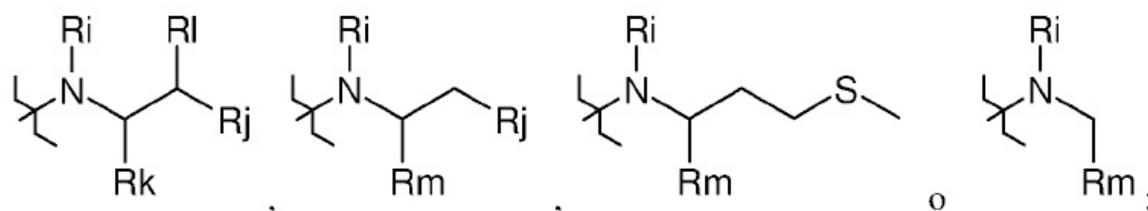


en la que Rd representa -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>.

- 15 En algunas realizaciones preferidas, el grupo N-terminal de auristatina es hidrógeno o alquilo C<sub>1-8</sub>, más preferiblemente hidrógeno o metilo. Por ejemplo, la auristatina puede ser un compuesto que contiene la subestructura (D) o (E):



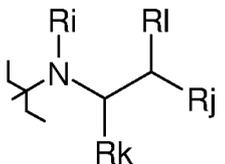
En algunas realizaciones preferidas, el grupo C-terminal de auristatina es:



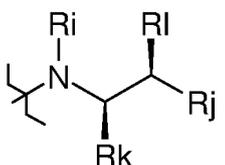
- 20 en la que Ri representa hidrógeno o alquilo C<sub>1-8</sub>; Rj representa arilo C<sub>6-10</sub> o heteroarilo C<sub>5-10</sub>, estando dicho arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del

5 grupo que consiste en halógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con hasta 3 halógenos, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-4</sub> y ciano; Rk representa hidrógeno o alquilo C<sub>1-8</sub>; Rl representa hidrógeno o hidroxilo; y Rm representa -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>alquilo C<sub>1-8</sub>, -CONH-arilo C<sub>6-10</sub>, -CONH-heteroarilo C<sub>5-10</sub> y heteroarilo C<sub>5-10</sub>, estando dicho grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en halógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con hasta 3 halógenos, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-4</sub> y ciano.

En algunas realizaciones preferidas, el grupo C-terminal de auristatina es

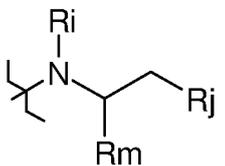


más preferiblemente

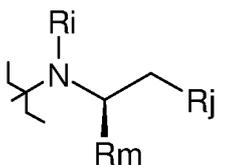


10 en la que Ri representa hidrógeno; Rj representa fenilo o heteroarilo C<sub>5-10</sub>, estando dicho fenilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en halógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con hasta 3 halógenos, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-4</sub> y ciano; y Rk y Rl son los dos hidrógenos, o Rk es metilo y Rl es hidroxilo.

15 En algunas realizaciones preferidas, el grupo C-terminal de auristatina es

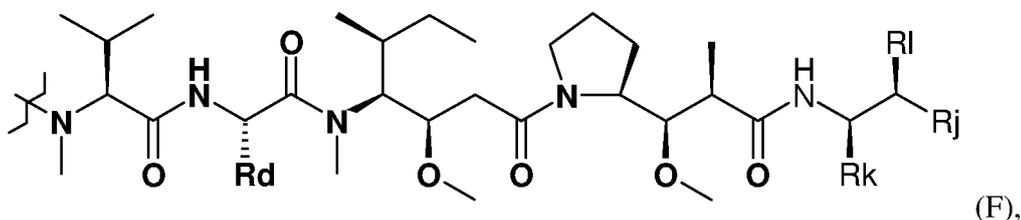


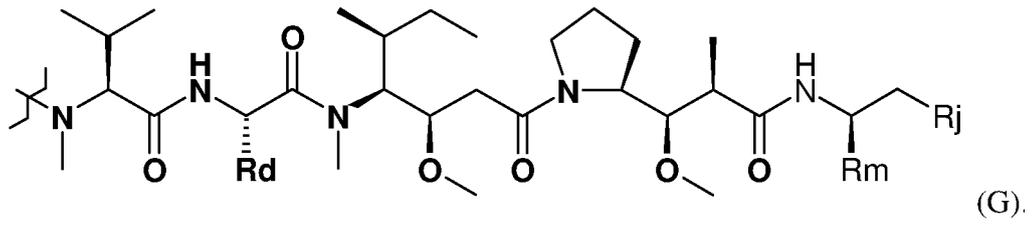
más preferiblemente



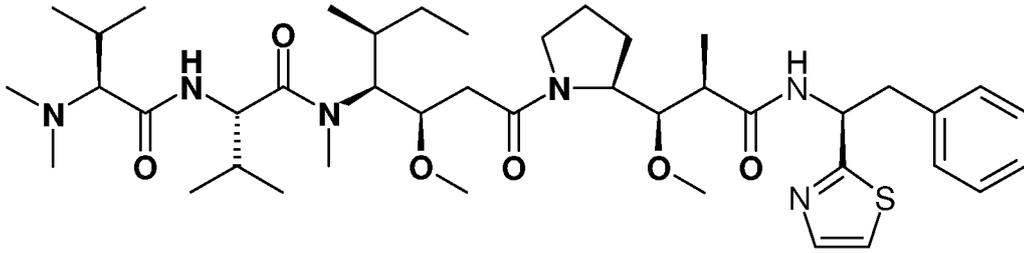
20 en la que Ri representa hidrógeno; Rj representa fenilo o heteroarilo C<sub>5-10</sub>, estando dicho fenilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en halógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con hasta 3 halógenos, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-4</sub> y ciano; y Rm representa -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>alquilo C<sub>1-8</sub>, o heteroarilo C<sub>5-10</sub>, estando dicho heteroarilo opcionalmente sustituido con hasta 3 sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en halógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> opcionalmente sustituido con hasta 3 halógenos, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-4</sub> y ciano.

25 Por ejemplo, la auristatina puede contener la subestructura (F) o (G):

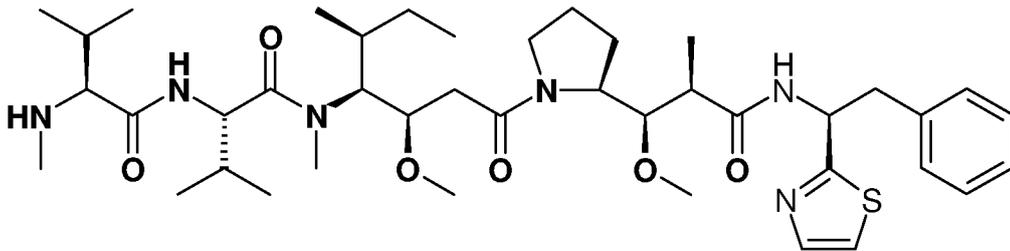




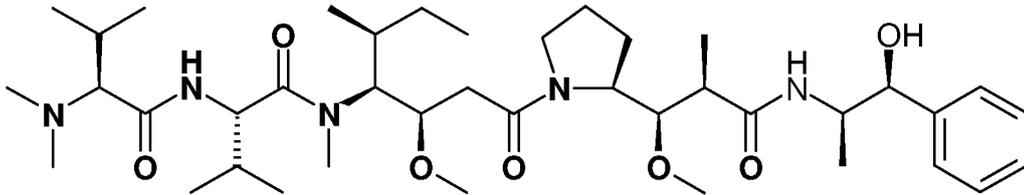
Los ejemplos de auristatinas específicas preferidas incluyen:



5 (dolastatina 10),

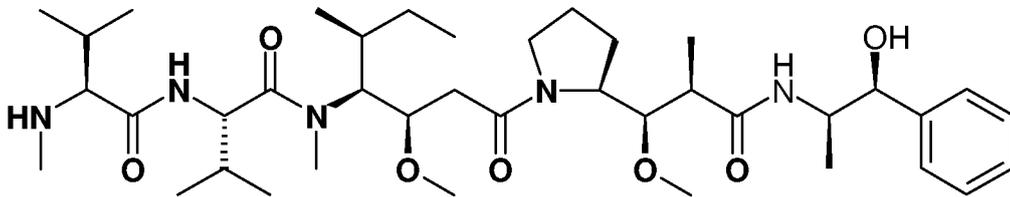


(monometil dolastatina 10),

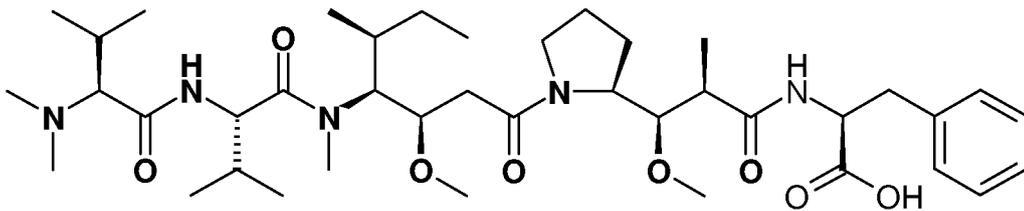


(auristatina E),

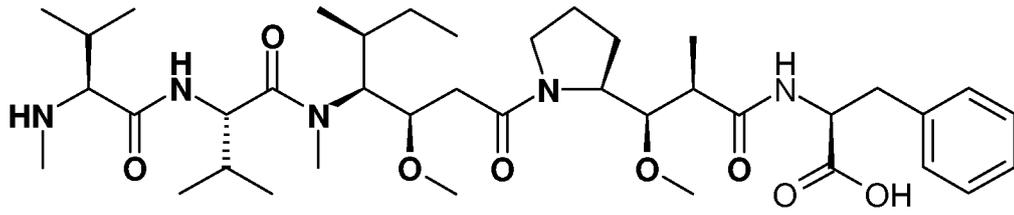
10



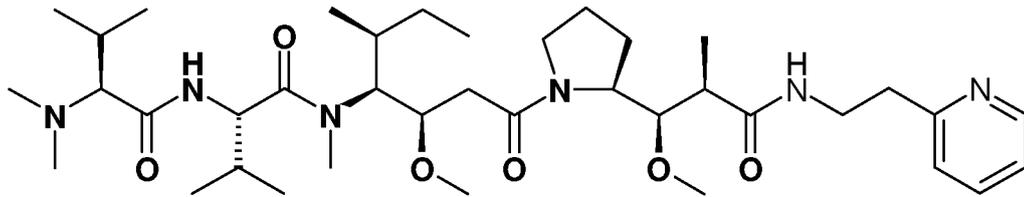
(monometil auristatina E),



(auristatina F),

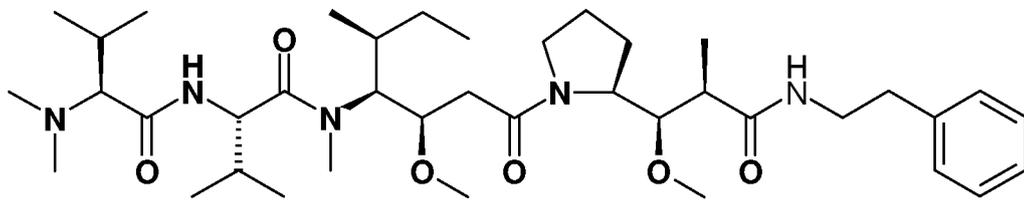


(monometil auristatina F),

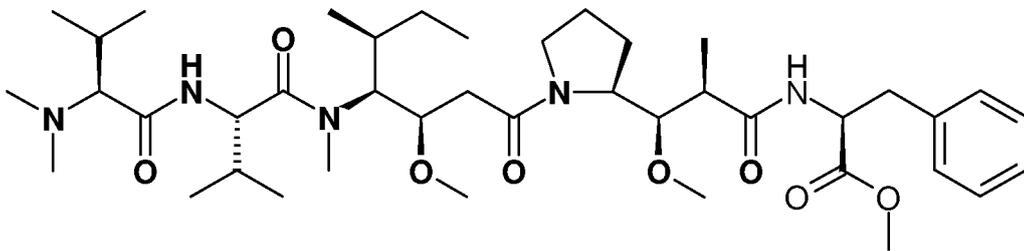


(auristatina PYE),

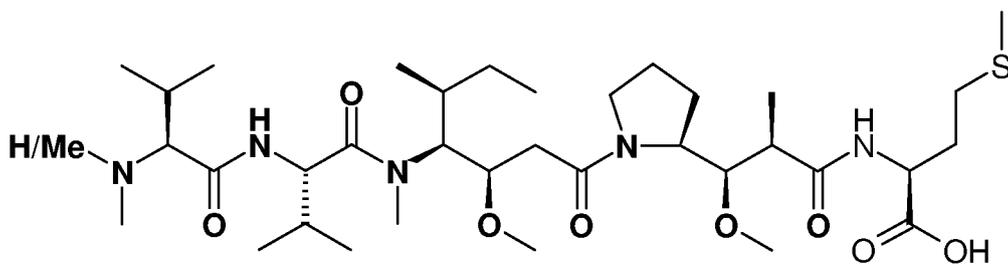
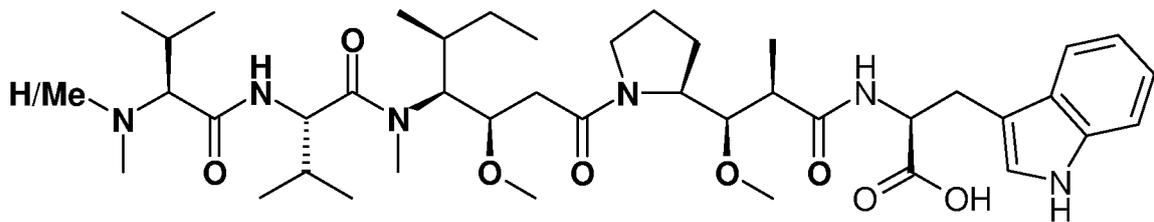
5



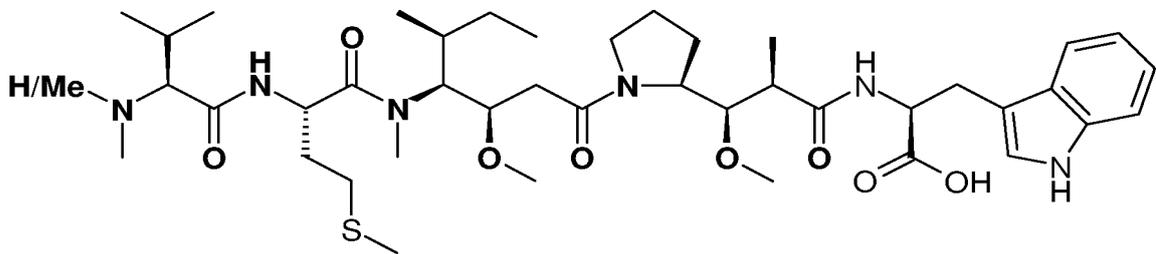
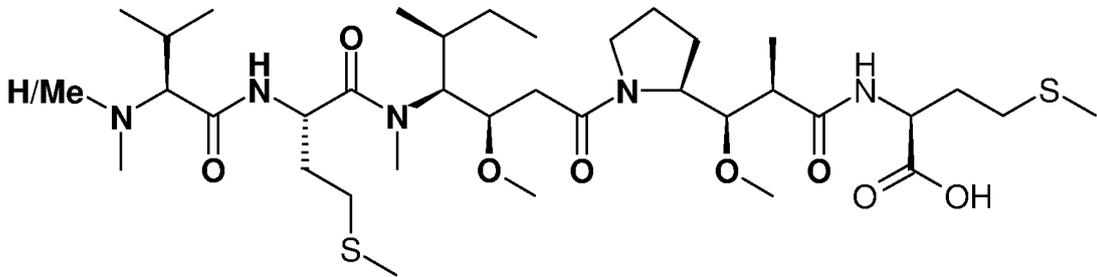
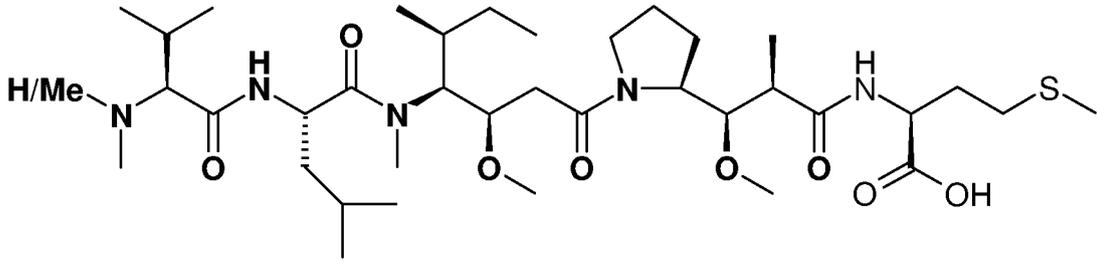
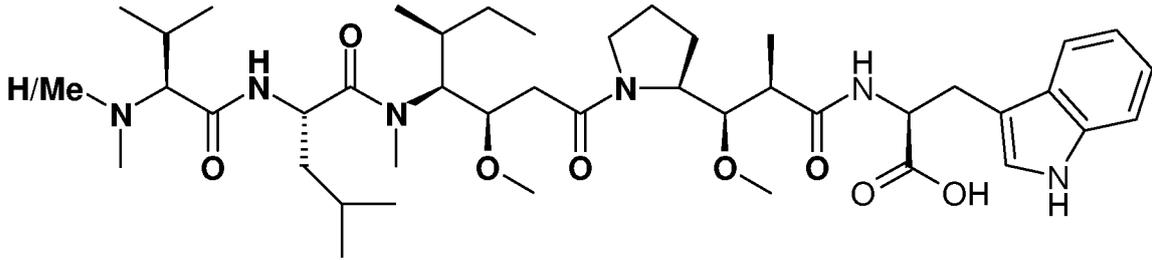
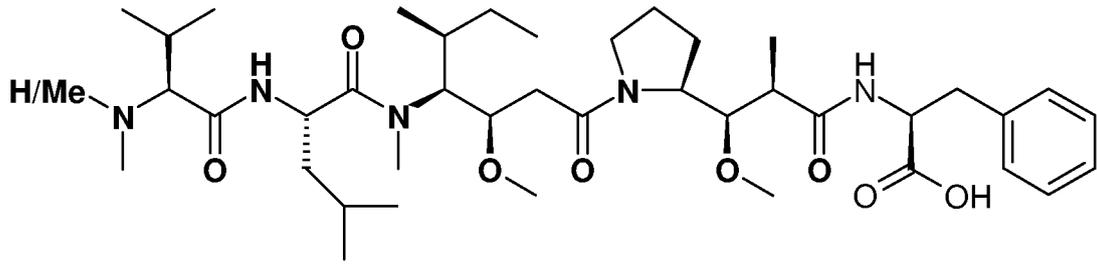
(auristatina PE),



(auristatina PHE),

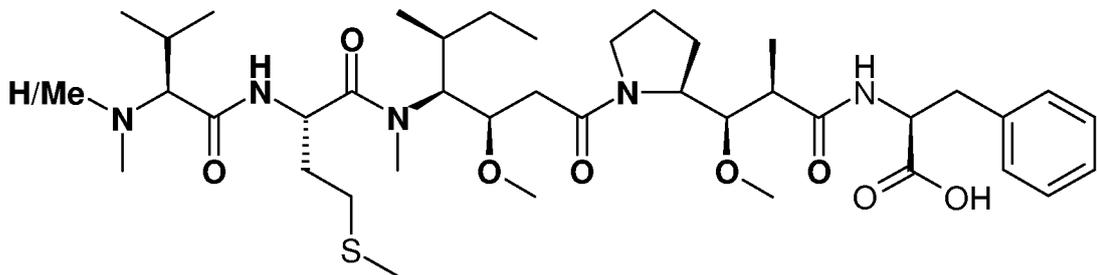


10



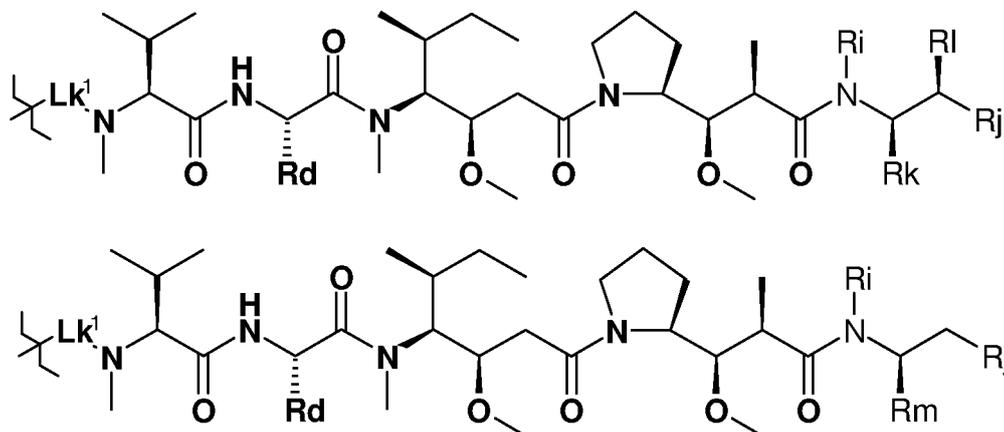
5

y

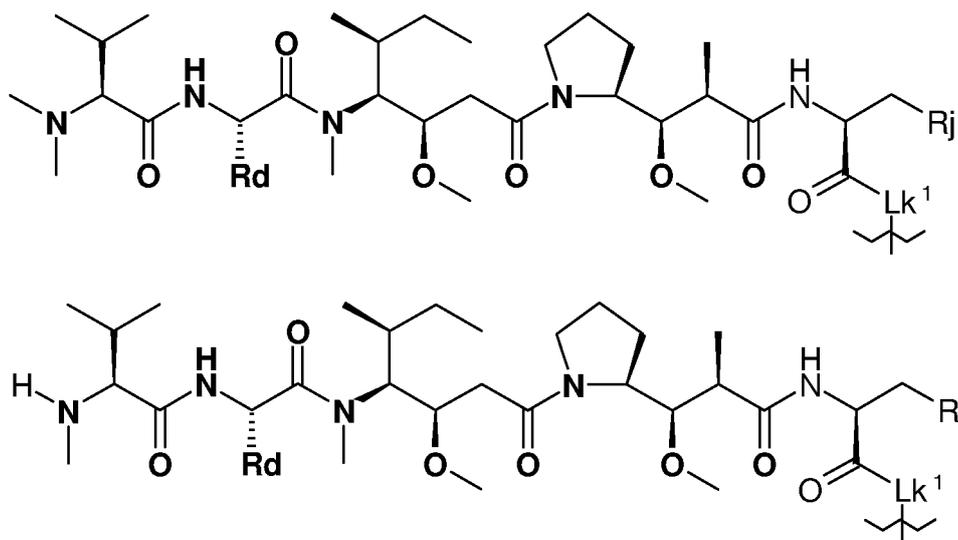


Dependiendo de la estructura de la auristatina, puede existir en la forma de la base libre o ácido libre, o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, y/o como un solvato. Los conjugados de fórmula I también pueden existir en estas formas.

- 5 Lk<sup>1</sup> puede estar unido al resto de auristatina en cualquier punto adecuado. Cuando el resto de auristatina corresponde a una auristatina que tiene un hidrógeno N-terminal, Lk<sup>1</sup> está unido preferiblemente al nitrógeno N-terminal, por ejemplo

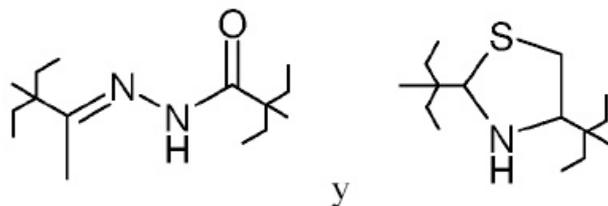


- 10 En el caso de un resto de auristatina correspondiente a una auristatina en la que Rm representa -CO<sub>2</sub>H, Lk<sup>1</sup> puede estar unido, por ejemplo, al carbono C-terminal, por ejemplo



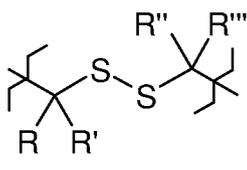
- 15 Lk<sup>1</sup> es un enlazador, un enlace o un grupo que conecta un resto de auristatina D a un grupo P. Puede llevar de 1 a 10 grupos D. Lk<sup>1</sup> contiene preferiblemente un grupo degradable, es decir Lk<sup>1</sup> es preferiblemente un enlazador que se rompe en condiciones fisiológicas, separando D de Ab. Como alternativa, Lk<sup>1</sup> puede ser un enlazador que no es escindible en condiciones fisiológicas. Cuando Lk<sup>1</sup> es un enlazador que se rompe en condiciones fisiológicas, puede escindirse preferiblemente en condiciones intracelulares. Cuando la diana es intracelular, preferiblemente Lk<sup>1</sup> es sustancialmente insensible a las condiciones extracelulares (es decir, de manera que la administración a la diana intracelular de una dosis suficiente del agente terapéutico no esté prohibida).

- 20 Cuando Lk<sup>1</sup> es un enlazador degradable, puede contener un grupo que es sensible a las condiciones hidrolíticas. Lk<sup>1</sup> puede contener un grupo que se degrada a ciertos valores de pH (por ejemplo, condiciones ácidas). Pueden encontrarse, por ejemplo, condiciones hidrolíticas/ácidas en endosomas o lisosomas. Los ejemplos de grupos susceptibles a hidrólisis en condiciones ácidas incluyen hidrazonas, semicarbazones, tiosemicarbozones, amidas cis-acotínicas, ortoésteres y acetales/cetales. Los ejemplos de grupos susceptible a condiciones hidrolíticas incluyen:
- 25

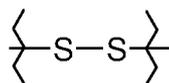


Lk<sup>1</sup> también puede ser susceptible a la degradación en condiciones reductoras. Por ejemplo, Lk<sup>1</sup> puede contener un grupo disulfuro que es escindible en la exposición a agentes reductores biológicos, tales como tioles. Los ejemplos de grupos disulfuro incluyen:

5

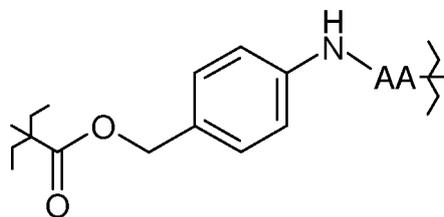


en la que cada uno de R, R', R'' y R''' es independientemente hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub>, y



10

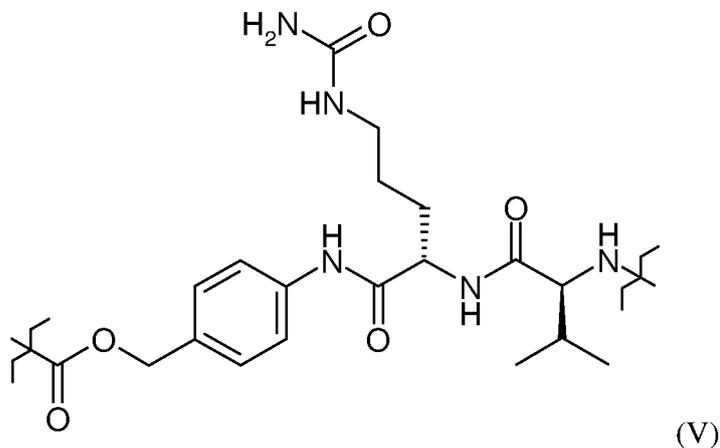
Lk<sup>1</sup> también puede contener un grupo que es susceptible a la degradación enzimática, por ejemplo, puede ser susceptible a la escisión por una proteasa (por ejemplo, una proteasa lisosomas o endosomal) o una peptidasa. Por ejemplo, Lk<sup>1</sup> puede contener un grupo peptídico que comprende al menos uno, por ejemplo al menos dos, o al menos tres, residuos aminoácidos (por ejemplo, Phe-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Val-Cit, Phe-Lys). Por ejemplo, Lk<sup>1</sup> puede ser una cadena aminoacídica que tiene de 1 a 5, por ejemplo de 2 a 4, aminoácidos. Otro ejemplo de un grupo susceptible a la degradación enzimática es:



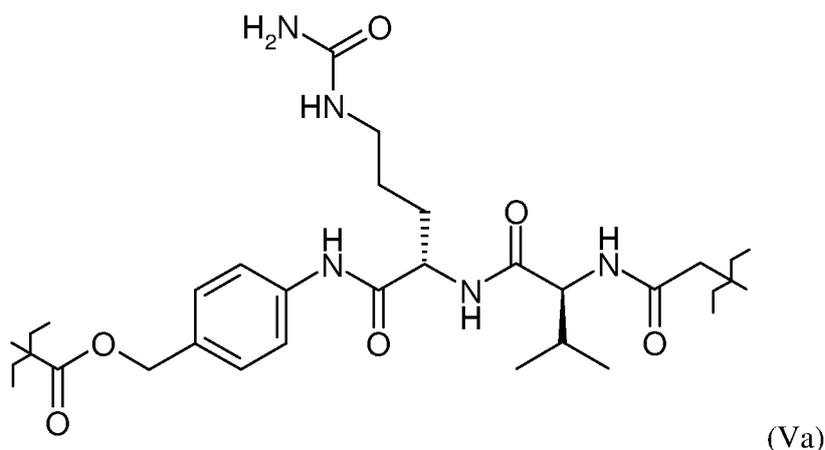
15

donde AA representa una secuencia aminoacídica específica de proteasa, tal como Val-Cit.

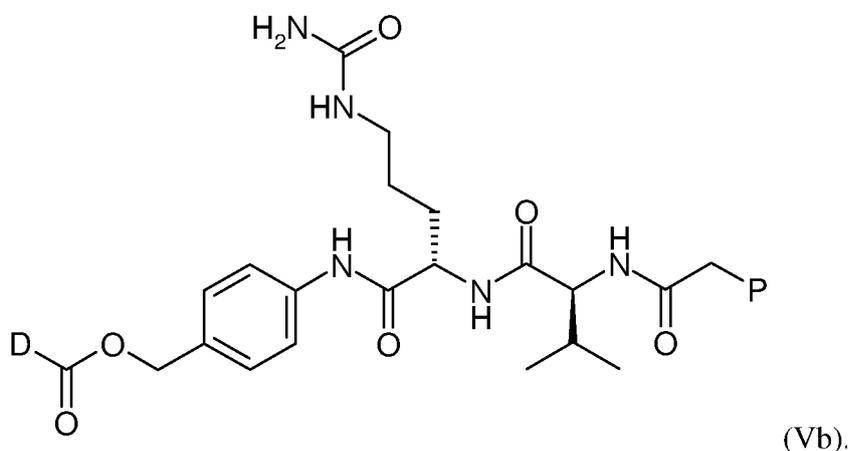
En una realización preferida, Lk<sup>1</sup> es o incluye:



Por ejemplo, Lk<sup>1</sup> puede ser

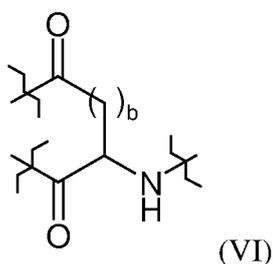


en cuyo caso está unido preferiblemente a los grupos D y P como se muestra a continuación

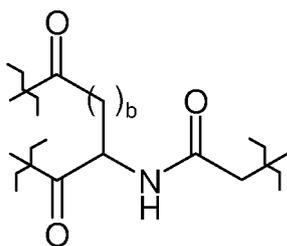


En esa realización, el resto de auristatina D está unido preferiblemente a través del nitrógeno N-terminal.

- 5 En una realización,  $Lk^1$  lleva un único resto de auristatina D (es decir  $q = 1$ ). El enlazador específico V mostrado anteriormente es de este tipo. En otra realización,  $q$  es mayor de 1, por ejemplo 2, 3 o 4, y  $Lk^1$  se usa como un medio para incorporar más de un resto de auristatina en un conjugado de la invención. En una realización, esto puede conseguirse por el uso de un enlazador de ramificación  $Lk^1$ , que puede incorporar, por ejemplo, un residuo de aspartato o glutamato, o un residuo similar. Esto introduce un elemento de ramificación de fórmula:

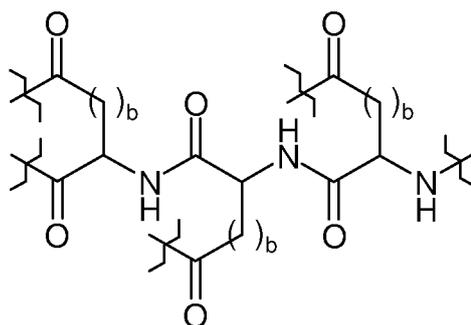


- 10 donde  $b$  es 1, 2 o 3, siendo  $b = 1$  aspartato y siendo  $b = 2$  glutamato, y representando  $b = 3$  una realización preferida. Cada uno de los restos de acilo en la fórmula VI puede acoplarse a un grupo D a través de un enlazador adecuado  $Lk^{1a}$ , donde  $Lk^{1a}$  es cualquier enlazador adecuado, por ejemplo, un enlazador degradable que incorpora uno de los enlaces que se han mencionado anteriormente para  $Lk^1$ . En una realización particular,  $Lk^{1a}$  representa el grupo V que se ha mostrado anteriormente. El grupo amino del residuo de aspartato o glutamato o un residuo similar
- 15 puede estar unido a P por cualquier medio adecuado, por ejemplo, el enlace puede ser a través de un enlace amida, por ejemplo, el grupo de ramificación anterior puede estar conectado a P a través de un grupo  $-CO.CH_2-$ , por lo tanto:



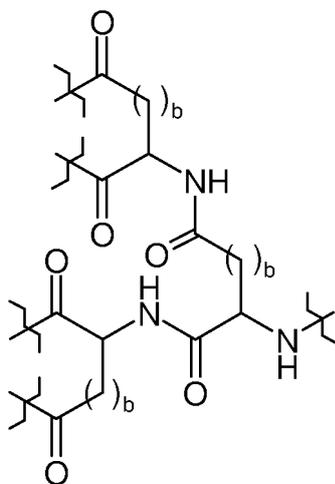
(VIa)

Si se desea, el residuo de aspartato o glutamato, o un residuo similar, puede acoplarse residuos de aspartato y/o glutamato adicionales y/o residuos similares, por ejemplo:



(VIIa)

5 o



(VIIb)

etc., hasta un máximo de 9 de dichos residuos, dando el potencial de incorporar hasta 10 grupos D. Como anteriormente, cada D puede estar unido a un residuo de aspartato/glutamato o similar a través de cualquier enlazador adecuado Lk<sup>1a</sup>.

- 10 Cuando P representa un grupo  $-P^1-NH-$ ,  $P^1$  contiene al menos una unidad de etileno o etilenglicol ( $-CH_2-CH_2-$  o  $-O-CH_2-CH_2-$ ). Si muchas de estas unidades están presentes,  $P^1$  representa polietileno, PE, o polietilenglicol, PEG. Estos polímeros pueden contener una única cadena lineal, o pueden tener una morfología ramificada compuesta de muchas cadenas pequeñas o grandes, en cuyo caso contendrán grupos de ramificación, que típicamente contienen  $>CH-$ , como por ejemplo en  $-(CH_2CH_2)_2-CH-$  o  $-(O-CH_2)_2-CH-$ . Pueden opcionalmente derivatizarse o funcionalizarse
- 15 de cualquier manera deseada. Por ejemplo, pueden llevar un agente terapéutico adicional, o un agente de marcado. Los conjugados multiméricos que contienen más de una molécula de agente terapéutico, por ejemplo más de una molécula de una auristatina, o una molécula de un agente terapéutico además de una molécula de una auristatina, pueden dar como resultado beneficios sinérgicos y aditivos.

- 20 Cuando  $P^1$  representa PE o PEG, el peso molecular óptimo del polímero dependerá, por supuesto, de la aplicación pretendida. Generalmente, cuando  $P^1$  representa PE, se prefiere que el peso molecular medio en número sea de hasta 2 kDa, preferiblemente de hasta 1 kDa. Cuando  $P^1$  representa PEG, se pueden usar pesos moleculares más altos, por ejemplo, el peso molecular medio en número puede ser de hasta 75 kDa, por ejemplo, hasta 60 kDa, siendo el peso molecular medio en número mínimo por ejemplo de al menos 0,5 kDa, por ejemplo al menos 1 kDa,

por ejemplo 2 kDa. En una realización preferida, puede usarse PEG del peso molecular medio en número de 0,5 a 2 kDa. Sin embargo, en algunas realizaciones preferidas, P puede ser un enlace, o P puede representar  $-P^1-NH-$ , donde  $P^1$  contiene un pequeño número de unidades discretas de etileno o etilenglicol, por ejemplo, de 2 a 10, por ejemplo, 2 o 3, unidades de etileno o, preferiblemente, de etilenglicol.

- 5 Si se desea que el conjugado de fórmula I contenga más de una cadena  $-(CH_2-CH_2)_a-$  o  $-(O-CH_2-CH_2)_a-$  (donde a es el número de unidades de etileno o etilenglicol en cualquier cadena lineal), por ejemplo, de manera que cada una de tales cadenas pueda llevar un grupo  $D_q-Lk^1$ , esto puede conseguirse uniendo más de una (es decir, de 2 a 10) de tales cadenas a  $Lk^2$ , o usando un PE o PEG ramificado, en cuyo caso sólo se unirá un grupo P a  $Lk^2$ , pero éste contendrá más de una ramificación, por ejemplo, de 1 a 9 ramificaciones (proporcionando de 2 a 10 puntos de unión para los grupos  $D-Lk^1$ ).

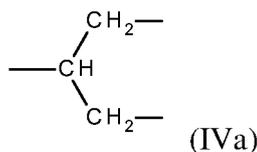
10 Se entenderá que cuando P es  $-P^1-NH-$ , el o cada grupo P se acopla a los grupos adyacentes  $Lk^1$  y/o  $Lk^2$  a través de un enlace amida. Por ejemplo, PEG (que normalmente termina con un grupo  $-OH$ ) puede convertirse en la amina PEG correspondiente, que termina con un grupo  $-NH_2$ , para la formación de enlace amida con un grupo  $-CO_2$  en, por ejemplo,  $Lk^2$ ; o el grupo OH puede hacerse reaccionar para formar un enlace  $-NH.CO.CH_2.O-$  con  $Lk^1$  como se ha descrito anteriormente.

15 En una realización preferida de la invención,  $P^1$  representa PEG, un polímero sintético soluble en agua, y a lo largo de esta memoria descriptiva, excepto cuando el contexto lo requiera de otro modo, cualquier referencia general a  $P^1$  debe entenderse que incluye una referencia específica a PEG.

20  $Lk^2$  representa un enlazador valente y donde y es de 2 a 11. Por lo tanto, es capaz de unirse a de 1 a 10 grupos P o  $Lk^1$ . En su forma más sencilla,  $Lk^2$  es un enlace, en cuyo caso  $Lk^1$  está unido directamente a un grupo  $-P^1-NH-$  o, si P es un enlace, a un grupo  $D-Lk^1$ . Sin embargo,  $Lk^2$  puede usarse como un medio para incorporar más de un grupo D (resto de auristatina) en los conjugados de la invención. Esto se consigue acoplando un residuo de aspartato o glutamato al grupo  $-CO-$  de  $Lk^3$  a través de un enlace amida (por ejemplo, haciendo reaccionar el grupo amina de aspartato o glutamato con un derivado de ácido carboxílico adecuado correspondiente a  $Lk^3$ ). Esto introduce un elemento de ramificación de fórmula VI mostrada anteriormente. En ese caso, cada uno de los restos acilo puede estar acoplado a un grupo  $-P^1-NH-$  a través de un enlace amida, o cuando P es un enlace, a un grupo  $D-Lk^1$ . Como alternativa, el residuo de aspartato o glutamato puede acoplarse a más residuos de aspartato y/o glutamato, como se muestra en las fórmulas VIIa y VIIb mostradas anteriormente, etc., hasta un máximo de 9 de dichos residuos, dando el potencial de incorporar hasta 10 grupos D a través de la unión de múltiples grupos  $D-Lk^1-P$  en diferentes puntos de unión en  $Lk^2$ . Se entenderá que la valencia de  $Lk^2$  está asociada al número de grupos  $D-Lk^1-P$  presentes. Por ejemplo, cuando P es  $-P^1-NH-$ , para cada grupo  $D-Lk^1-P$ , la valencia de  $Lk^2$  está asociada al número de grupos  $-P^1-NH-$  presentes, es decir, p equivaldrá a y-1. Cuando P es un enlace, para cada grupo  $D-Lk^1-P$ , la valencia de  $Lk^2$  está asociada al número de grupos  $D-Lk^1$  presente, es decir, m equivaldrá a y-1.

35  $Lk^3$  es un enlazador específico capaz de unirse a una proteína de unión a través de dos grupos de azufre derivados de un enlace disulfuro en la proteína de unión. En  $Lk^3$ , el grupo fenilo Ph puede estar sin sustituir o sustituido. Los sustituyentes que pueden estar presentes opcionalmente en el grupo fenilo Ph incluyen, por ejemplo, uno o más de los mismos o diferentes sustituyentes seleccionados de entre alquilo (preferiblemente alquilo  $C_{1-4}$ , especialmente metilo, opcionalmente sustituido con OH o  $CO_2H$ ),  $-CN$ ,  $-NO_2$ ,  $-CO_2R^4$ ,  $-COH$ ,  $-CH_2OH$ ,  $-COR^4$ ,  $-OR^4$ ,  $-OCOR^4$ ,  $-OCO_2R^4$ ,  $-SR^4$ ,  $-SOR^4$ ,  $-SO_2R^4$ ,  $-NHCOR^4$ ,  $-NR^4COR^4$ ,  $NHCO_2R^4$ ,  $-NR^4CO_2R^4$ ,  $-NO$ ,  $-NHOH$ ,  $-NR^4OH$ ,  $-C=N-NHCOR^4$ ,  $-C=N-NR^4COR^4$ ,  $-N^+R^4_3$ ,  $-N^+H_3$ ,  $-N^+HR^4_2$ ,  $-N^+H_2R^4$ , halógeno, por ejemplo flúor o cloro,  $-C\equiv CR^4$ ,  $-C=CR^4_2$  y  $-C=CHR^4$ , en los que cada  $R^4$  representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (preferiblemente alquilo  $C_{1-6}$ ), arilo (preferiblemente fenilo), o alquil-arilo (preferiblemente, alquil  $C_{1-6}$ -fenilo). Se prefiere especialmente la presencia de sustituyentes aceptores de electrones. Los sustituyentes preferidos incluyen, por ejemplo,  $-CN$ ,  $-NO_2$ ,  $-OR^4$ ,  $-OCOR^4$ ,  $-SR^4$ ,  $-NHCOR^4$ ,  $-NR.COR^4$ ,  $-NHOH$  y  $-NR^4COR^4$ . Preferiblemente, sin embargo, el grupo fenilo Ph está sin sustituir.

40 Cuando Y representa el grupo III, se forma un único puente de carbono entre el enlazador  $Lk^3$  y dos átomos de azufre derivados de un enlace disulfuro en la proteína de unión Ab, y cuando Y representa el grupo IV, la naturaleza de los grupos A y B determinan la longitud del puente que se forma entre el enlazador  $Lk^3$  y dos átomos de azufre derivados de un enlace disulfuro en la proteína de unión Ab. Preferiblemente, se forma un puente de 3 carbonos, es decir, preferiblemente Y tiene la fórmula:



55 Como se ha mencionado anteriormente, los conjugados que contienen más de un resto de auristatina pueden tener ventajas. La presencia de más de un resto de auristatina puede conseguirse de varias maneras diferentes, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente mediante el uso de un PEG ramificado, mediante el uso de un grupo multivalente  $Lk^2$ , o mediante el uso de un grupo multivalente  $Lk^1$ . Sin embargo, también puede conseguirse uniendo

más de un enlazador  $Lk^3$  a la proteína de unión Ab. En general, los anticuerpos normales de longitud completa tienen 4 enlaces disulfuro de cadena intermedia (cadena pesada-pesada o cadena pesada-ligera para anticuerpos IgG1 enteros), y cualquiera o todos estos pueden estar puenteados por el enlazador  $Lk^3$  de acuerdo con la invención. También se prevé que uno o más enlaces disulfuro intra-cadena en el anticuerpo puedan estar puenteados por un enlazador  $Lk^3$ . Cuando más de un grupo de conjugación está presente, n es mayor de 1. n puede ser, por ejemplo, 2, 3 o 4.

Como alternativa o adicionalmente, uno o más restos de auristatina adicionales pueden estar presentes unidos a través de un enlazador  $Lk^1$  a P o, cuando P es un enlace, directamente a  $Lk^2$ . En este caso, m es mayor de 1, por ejemplo 2, 3 o 4, hasta un máximo de 10. Si está presente más de un enlazador  $Lk^1$ , éstos pueden ser iguales entre sí, o diferentes.

Como alternativa o adicionalmente, uno o más restos de auristatina adicionales pueden estar presentes unidos a un enlazador multivalente  $Lk^1$ . En este caso, q es mayor de 1, por ejemplo 2, 3 o 4, hasta un máximo de 10.

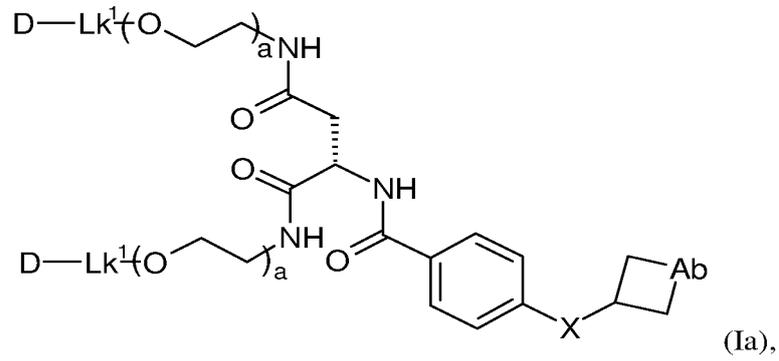
Se prevé que los conjugados de la presente invención pueden llevar hasta 10 grupos D (restos de auristatina). Cuando se desea que el conjugado de fórmula I contenga más de un grupo D (es decir, más de un resto de auristatina), esto puede conseguirse en una cualquiera de varias maneras. Por ejemplo, se pueden unir múltiples grupos  $((D_q-Lk^1)_m-P)_p-Lk^2-Lk^3$  a un único anticuerpo (es decir, n es de 2 a s). Este modo de unión forma una manera preferida de proporcionar conjugados que contengan más de un grupo D. Una segunda forma preferida de proporcionar conjugados que contengan más de un grupo D es mediante el uso de un enlazador multivalente  $Lk^1$ , por ejemplo, un enlazador  $Lk^1$  que contiene uno o más residuos de aspartato y/o glutamato o similares como se ha descrito anteriormente (como por ejemplo en las fórmulas VI, VIIa y VIIb), permitiendo la presencia de múltiples grupos D (es decir, q es de 2 a 10). Se cree que los conjugados en los que  $Lk^1$  es un enlazador multivalente, especialmente uno que incluye la fórmula VI anterior,  $p = 1$ ,  $q = 2$ ,  $m = 1$  y  $Lk^2$  es un enlace, son particularmente eficaces, y dichos conjugados forman una realización preferida de la invención.

Como alternativa o adicionalmente, cuando  $Lk^2$  es un grupo que consiste en 1 a 9 residuos de aspartato y/o glutamato, pueden unirse múltiples grupos  $((D_q-Lk^1)_m-P)$  en diferentes posiciones en el grupo  $Lk^2$  (es decir, p es de 2 a 10), mediante unión amida de cada grupo a través de un resto amina con un grupo carboxilo de un residuo de aspartato o glutamato en el grupo  $Lk^2$ . Cuando  $P^1$  contiene al menos una unidad de etileno o etilenglicol y también contiene al menos una unidad de ramificación, como alternativa o adicionalmente, múltiples grupos  $(D_q-Lk^1)$  pueden unirse en diferentes posiciones en el grupo  $P^1$  (es decir m es de 2 a 10).

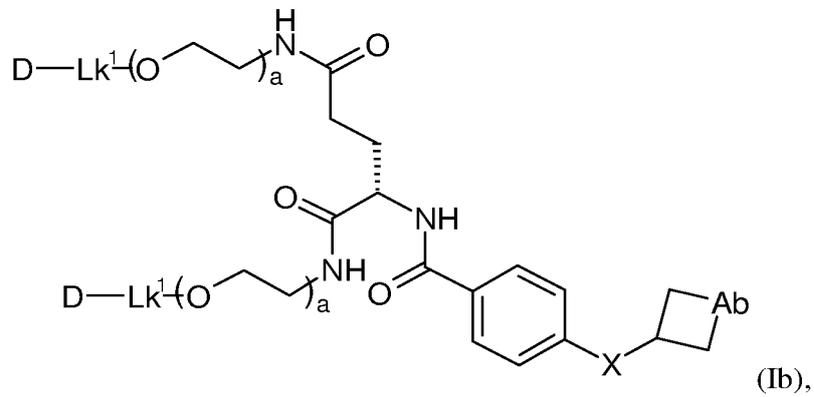
Los conjugados que tienen combinaciones de lo anterior se incluyen también por la invención. A modo de ejemplo, un conjugado puede contener un grupo Ab unido a dos grupos  $((D-Lk^1)_m-P)_p-Lk^2-Lk^3$  en los que, para cada uno de estos grupos  $((D-Lk^1)_m-P)_p-Lk^2-Lk^3$ ,  $Lk^2$  es un residuo de aspartato o glutamato unido a dos grupos  $(D-Lk^1)_m-P$ , y en los que, para cada uno de los grupos  $(D-Lk^1)_m-P$ , P es  $-P^1-NH-$  en la que  $P^1$  contiene al menos una unidad de etileno o etilenglicol y también contiene al menos una unidad de ramificación, de manera que, en total, están presentes 8 grupos  $D-Lk^1$  en el conjugado. A modo de ejemplo adicional, un conjugado puede contener un grupo Ab unido a dos grupos  $((D-Lk^1)_m-P)_p-Lk^2-Lk^3$  en los que, para cada uno de los grupos  $((D-Lk^1)_m-P)_p-Lk^2-Lk^3$ ,  $Lk^2$  es un enlace, P es  $-P^1-NH-$  en la que  $P^1$  contiene al menos una unidad de etileno o etilenglicol y también contiene al menos una unidad de ramificación, y cada  $Lk^1$  contiene un residuo de aspartato o glutamato o similar unido a dos grupos D, de manera que están presentes en total 8 grupos  $D-Lk^1$  en el conjugado.

También pueden estar presentes diferentes grupos  $Lk^3$ ,  $Lk^2$ , P,  $Lk^1$  y D en el mismo conjugado, por ejemplo, cuando un conjugado contiene un grupo Ab unido a dos grupos  $((D-Lk^1)_m-P)_p-Lk^2-Lk^3$ , en uno de los grupos  $((D-Lk^1)_m-P)_p-Lk^2-Lk^3$ ,  $Lk^2$  puede ser un enlace, y en el otro de los grupos  $((D-Lk^1)_m-P)_p-Lk^2-Lk^3$ ,  $Lk^2$  puede ser un residuo de aspartato o glutamato. De forma similar, cuando un conjugado contiene múltiples grupos  $(D-Lk^1)_m-P$  unidos a un grupo  $Lk^2$ , para uno de los grupos P puede ser un enlace, y para otro de los grupos P puede ser  $-P^1-NH-$ .

En su realización más sencilla, la invención se refiere a conjugados que contienen un único resto de auristatina ( $n = m = q = p = 1$ ). Los conjugados pueden contener hasta 10 restos de auristatina, por ejemplo, hasta 8 restos de auristatina. Por ejemplo, pueden tener hasta 4, por ejemplo 1, 2, 3 o 4, restos de auristatina. Cuando están presentes dos grupos D, estos pueden estar, por ejemplo, en conjugados de las fórmulas:

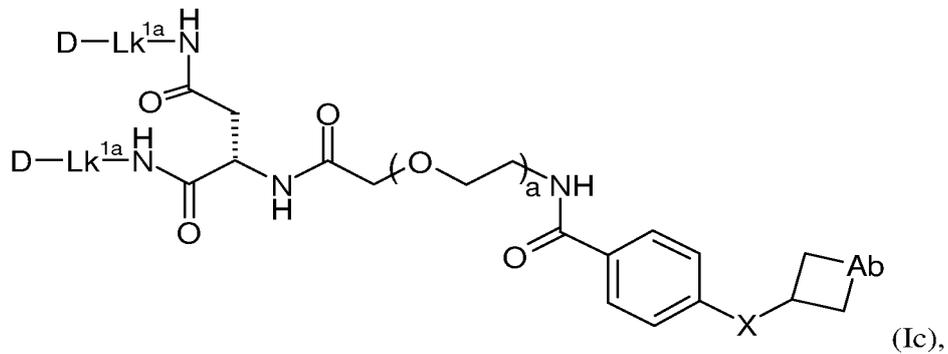


o

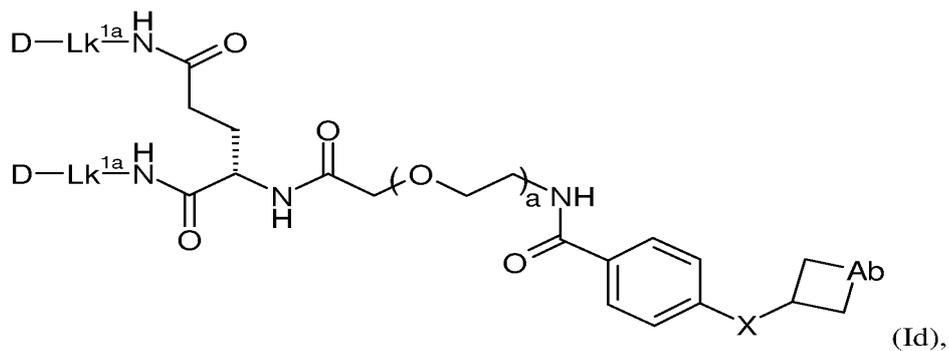


en las que Lk<sup>1</sup> comprende preferiblemente un grupo de fórmula (Va) como se ha descrito anteriormente.

- 5 Como alternativa, cuando están presentes dos grupos D, por ejemplo, estos pueden estar en conjugados de las fórmulas:



o



- 10 en las que Lk<sup>1a</sup> comprende preferiblemente un grupo de fórmula (V) como se ha descrito anteriormente.

Las fórmulas anteriores muestran la unión de X a través de uno de los enlaces disulfuro presentes en Ab. Los anticuerpos pueden contener hasta 4 enlaces disulfuro de cadena intermedia, y si cada uno de estos enlaces está puentado por un reactivo que lleva una única molécula de auristatina, el conjugado resultante tendrá una relación fármaco:anticuerpo (DAR) de 4. Si un reactivo que lleva dos moléculas de auristatina se utiliza para puentear los 4 enlaces disulfuro, por ejemplo, un reactivo que lleva dos cadenas PE o PEG o que tiene una cadena ramificada de PE o PEG, o que tiene un enlazador ramificado Lk<sup>1</sup>, entonces la DAR será 8. Los conjugados que tienen tales DAR altas pueden tener ventajas clínicas significativas. Los conjugados de las fórmulas anteriores la-le, pero en las que Ab lleva 2, 3 o, especialmente, 4 copias del grupo ~X-, forman una realización preferida de la invención.

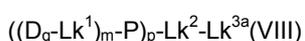
Por conveniencia, la expresión "proteína de unión" se usa a lo largo de esta memoria descriptiva para incluir tanto proteínas de unión como péptidos, y excepto cuando el contexto requiera específicamente otra cosa, debe entenderse que incluye péptidos así como proteínas. Las proteínas de unión que pueden usarse en los conjugados de la invención incluyen cualquier proteína, polipéptido o péptido que pueda servir como un agente de unión para un compañero de unión en una diana. La diana puede ser, por ejemplo, un microorganismo, un virus o una célula, por ejemplo, un cáncer o una célula inmune. Por lo tanto, la proteína de unión actúa para dirigir la auristatina a la diana particular. Los ejemplos de dichas proteínas de unión incluyen anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, inmunoglobulina (Ig) y estructuras de proteínas no Ig obtenidas mediante técnicas de ingeniería de proteínas racionales o combinatorias y lectinas. Las proteínas de unión más comunes utilizadas en los conjugados proteína-fármaco son anticuerpos, y cualquier referencia a una proteína de unión o al grupo Ab, debe entenderse que incluye una referencia específica a un anticuerpo, excepto cuando el contexto requiera específicamente otra cosa.

A lo largo de esta memoria descriptiva, el término "anticuerpo" debe entenderse que significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a un antígeno diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinación de los mismos a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno siempre y cuando los anticuerpos exhiban la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), en base a la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades diferentes y bien conocidas y configuraciones tridimensionales. El uso de IgG1 o IgG4 es particularmente preferido.

Además, excepto cuando el contexto requiere otra cosa, el término "anticuerpo" debe entenderse que incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo que comprenden una región de unión al antígeno del anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fv, diacuerpos, minicuerpos o anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, minicuerpos compuestos de diferentes permutaciones de fragmentos scFv o diacuerpos, y opcionalmente fragmentos Fc o dominios C<sub>H</sub>, tales como proteínas de fusión scFv-Fc, scFv-Fc-scFv, Fab-scFv, (Fab'ScFv)<sub>2</sub>, scDiacuerpos, scDiacuerpo-Fc, scDiacuerpo-C<sub>H</sub>3, scFv-C<sub>H</sub>3, scFv-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3, etc. Un fragmento de anticuerpo puede producirse mediante técnicas de escisión enzimática, sintéticas o recombinantes.

Una proteína de unión puede servir como agente de unión para un receptor, antígeno u otro resto en la superficie de una diana, por ejemplo, una célula o virus asociado a una enfermedad proliferativa, autoinmune o infecciosa. Por ejemplo, la proteína de unión puede ser un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de superficie celular en una célula cancerosa. Se conocen métodos de identificación y validación de antígenos de superficie celular para el direccionamiento de anticuerpos de células cancerosas, por ejemplo, en Carter P, et al., Endocr. Relat. Cancer. 2004 Dec; 11(4): 659-87, y se encuentran actualmente en desarrollo clínico varios conjugados anticuerpo-fármaco para tratar el cáncer. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer, y marcadores tumorales de cánceres específicos, se conocen bien también en la técnica y pueden usarse. Como alternativa, la diana puede ser una célula inmune, por ejemplo, una célula que es responsable de producir anticuerpos autoinmunes, o un linfocito activado que está asociado a una enfermedad autoinmune. En otras realizaciones, la diana puede ser un microorganismo o virus asociado a una infección o enfermedad microbiana o vírica.

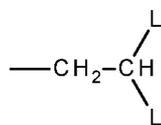
Los conjugados de la presente invención pueden prepararse reduciendo uno o más enlaces disulfuro en una proteína de unión y, posteriormente, por reacción con un reactivo de conjugación de la fórmula general:



en la que D, Lk<sup>1</sup>, P, Lk<sup>2</sup> y m, p y q tienen los significados dados para la fórmula general I, y Lk<sup>3a</sup> representa un grupo de fórmula:



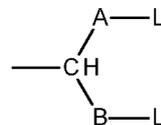
en la que Ph tiene el significado dado anteriormente,  $\text{X}^a$  representa un grupo CO, e  $\text{Y}^a$  representa un grupo:



(X),

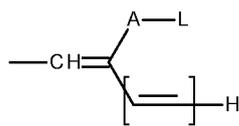


(XI),



(XII)

o



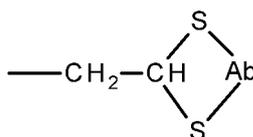
(XIII)

5

en la que A y B tienen los significados dados anteriormente, cada L representa independientemente un grupo saliente, y x representa un número entero de 1 a 4.

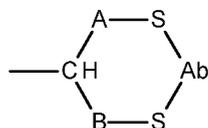
Los grupos de las fórmulas X, XI, XII y XIII anteriores son equivalentes químicos entre sí, con grupos de fórmula X y XI que conducen a un único puente de carbono a través de un enlace disulfuro del anticuerpo, y grupos de fórmula XII y XIII que conducen a puentes de carbono más largos, mostrados a continuación para el caso en el que n = 1:

10



(XIV)

o



(XV)

15

Cuando se hace reaccionar un reactivo de conjugación que contiene un grupo X o XII con un anticuerpo, la etapa inmediato en la vía de reacción es la pérdida de un grupo saliente L que conduce a un reactivo de conjugación que contiene un grupo XI o XIII, respectivamente. Por lo tanto, los reactivos de conjugación de fórmula XI o XIII se preparan *in situ* o se usan *ab initio*. Una característica clave del uso de reactivos de conjugación que contienen cualquiera de los grupos X, XI, XII o XIII, es que un grupo saliente  $\alpha$ -metileno y un doble enlace están conjugados de forma cruzada con una función aceptora de electrones que actúa como un resto activador de Michael. Si el grupo saliente es propenso a la eliminación en el reactivo multifuncional cruzado en lugar del desplazamiento directo y el grupo aceptor de electrones es un resto de activación adecuado para la reacción de Michael, entonces puede producirse la bis-alquilación intramolecular secuencial mediante reacciones consecutivas de Michael y retro Michael. El resto de salida sirve para enmascarar un doble enlace conjugado latente que no está expuesto hasta después de que se haya producido la primera alquilación y la bis-alquilación resulta de reacciones secuenciales e interactivas de Michael y retro-Michael. El grupo aceptor de electrones y el grupo saliente se seleccionan óptimamente por lo que la bis-alquilación pueda producirse mediante reacciones secuenciales de Michael y retro-Michael. También es posible preparar agentes alquilantes funcionales cruzados con enlaces múltiples adicionales conjugados con el doble enlace o entre el grupo saliente y el grupo aceptor de electrones.

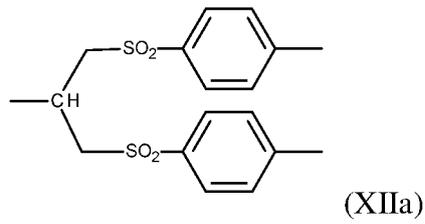
20

25

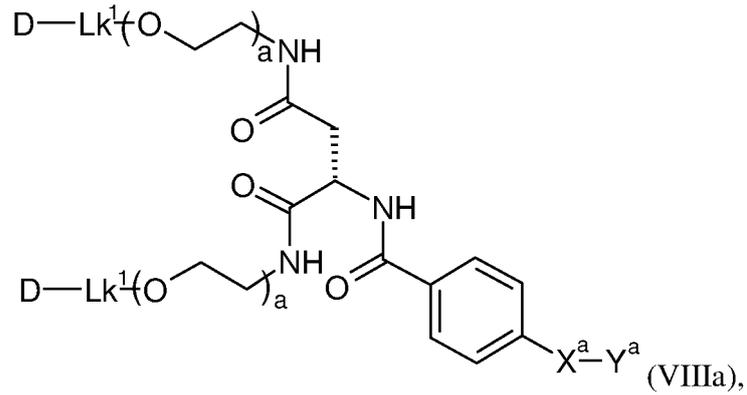
30

35

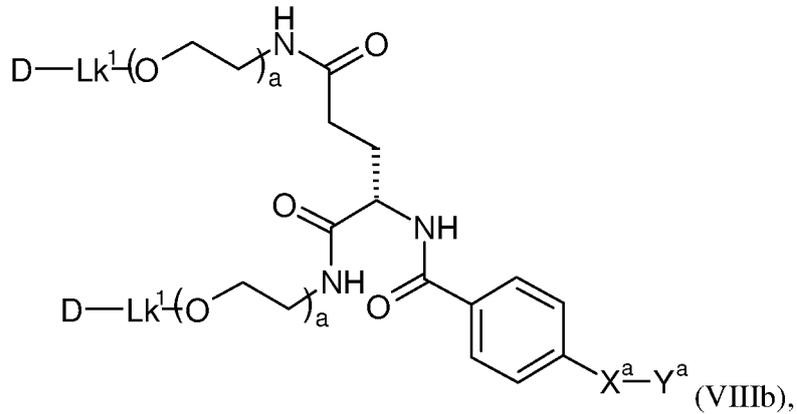
Un grupo saliente L puede representar, por ejemplo,  $-\text{SR}^4$ ,  $-\text{SO}_2\text{R}^4$ ,  $-\text{OSO}_2\text{R}^4$ ,  $-\text{N}^+\text{R}^4_3$ ,  $-\text{N}^+\text{HR}^4_2$ ,  $-\text{N}^+\text{H}_2\text{R}^4$ , halógeno, o  $-\text{O}$ , en los que  $\text{R}^4$  tiene el significado dado anteriormente, y 0 representa un grupo arilo sustituido, especialmente fenilo, que contiene al menos un sustituyente aceptor de electrones, por ejemplo  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}^4$ ,  $-\text{COH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{COR}^4$ ,  $-\text{OR}^4$ ,  $-\text{OCOR}^4$ ,  $-\text{OCO}_2\text{R}^4$ ,  $-\text{SR}^4$ ,  $-\text{SOR}^4$ ,  $-\text{SO}_2\text{R}^4$ ,  $-\text{NHCOR}^4$ ,  $-\text{NR}^4\text{COR}^4$ ,  $-\text{NHCO}_2\text{R}^4$ ,  $-\text{NR}^4\text{CO}_2\text{R}^4$ ,  $-\text{NO}$ ,  $-\text{NHOH}$ ,  $-\text{NR}^4\text{OH}$ ,  $-\text{C}=\text{N}-\text{NHCOR}^4$ ,  $-\text{C}=\text{N}-\text{NR}^4\text{COR}^4$ ,  $-\text{N}^+\text{R}^4_3$ ,  $-\text{N}^+\text{HR}^4_2$ ,  $-\text{N}^+\text{H}_2\text{R}^4$ , halógeno, especialmente cloro o, especialmente, flúor,  $-\text{C}\equiv\text{CR}^4$ ,  $-\text{C}=\text{CR}^4_2$  y  $-\text{C}=\text{CHR}^4$ , en los que cada  $\text{R}^4$  independientemente tiene uno de los significados dados anteriormente. Un grupo saliente especialmente preferido L es  $-\text{SR}^4$  o  $-\text{SO}_2\text{R}^4$ , especialmente  $-\text{SO}_2\text{R}^4$ , donde  $\text{R}^4$  representa un grupo fenilo o, especialmente, tosilo. Por lo tanto, un grupo particularmente preferido  $\text{Y}^a$  es:



Los ejemplos de reactivos de conjugación preferidos incluyen:



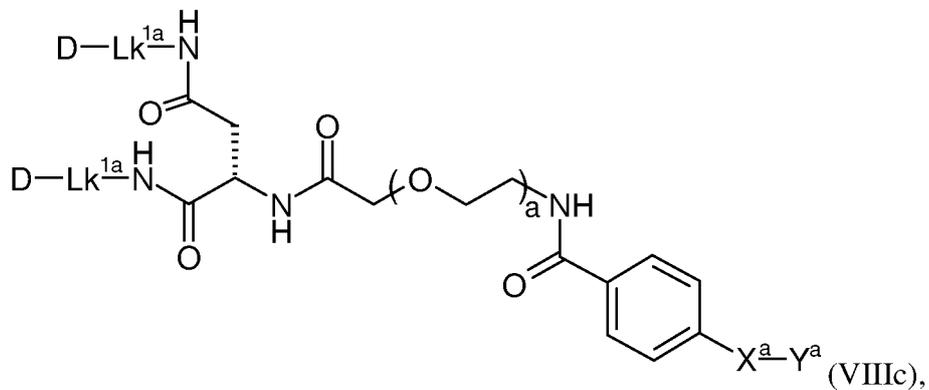
y



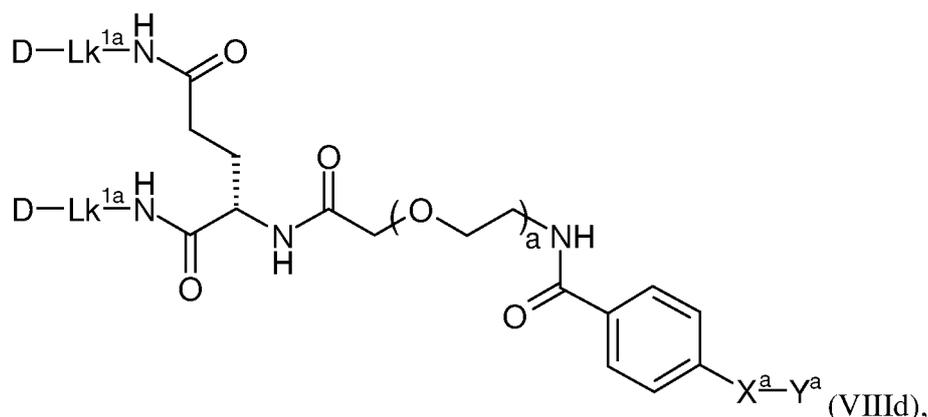
5

en los que Lk<sup>1</sup> comprende preferiblemente un grupo de fórmula (Va) como se ha descrito anteriormente, y en los que Y<sup>a</sup> es preferiblemente un grupo de fórmula (XII), especialmente en la que A y B son cada uno -CH<sub>2</sub>-.

Los ejemplos preferidos adicionales de agentes de conjugación incluyen:

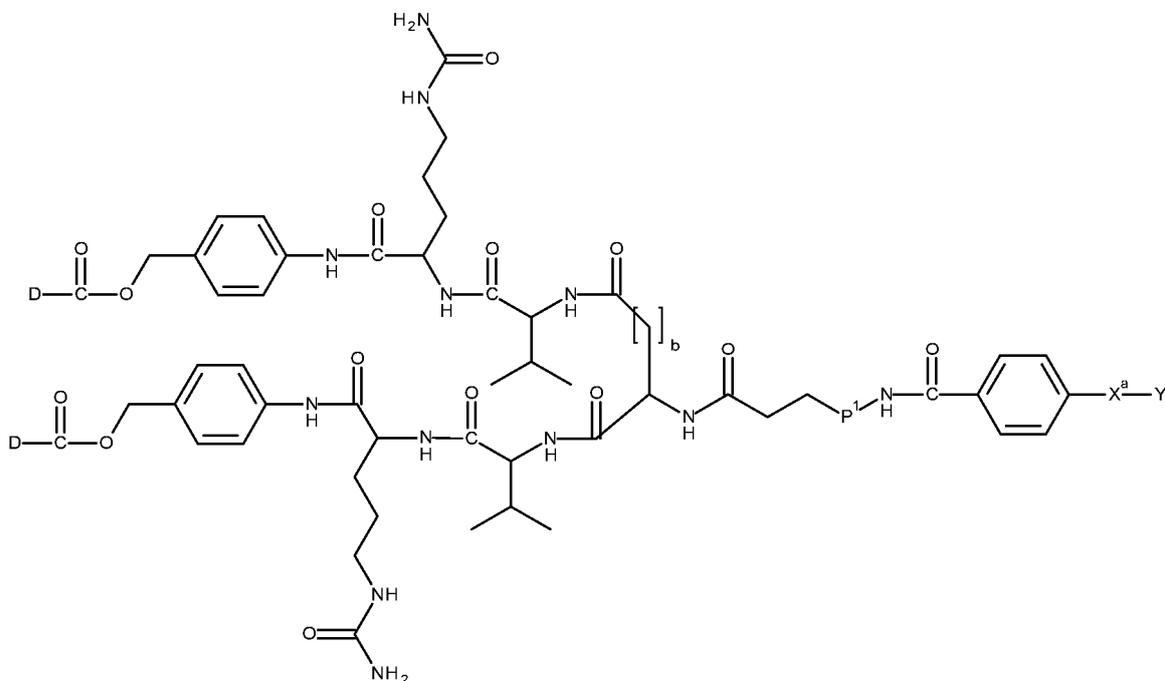


10 y



en los que Lk<sup>1</sup> comprende preferiblemente un grupo de fórmula (V) como se ha descrito anteriormente, y en los que Y<sup>a</sup> es preferiblemente un grupo de fórmula (XII), especialmente en los que A y B son cada uno -CH<sub>2</sub>-.

Aún los ejemplos preferidos adicionales de reactivos de conjugación incluyen:



5

en los que b es 1, 2 o 3, Y<sup>a</sup> es preferiblemente un grupo de fórmula (XII), especialmente en los que A y B son cada uno -CH<sub>2</sub>-. P<sup>1</sup> es preferiblemente PEG, especialmente uno de los mencionados anteriormente, y preferiblemente uno que tiene de 15 a 35 unidades de repetición -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-.

El producto inmediato del proceso de conjugación usando uno de los reactivos descritos anteriormente es un conjugado auristatina-anticuerpo en el que X representa un grupo ceto CO. Sin embargo, el proceso de la invención es reversible en las condiciones adecuadas. Esto puede ser deseable para algunas aplicaciones, por ejemplo, cuando se requiere una separación rápida de la auristatina del anticuerpo, pero para otras aplicaciones, puede ser indeseable una separación rápida. Por lo tanto, puede ser deseable estabilizar los conjugados mediante la reducción del grupo CO X para dar un grupo CH.OH X. Por consiguiente, el proceso descrito anteriormente puede comprender una etapa opcional adicional de reducción del grupo formado inicialmente CO en Lk<sup>3</sup> para dar un conjugado que tiene un grupo CH.OH X en Lk<sup>3</sup>. Es particularmente preferido el uso de un borohidruro, por ejemplo, borohidruro sódico, cianoborohidruro sódico, borohidruro potásico o triacetoxiborohidruro sódico, como agente reductor. Otros agentes reductores que se pueden usar incluyen, por ejemplo, cloruro de estaño (II), alcóxidos tales como alcóxido de aluminio e hidruro de litio y aluminio.

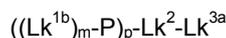
Las condiciones de reacción adecuadas para el proceso descrito anteriormente se dan en los documentos WO 2005/007197 y WO 2010/100430.

El proceso puede realizarse, por ejemplo, en un disolvente o mezcla de disolventes en la que todos los reactivos son solubles. Se puede permitir que el anticuerpo reaccione directamente con el reactivo de conjugación en un medio de reacción acuoso. Este medio de reacción también se puede tamponar, dependiendo de los requerimientos de pH del nucleófilo. El pH óptimo para la reacción será generalmente de al menos 4,5, típicamente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,5, preferiblemente aproximadamente 6,0 a 8,2. Las condiciones de reacción óptimas dependerán, por supuesto, de los reactivos específicos empleados.

Las temperaturas de reacción entre 3-37 °C son generalmente adecuadas. Las reacciones realizadas en medios orgánicos (por ejemplo, THF, acetato de etilo, acetona) se llevan a cabo típicamente a temperaturas hasta la temperatura ambiente.

La proteína de unión puede conjugarse eficazmente con el reactivo deseado usando un equivalente estequiométrico o un exceso de reactivo. El exceso de reactivo y el producto se pueden separar fácilmente durante la purificación de rutina, por ejemplo, mediante métodos de cromatografía estándar, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión de tamaño, diafiltración o, cuando está presente una etiqueta de polihistidina, por separación usando cromatografía de afinidad de metales, por ejemplo, en base a níquel o cinc. El direccionamiento de enlaces disulfuro específicos en la proteína de unión se puede llevar a cabo por métodos conocidos; por ejemplo, mediante reducción parcial de la proteína, véase, por ejemplo, Liu et al, Anal. Chem. 2010, 82, 5219-5226.

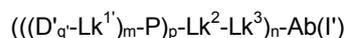
Los reactivos de conjugación de las fórmulas generales VIII anteriores se pueden preparar haciendo reaccionar una auristatina con un compuesto de fórmula general:



en la que m, P, L, p, Lk<sup>2</sup> y Lk<sup>3a</sup> tienen los significados dados para la fórmula general VIII y Lk<sup>1b</sup> es un grupo de fórmula Lk<sup>1</sup> modificado para incluir un grupo reactivo con un grupo presente en una auristatina. Típicamente, Lk<sup>1b</sup> será reactivo con el átomo de nitrógeno terminal de una monometil auristatina. Se conocen bien por el experto grupos típicos y reacciones adecuadas.

Los reactivos de conjugación de las fórmulas generales VIII son novedosos, y por lo tanto, la invención proporciona estos reactivos *per se*. En estos reactivos novedosos, los significados preferidos para Lk<sup>1</sup>, P, Lk<sup>2</sup>, m, p y q son como se han dado anteriormente para la fórmula general I. La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un conjugado auristatina-proteína de acuerdo con la invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente junto con un agente terapéutico adicional; tal conjugado para su uso en terapia, específicamente, para su uso como un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, autoinmune o infecciosa, por ejemplo cáncer; y encuentra utilidad en un método de tratamiento de un paciente que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de tal conjugado o composición farmacéutica a un paciente. Las condiciones particulares para las que la presente invención encuentra utilidad incluyen, por ejemplo, leucemia, incluyendo linfoma no Hodgkin, leucemia mielógena aguda, mieloma múltiple, leucemias linfocíticas y leucemia mielógena crónica; cáncer gástrico; cáncer de mama; cáncer de ovarios; cáncer de hígado; cáncer intestinal; cáncer de colon; cáncer renal, por ejemplo carcinoma de células renales; cáncer de pulmón, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas; melanoma; cáncer de vejiga; y sarcomas.

Como se ha mencionado anteriormente, una realización preferida de la invención se refiere a conjugados específicos que contienen más de una molécula de auristatina. Ciertos conjugados de fármaco que tienen una estructura de ramificación particular y que contienen una amplia gama de fármacos no incluidos dentro del alcance de la invención son novedosos. Dichos conjugados tienen la fórmula general:



en la que D' representa un resto de fármaco;

q' representa un número entero de 2 a 10;

Lk<sup>1</sup> representa un enlazador;

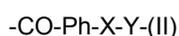
m representa un número entero de 1 a 10;

P representa un enlace o un grupo valente z -P<sup>1</sup>-NH- donde z es de 2 a 11 y P<sup>1</sup> es un grupo que contiene al menos una unidad de etileno -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- o una unidad de etilenglicol -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;

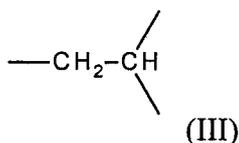
p representa un número entero de 1 a 10;

Lk<sup>2</sup> representa un enlace o un enlazador valente y donde y es de 2 a 11 y que consiste en 1 a 9 residuos de aspartato y/o glutamato;

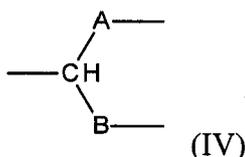
Lk<sup>3</sup> representa un enlazador de la fórmula general:



en la que Ph es un grupo fenilo opcionalmente sustituido; X representa un grupo CO o un grupo CH.OH; e Y representa un grupo de fórmula:



o



5

en los que cada uno de A y B representa un grupo alquileo o alquenileo C<sub>1-4</sub>;

Ab representa una proteína o péptido de unión capaz de unirse a un compañero de unión en una diana, estando dicha proteína de unión unida a Lk<sup>3</sup> a través de dos átomos de azufre derivados de un enlace disulfuro en la proteína o péptido de unión; y

10 n representa un número entero de 1 a s donde s es el número de enlaces disulfuro presentes en la proteína o péptido de unión antes de la conjugación en Lk<sup>3</sup>;

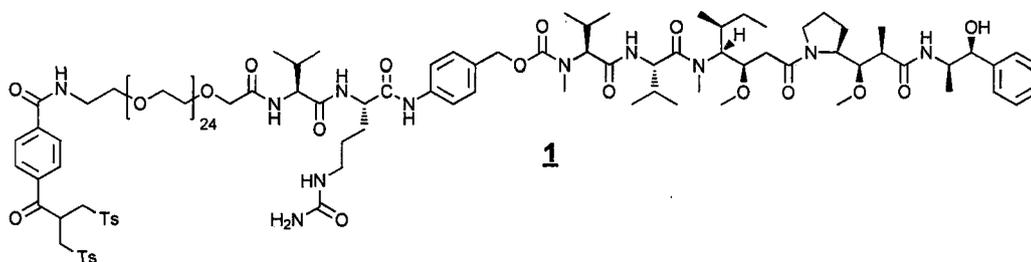
estando los significados de m, n, p, q', y z escogidos de tal forma que el conjugado contiene de 1 a 10 grupos D'.

15 Los conjugados de la presente invención demuestran varias ventajas importantes, cuya existencia no se ha predicho. En comparación con los conjugados fármaco-anticuerpo equivalentes preparados usando reactivos de maleimida, como se usa actualmente en los conjugados disponibles en el mercado, demuestran un aumento significativo de la estabilidad. Además, su método de síntesis conduce a un producto con una mejor homogeneidad con respecto a la relación fármaco-anticuerpo, en comparación con el uso de maleimida. La homogeneidad es ventajosa para las sustancias farmacológicas para la regularidad de producción de la sustancia farmacológica. Un proceso que genera un mayor rendimiento de una especie DAR individual será más barato a través de una mayor eficiencia. Un producto farmacológico de una única especie DAR producida por purificación de esa especie DAR de una mezcla heterogénea será prohibitivamente cara de producir en grandes cantidades.

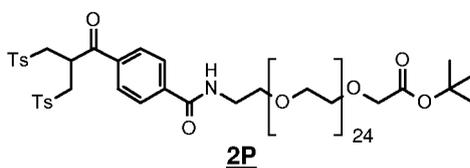
20 Además, una única especie DAR demostrará una farmacocinética, seguridad, toxicidad y tolerabilidad más predecible, dado que toda la sustancia farmacológica debe metalizarse de una manera similar, dando los mismos productos, al contrario que una sustancia DAR mixta que puede metabolizarse de forma diferente o a diferentes velocidades, dando productos descompuestos más heterogéneos.

25 Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

**Ejemplo 1: Síntesis de reactivo valina-citrulina-paraaminobencil-monometil auristatina E (val-cit-PAB-MMAE) 1 que posee 24 unidades PEG de repetición con funcionalidad bis-sulfona terminal.**

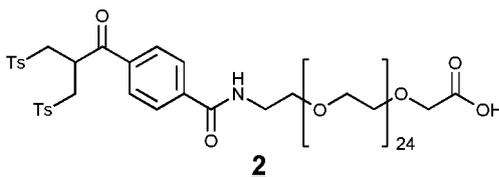


30 Etapa 1: Conjugación de N-hidroxi succinimidil éster del ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzoico (bis-sulfona) en H<sub>2</sub>N-dPEG(24)-CO-OtBu.



Una solución en tolueno (3 ml) de H<sub>2</sub>N-dPEG(24)-CO-OtBu (1,057 g, Iris Biotech) se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió de nuevo en diclorometano (25 ml). En agitación, se añadió N-hidroxi succinimidil éster del ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonyl)-metil]acetil]benzoico (1,0 g; Nature Protocols, 2006, 1(54), 2241-2252) y la solución resultante se agitó adicionalmente durante 72 h a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. Los volátiles se retiraron al vacío y el residuo sólido se disolvió en acetona caliente (30 ml) y se filtró a través de lana de algodón no absorbente. El filtrado se enfrió a -80 °C para precipitar un sólido que se aisló por centrifugación a -9 °C, durante 30 min a 4000 rpm. El sobrenadante se retiró y el proceso de precipitación/aislamiento se repitió 2 veces más. Finalmente, el sobrenadante se retiró y el sólido resultante se secó al vacío para dar el ácido protegido con bis-sulfona **2P** en forma de un sólido incoloro amorfo (976 mg, 68 %). <sup>1</sup>H RMN  $\delta_H$  (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 1,45 (9H, s, O<sup>t</sup>Bu), 2,40-2,45 (8H, m, Ts-Me y CH<sub>2</sub> COO<sup>t</sup>Bu), 3,40-3,46 (2H, m, CH<sub>2</sub>-Ts), 3,52-3,66 (m, PEG y CH<sub>2</sub>-Ts), 4,27 (1H, c, J 6,3, CH-COAr), 7,30 (4H, d, J 8,3, Ts), 7,58 (2H, d, J 8,6, Ar), 7,63 (4H, d, J 8,3, Ts), 7,75 (2H, d, J 8,6, Ar).

Etapa 2: Eliminación del grupo de protección terc-butilo:

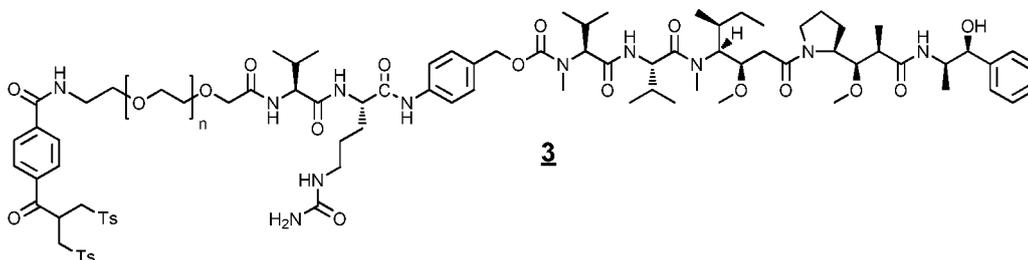


A una solución agitada del producto de la etapa 1 (976 mg) en diclorometano (4 ml) se añadió el ácido trifluoroacético (4 ml) y la solución resultante se agitó durante 2 h más. Después, los volátiles se eliminaron al vacío y el residuo se disolvió en acetona caliente (30 ml). El producto se aisló por precipitación en acetona como se describe en la etapa 1 para proporcionar el producto **2** en forma de un polvo de color blanco (816 mg, 85 %). <sup>1</sup>H RMN  $\delta_H$  (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 2,42 (6H, s, Ts-Me), 2,52 (2H, t, J 6,1, CH<sub>2</sub>-COOH), 3,42 (4H, dd, J 6,3 & 14,5, CH<sub>2</sub>-Ts), 3,50-3,64 (m, PEG), 3,68-3,73 (4H, m, PEG), 4,23-4,31 (1H, m, CH-COAr), 7,29 (2H, d, J 8,1, Ar), 7,55-7,65 (6H, m, Ar and Ts), 7,77 (2H, d, J 8,2, Ar)

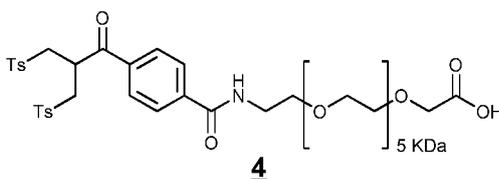
Etapa 3: Conjugación de H<sub>2</sub>N-val-cit-PAB-MMAE en bis-sulfona PEGilada terminada en ácido **2**

Se añadió N-metil morfolina (7,5 mg) a una solución agitada de bis-sulfona-PEG-COOH (45 mg) y HATU (13 mg) en diclorometano-dimetilformamida (85:15 v/v, 6 ml). Después de agitar durante 30 min a temperatura ambiente, se añadió H<sub>2</sub>N-val-cit-PAB-MMAE (38 mg, Concartis, preparado como en el documento WO 2005/081711) y la mezcla se agitó adicionalmente durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con HCl 1 M, NaHCO<sub>3</sub> acuoso al 10 % p/v y salmuera y después se secó con MgSO<sub>4</sub>. El material en bruto se purificó adicionalmente por cromatografía en columna eluyendo con diclorometano-metanol (90:10 v/v), el disolvente se retiró al vacío y el producto de bis-sulfona-PEG(24)-MMAE **1** se aisló en forma de un sólido incoloro transparente (31 mg, 41 %) m/z M+Na 2758,5; señales de diagnóstico para <sup>1</sup>H RMN  $\delta_H$  (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 0,60-0,99 (m, cadenas laterales alifáticas), 2,43 (s, Me-Ts), 3,36-3,66 (m, PEG), 7,15-7,28 (m, Ar), 7,31 (d, J 8,3, Ar), 7,54-7,62 (m, Ar), 7,79 (d, J 8,3, Ar).

**Ejemplo 2: Síntesis de reactivo de monometil auristatina E (MMAE) **3** que posee un PEG de 5 kDa con funcionalidad bis-sulfona terminal**



Etapa 1: Conjugación de N-hidroxi succinimidil éster del ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonyl)-metil]acetil]benzoico (bis-sulfona) en HCl.H<sub>2</sub>N-PEG-COOH **4** 5 kDa



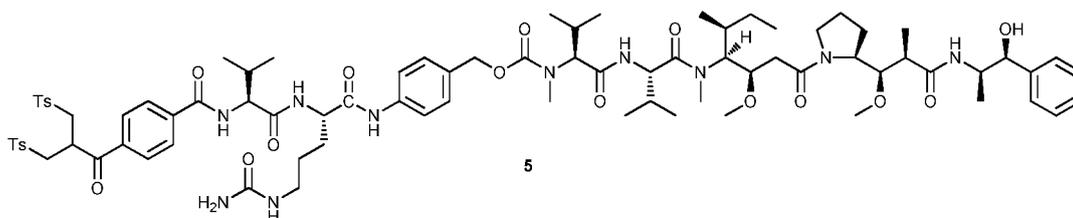
Se añadió N-metil morfolina (0,004 ml) a una solución agitada de HCl.H<sub>2</sub>N-PEG-COOH 5 kDa (100 mg, Iris Biotech)

y N-hidroxi succinimidil éster del ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzoico (49 mg) en diclorometano (5 ml) y se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de argón durante 48 h. Los volátiles se retiraron al vacío y el residuo sólido se disolvió en acetona caliente (7 ml) y se filtró a través de lana de algodón no absorbente. El filtrado se enfrió a -80 °C para precipitar un sólido que se aisló por centrifugación a -9 °C, durante 30 min a 4000 rpm. El sobrenadante se retiró y el proceso de precipitación/aislamiento se repitió 2 veces más. Finalmente, el sobrenadante se retiró y el sólido resultante se secó al vacío para dar el reactivo de PEG 5 kDa **4** en forma de un polvo de color blanco (90 mg, 80 %) <sup>1</sup>H RMN  $\delta_H$  (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 2,36 (2H, t, J 7,0, CH<sub>2</sub>-COOH), 2,42 (6H, s, Ts-Me), 3,40-3,75 (m, PEG y CH<sub>2</sub>-Ts), 4,24-4,28 (1H, m, CH-COAr), 7,30 (4H, d, J 8,2, Ts), 7,57 (2H, d, J 8,3, Ar), 7,62 (4H, d, J 8,2, Ts), 7,77 (2H, d, J 8,3, Ar)

10 Etapa 2: Conjugación de H<sub>2</sub>N-val-cit-PAB-MMAE en bis-sulfona PEGilada de 5 kDa terminada en ácido de la Etapa 1.

15 Se añadió HATU (5 mg) a una suspensión agitada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 mg), H<sub>2</sub>N-val-cit-PAB-MMAE (11 mg) y el producto de la Etapa 1 (35 mg) en una mezcla anhidra de diclorometano y DMF (1 ml) y se agitó durante 2 días en una atmósfera de argón. El diclorometano se retiró al vacío y la mezcla de reacción se purificó por precipitación en acetona fría (3 x 5 ml) de manera análoga al método descrito en Etapa 1. El sólido se secó al vacío para proporcionar bis-sulfona-PEG (5 kDa)-MMAE **3** en forma de un sólido incoloro amorfo (42 mg, 95 %). Señales de diagnóstico <sup>1</sup>H RMN  $\delta_H$  (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 0,65-0,99 (m, cadenas laterales alifáticas), 3,48-3,71 (m, PEG), 7,15-7,34 (m, Ar), 7,62-7,69 (m, Ar) 7,72 (d, J 8,3, Ar), 7,81 (d, J 8,3, Ar).

20 **Ejemplo 3: Síntesis del reactivo de monometil auristatina E (MMAE) **5** directamente unido a una funcionalidad bis-sulfona terminal**



Etapa 1: Conjugación de N-hidroxi succinimidil éster del ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzoico (bis-sulfona) en NH<sub>2</sub>-val-cit-PAB-MMAE.

25 Se añadieron N-hidroxi succinimidil éster del ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzoico (35 mg) a una suspensión agitada de carbonato sódico (3 mg) y NH<sub>2</sub>-val-cit-PAB-MMAE (35 mg) en una mezcla anhidra de DCM-DMF (3:1, 1 ml) y se agitó durante 24 horas en una atmósfera de argón. El producto se purificó por cromatografía en columna eluyendo con diclorometano-metanol (95:5, v/v) para dar la bis-sulfona-MMAE **5** en forma de un sólido incoloro amorfo (22 mg, 33 %) m/z M+Na 1629,5; Señales de diagnóstico <sup>1</sup>H RMN  $\delta_H$  (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 0,56-0,97 (m, cadenas laterales alifáticas) 2,36 (s, Me-Ts), 7,10-7,32 (m, Ar), 7,48-7,64 (m, Ar), 7,68 (d, J 8,22, Ar), 7,74-7,90 (m, Ar).

#### Ejemplo 4: Preparación de conjugados anticuerpo-fármaco de variantes

35 Se crearon dos variantes de anticuerpo, cada con un único enlace disulfuro de cadena pesada intermedia, por mutagénesis dirigida a sitio basada en PCR de la secuencia de anticuerpo parental para demostrar que los conjugados de anticuerpo puede producirse a altos niveles de homogeneidad, y con una baja DAR promedio. Estas variantes de anticuerpo y el anticuerpo parental se hicieron reaccionar con un reactivo de conjugación (Bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE **1**) preparado de acuerdo con Ejemplo 1, que forma un puente entre dos residuos de cisteína derivados de un enlace disulfuro.

#### Preparación del anticuerpo parental y variantes de anticuerpos (IgGC226S e IgGC229S).

40 La construcción de la secuencia de ADN del anticuerpo parental, que cosifica una variante de anticuerpo monoclonal del receptor anti-Her2 humanizado (trastuzumab) generado en base a la estructura IgG1( $\kappa$ ) humana, se ha descrito previamente en Carter P. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89, 4285-4289 (1992), donde el anticuerpo se denomina como humAb4D5-8. Para los propósitos de los presentes experimentos, los aminoácidos en las posiciones 359 y 361 de la secuencia aminoácida de cadena pesada se reemplazaron con Asp y Leu, respectivamente (E359D y M361 I). Las secuencias aminoácidas de cadena ligera y pesada del anticuerpo parental usadas en los presentes experimentos también se muestran en el presente documento por las SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente. Dos de las cisteínas en la región bisagra del anticuerpo parental (secuencia de región bisagra: PKSCDKTHTCPPCP) forman enlaces disulfuro de cadena intermedia entre las dos cadenas pesadas del anticuerpo. Estos residuos de cisteína corresponden a las posiciones 226 y 229 de IgG1 de acuerdo con el sistema de numeración de índice de la UE, y son los residuos 229 y 232 de la SEQ ID NO: 2.

50 Las dos variantes de anticuerpo diseñadas (IgGC226S y IgGC229S) se crearon por mutagénesis dirigida a sitio

5 basada en PCR de la secuencia de cadena pesada de anticuerpo parental para sustituir uno de los residuos de cisteína de cadena pesada intermedia en la región bisagra con el aminoácido Ser. La metodología de PCR utilizada fue la extensión de superposición de cebadores, como se describe por Ho et al. Gene, 77 (1989) 51-59, para generar una modificación en la secuencia de región bisagra. Los oligonucleótidos de cebador de PCR se diseñaron para incorporar cambios nucleotídicos en la secuencia codificante del anticuerpo objeto. En la variante Cys226Ser, el cambio de codón fue de TGC (Cys) a AGC (Ser). En la variante Cys229Ser, el cambio de codón fue de TGC (Cys) a AGT (Ser). La nueva secuencia se clonó de nuevo en el vector de expresión de cadena pesada, incluyendo otras porciones de la cadena pesada. La construcción final (después de la mutagénesis) se verificó mediante secuenciación completa del inserto.

10 La construcción de cadena pesada recién generada se cotransfectó con la construcción de cadena ligera correspondiente en células HEK293 usando polietilenimina (PEI), expresada en un cultivo transitorio de 6 días, y se purificó mediante una combinación de Proteína A y Cromatografía de Exclusión de Tamaño, basada en el protocolo de "Transient Expression in HEK293-EBNA1 Cells", Capítulo 12, en Expression Systems (eds. Dyson y Durocher). Scion Publishing Ltd., Oxfordshire, Reino Unido, 2007.

15 Conjugación de Bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE 1 en el anticuerpo parental y las variantes de anticuerpo.

20 La conjugación de las variantes de anticuerpo con 1, 1,5 o 2 equivalentes del reactivo de conjugación polimérica Bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE 1 por enlace disulfuro de cadena intermedia se realizó después de la reducción del anticuerpo. Las reacciones de reducción se realizaron a una concentración de anticuerpo de 4,7 mg/ml usando DTT 10 mM durante 1 h, a 22 °C o 40 °C. Se realizó intercambio de tampón para cada variante de anticuerpo para retirar el exceso de reductante. El reactivo de conjugación polimérica se preparó en acetonitrilo ac. al 50 % a pH 8 inmediatamente antes de la conjugación. Las concentraciones de anticuerpo durante la conjugación fueron 3 mg/ml y las reacciones se realizaron durante una noche (16 h), a 40 °C o 22 °C. Las condiciones de reacción para las reacciones de conjugación se resumen en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Condiciones de conjugación.

	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3	Reacción 4	Reacción 5	Reacción 6
<b>mAb</b>	IgGC226S	IgGC226S	IgGC226S	IgGC226S	IgGC226S	IgGC226S
<b>Equiv. de reactivo por S-S</b>	1 equiv.	1,5 equiv.	2 equiv.	1 equiv.	1,5 equiv.	2 equiv.
<b>Temp.°C</b>	40	40	40	22	22	22
	Reacción 7	Reacción 8	Reacción 9	Reacción 10	Reacción 11	Reacción 12
<b>mAb</b>	IgGC229S	IgGC229S	IgGC229S	IgGC229S	IgGC229S	IgGC229S
<b>Equiv. de reactivo por S-S</b>	1 equiv.	1,5 equiv.	2 equiv.	1 equiv.	1,5 equiv.	2 equiv.
<b>Temp.°C</b>	40	40	40	22	22	22

25 La variante "IgGC226S" tiene una sustitución de Cys a Ser en la posición 226 y, por lo tanto, un único enlace de disulfuro de cadena pesada intermedia en la posición 229. La variante "IgGC229S" tiene una sustitución de Cys a Ser en la posición 229 y, por lo tanto, un único enlace disulfuro de cadena pesada intermedia en la posición 226.

30 Después del intercambio de tampón, cada reacción se analizó por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para determinar la estequiometría de la carga del fármaco usando el % de área de los picos a 280 nm, como se ha descrito anteriormente. En la Tabla 2 se muestran la relación de fármaco-anticuerpo (DAR) media y la distribución de las especies conjugadas de fármaco (DAR 1-3) de los conjugados anticuerpo-fármaco producidos.

Tabla 2: DAR media y distribución de especies para los conjugados IgGC226S (reacciones 1 a 6) e IgGC229S (reacciones 7 a 12)-f.

Reacción	DAR promedio	DAR 1-3	Reacción	DAR promedio	DAR 1-3
1	1,41	80 %	7	1,43	78 %
2	1,99	89 %	8	1,76	83 %

3	2,42	87 %	9	2,65	76 %
4	1,33	79 %	10	1,26	76 %
5	1,96	90 %	11	2,11	88 %
6	2,40	89 %	12	2,50	83 %

Como se muestra por los datos en la Tabla 2, los anticuerpos pueden conjugarse eficazmente a altos niveles de homogeneidad, y con una baja DAR promedio. Los conjugados anticuerpo-fármaco con una baja DAR promedio tienen varias propiedades beneficiosas, incluyendo reducción de la velocidad de depuración, mayor índice terapéutico y toxicidad reducida a diferencia de los conjugados con mayor DAR promedio.

#### Ejemplo 5: Análisis de la distribución de DAR

En el Ejemplo 4, se obtuvo la menor DAR promedio para las variantes de disulfuro de bisagra individual al usar 1 equivalente del reactivo de conjugación polimérica por enlace disulfuro de cadena intermedia, tanto a 40 °C (reacciones 1 y 7) como a 22 °C (reacciones 4 y 10). Para comparar estos resultados con los que pueden obtenerse usando el anticuerpo parental, el anticuerpo parental se conjugó usando 1 equivalente del reactivo de conjugación polimérica por enlace disulfuro usando las condiciones expuestas en el Ejemplo 4.

La DAR promedio para el anticuerpo parental, IgGC226S e IgGC229S se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3:

Temp. de conjugación	mAb parental	IgGC226S	IgGC229S
40 °C	1,91	1,41	1,43
22 °C	1,89	1,33	1,26

Como se muestra por los datos en la Tabla 3, la DAR promedio para el anticuerpo parental fue significativamente mayor que para las variantes de disulfuro de bisagra individual IgGC226S e IgGC229S, a 40 °C o a 22 °C.

Las curvas de distribución de las especies conjugadas anticuerpo-fármaco producidas por las reacciones de conjugación también se analizaron para determinar la distribución de DAR. Además de la DAR media inferior, se puede observar en la figura 1 (conjugación a 40 °C) y la figura 2 (conjugación a 22 °C) que el proceso produce conjugados anticuerpo-fármaco (IgGC226S e IgGC229S) que tienen una heterogeneidad reducida y un rendimiento mejorado que los producidos usando el anticuerpo parental. Los conjugados anticuerpo-fármaco que tienen una homogeneidad mejorada requieren menos purificación que mezclas de estequiometría variable, y muestran una toxicidad reducida y/o una farmacocinética mejorada y, por lo tanto, una eficacia mejorada debido a la ausencia de especies de carga de fármaco alta.

#### Ejemplo 6: Comparación de la estabilidad en suero artificial de conjugados anticuerpo-fármaco generados a partir de bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE1 y de un reactivo a base de maleimida comparable.

Se prepararon cuatro conjugados trastuzumab-MMAE. Se prepararon dos conjugados a partir de bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE 1 (Ejemplo 1) para dar un conjugado DAR-2 y un conjugado DAR44 después de la purificación, usando el anticuerpo trastuzumab (Herceptin®). Los dos conjugados restantes se prepararon a partir de un reactivo a base de maleimida comparable (mal-val-cit-PAB-MMAE, preparado de una manera similar a 1 a partir de H<sub>2</sub>N-val-cit-PAB-MMAE) para dar los conjugados purificados DAR-2 y DAR-4.

Cada uno de los cuatro conjugados se preparó como 1 mg/ml de soluciones en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, que contenía albúmina sérica humana a una concentración de 20 mg/ml. Se añadió azida sódica (concentración final 1 mM) y después las mezclas se dividieron en 4 alícuotas iguales. Una alícuota se congeló inmediatamente a -80 °C. Las alícuotas restantes se mantuvieron a 37 °C. Las alícuotas a 37 °C se retiraron después de 24, 48 y 120 h y se transfirieron a un congelador a -80 °C. Después del punto temporal final, las mezclas se analizaron por cromatografía de interacción hidrófoba analítica usando una columna ProPac® 2,1 mm x 100 mm HIC-10 (Fisher Scientific). El método consistió en un gradiente lineal de tampón A al 100 % (fosfato sódico 50 mM pH 7,0, sulfato de amonio 1,5 M) con respecto a tampón B al 100 % (fosfato sódico 50 mM pH 7,0, isopropanol al 20 %) en 50 min. El caudal era de 1 ml/min y la temperatura se ajustó a 30 °C. La detección se realizó siguiendo una absorción UV a 248 y 280 nm. La relación fármaco-anticuerpo media para cada muestra se determinó y se representó frente al tiempo de incubación. Los resultados se muestran en la figura 3. En la figura 3, no se observa ningún descenso significativo en la relación fármaco-anticuerpo para los conjugados de DAR-2 y DAR-4 preparados con el reactivo bis-sulfona **1**, lo que significa que los conjugados son estables con respecto a la incubación en suero

artificial. Sin embargo, para los conjugados a base de maleimida se observan descensos significativos en la distribución de DAR en el tiempo.

#### **Ejemplo 7: Estabilidad en suero agotado en IgG**

5 Se prepararon conjugados trastuzumab-MMAE a partir del reactivo bis-sulfona **1** o el reactivo de maleimida comparable (Ejemplo 6), ambos conjugados se purificaron para dar cuatro moléculas de fármaco cargadas por anticuerpo (DAR 4). Los conjugados se mezclaron con suero agotado en IgG (soluciones BBI, SF142-2) a una concentración final de 1 mg/ml de conjugado. Se añadió azida sódica (concentración final 1 mM) y después las mezclas se dividieron en alícuotas. Dos alícuotas se congelaron inmediatamente a -80 °C. Las alícuotas restantes se mantuvieron a 37 °C y después de 120 h, se transfirieron dos alícuotas a un congelador de -80 °C hasta el análisis. 10 Las alícuotas congeladas se analizaron por cromatografía de interacción hidrófoba analítica usando el método descrito en el Ejemplo 6 para una columna ProPac® 2,1 mm x 100 mm HIC-10 (Fisher Scientific).

Los cromatogramas HIC para los conjugados incubados en suero agotado en IgG se muestran en la figura 4. Tanto para los conjugados bis-sulfona como maleimida, se observa una serie de picos mayores eluyendo entre 30 y 55 minutos. En el tiempo cero, el conjugado de bis-sulfona se observa como un pico eluyendo a 52,2 min (pico 1). 15 No hay cambios significativos en este pico después de 120 h lo que indica que el conjugado no se ha degradado durante el estudio. Sin embargo, para el conjugado de DAR 4 de maleimida, que se observa como un pico eluyendo a 49,1 min (pico 1) en el tiempo cero, el tamaño del pico disminuye significativamente después de 120 h, lo que indica que el conjugado se ha degradado. Se observan nuevos picos en el cromatograma de 120 h para el conjugado de maleimida a 44,8 min (pico 2), 40,9 min (pico 3) y 34,0 min (pico 4), que eluyen con los mismos 20 tiempos de retención que los estándares de DAR-3, DAR22 y mAb libre, respectivamente, demostrando que el conjugado de maleimida está experimentando pérdida de fármaco con el tiempo.

#### **Ejemplo 8: Conjugación de bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE **1** en un anticuerpo con alto rendimiento de DAR 4**

25 A una solución de trastuzumab (0,768 ml a 5,2 mg/ml en fosfato sódico 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 20 mM) se le añadió una solución de TCEP 5 mM (0,032 ml) y la mezcla resultante se incubó a 40 °C durante 1 h. El anticuerpo tratado con TCEP se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó a 4,44 mg/ml con fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 NaCl 150 mM y EDTA 20 mM. Después, se añadió una solución de solución de bis-sulfona-dPEG(24u)-val-cit-PAB-MMAE (0,100 ml, 4,4 mg/ml) en MeCN al 50 % (v/v) y fosfato sódico 50 % (v/v) 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y EDTA 20 mM a la solución de anticuerpo. La mezcla de reacción de conjugación resultante se mezcló y se incubó a 22 °C durante 22 h. Después de 22 h, se añadió una mezcla 50 mM de *N*-acetil-L-cisteína (0,064 ml, 3,0 mM) y la mezcla resultante se incubó durante 1 h más a 22 °C. La muestra de reacción se analizó por HIC 30 analítica usando una columna TOSOH TSK-gel Butil-NPR 35 x 4,6 mm. El área para cada variante de DAR se separó, se identificó por la relación de la absorbancia UV máxima para el fármaco y el anticuerpo y el orden del pico de elución, se representó como un gráfico de barras y el resultado se muestra en la figura 5. En la figura 5, el producto principal (>73 %) es el conjugado DAR-4. 35

#### **Ejemplo 9: Análisis *in vitro* de un conjugado trastuzumab-MMAE preparado a partir del reactivo bis-sulfona-PEG(24u)-val-cit-PAB-MMAE **1****

40 Se hizo un conjugado trastuzumab-MMAE según el ejemplo 8 excepto para la escala que se aumentó a 5 mg de trastuzumab y no se incluyó la etapa de incubación de *N*-acetil-L-cisteína. La mezcla de reacción se purificó por HIC preparativa usando una columna de 1 ml rellena con resina ToyoPearl Fenil 650S conectada a un sistema de cebado AKTA y se equilibra con Tampón A: fosfato sódico 50 mM, NaCl 2,0 M, pH 7,0 y Tampón B: fosfato sódico al 80 % 50 mM, isopropanol al 20 %, pH 7,0. La mezcla de conjugación se mezcló con un volumen igual de NaCl 4,0 M en fosfato sódico 50 mM, pH 7,0 y se inyectó sobre la columna a 1 ml/min de tampón A. Después, la muestra de DAR 4 se eluyó usando un gradiente de tampón B al 0-100 %. El gradiente se mantuvo cuando la especie DAR 4 45 comenzó a eluir y se mantuvo hasta que la traza UV volvió al valor inicial, momento en el que el gradiente continuó. Las fracciones de picos eluidos se recogieron, se seleccionaron y se analizaron por HIC analítica usando una columna TOSOH TSK-gel Butil-NPR 35 x 4,6 mm. Las fracciones que contenían DAR 4 (a una pureza >90 %) se combinaron, el tampón se intercambió usando una columna de desalación HiPrep™ 26/10 en PBS pH 7,4 y se concentró en concentradores VivaSpin 20 (membrana MWCO PES 10 kDa) a 4000 xg, a temperatura ambiente. 50 Después, la muestra de DAR 4 concentrada se filtró en condiciones estériles y se ultracongeló en un congelador a -80 °C. La muestra final se cuantificó por ensayo Bradford y se analizó por SDS-PAGE no reductora y HIC analítica y se usó para la evaluación *in vitro*.

La eficacia *in vitro* de los conjugados de mAb-reactivo **1** se determinaron midiendo el efecto inhibitor sobre el crecimiento celular de las líneas celulares de cáncer que sobreexpresan el receptor HER-2.

55 La pérdida de la viabilidad de las células tumorales después del tratamiento con fármacos citotóxicos o ADC *in vitro* puede medirse creciendo líneas celulares en presencia de concentraciones crecientes de fármacos o ADC y cuantificando la pérdida de proliferación o actividad metabólica utilizando el reactivo de luminiscencia CellTiter Glo® (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Lewis Phillips G.D, Cancer Res 2008; 68: 9280-9290). El protocolo

describe la siembra de células, el tratamiento con fármacos y la determinación de la viabilidad celular en referencia a células no tratadas basadas en la síntesis de ATP, que está directamente relacionada con el número de células presentes en el pocillo.

5 Se tripsinizaron células SK-BR-3 y BT-474 HER2-positivas con 3 ml de tripsina EDTA durante 5-15 min. La tripsinización se detuvo añadiendo 10 ml de medio completo, y las células se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml. Las células se contaron usando un hemocitómetro Neubauer y se ajustaron a una densidad celular de  $1 \times 10^5$ /ml para BT-474 y  $5 \times 10^4$ /ml para SK-BR-3, respectivamente. Las células se sembraron (100  $\mu$ l/pocillo) en placas de 96 pocillos con paredes opacas revestidas con poli-D-lisina y se incubaron durante 24 h a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Las líneas de células tumorales SK-BR-3 (ATCC-HTB-30) y BT-474 (ATCC-HTB-20) se adquirieron en la Colección  
10 Americana de Cultivos Tipo. Se cultivaron células SK-BR-3 en medio 5A de McCoy (Life Technologies®), suero fetal bovino al 10 %, 100 u/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin. Se cultivaron las células BT-474 en medio DMEM/F-12 (Life Technologies®), suero fetal bovino al 10 %, 100 u/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin.

15 Los métodos para cultivo celular se obtuvieron a partir de las hojas de información de productos para ATCC y las referencias citadas en la misma, por ejemplo, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique de R. Ian Freshney 3ª edición, publicado por Alan R. Liss, N.Y. 1994, o 5ª edición publicado por Wiley-Liss, N.Y. 2005. Las diluciones seriadas de ADC o fármaco libre (MMAE), se fabricaron por triplicado mediante adición con pipeta a través de una placa de 96 pocillos de las columnas 3-10 con diluciones de 2 veces usando el medio de cultivo celular pertinente como diluyente. Las líneas celulares HER2-positivas, BT-474 y SK-BR-3 se trataron con concentraciones de fármaco mostradas en la Tabla 4.

20 Después, las células se incubaron con el fármaco (volumen total 200  $\mu$ l/pocillo), a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 96 h más.

Tabla 4

Línea celular	Conjugado fármaco/fármaco	Intervalo de concentración
SK-BR-3	MMAE	2,5-0,02 nM
SK-BR-3	Conjugado de anticuerpo-reactivo DAR 4 <b>1</b>	0,625 nM-5 pM
BT-474	MMAE	2,5-0,02 nM
BT-474	Conjugado anticuerpo-reactivo DAR 4 <b>1</b>	1,25 nM-0,01 nM

25 El ensayo de viabilidad celular se realizó usando el reactivo de luminiscencia Cell-Titer Glo®, como se describe por las instrucciones del fabricante, (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Lewis Phillips G.D, Cancer Res 2008; 68: 9280-9290). Los tiempos de incubación, por ejemplo, la lisis celular y la incubación con reactivo luminiscente, se prolongaron a 3 min y 20 min, respectivamente, para obtener una señal luminescente óptima. La luminiscencia se registró usando un lector de placas (por ejemplo, el lector de placas MD Spectramax M3), y los datos se analizaron posteriormente usando un modelo de regresión no lineal de cuatro parámetros.

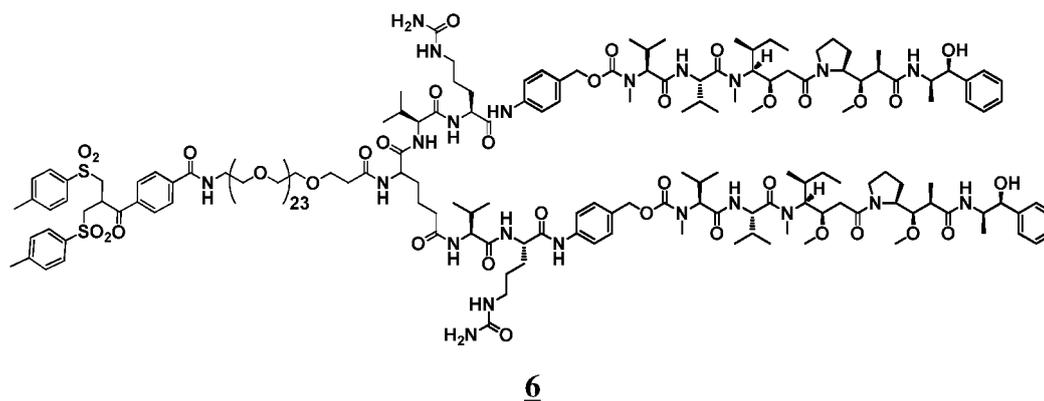
30 Los resultados se muestran en la figura 6, que ilustra las respuestas de viabilidad celular al tratamiento con el conjugado anticuerpo-reactivo **1** en las células SKBR-3 o BT-474. La viabilidad se expresa como el % de células no tratadas. El % de viabilidad (eje Y) se representa frente al logaritmo de la concentración farmacológica en nM (eje x) para determinar los valores de CI<sub>50</sub> para todos los conjugados, así como el fármaco libre. Los valores de CI<sub>50</sub> se muestran en la Tabla 5.

35 Tabla 5

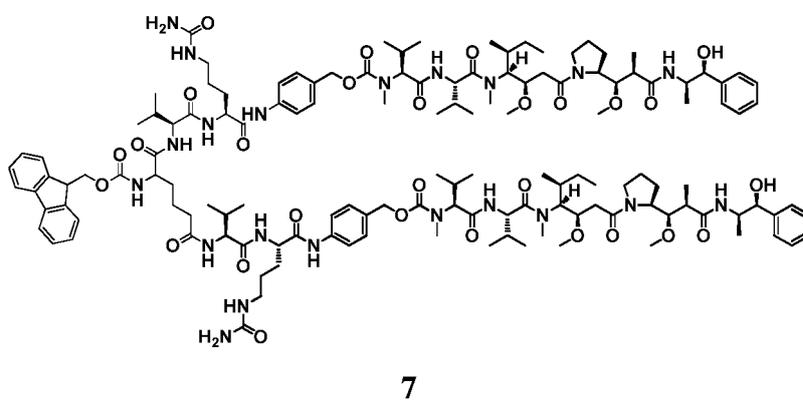
Muestra	CI <sub>50</sub> (nM) SK-BR-3	CI <sub>50</sub> (nM) BT-474
MMAE	0,2	0,75
Conjugado anticuerpo-reactivo <b>1</b> DAR-4	0,035	0,12

Como se muestra en la figura 6 y la Tabla 5, el conjugado anticuerpo-reactivo **1** está activo en las líneas celulares positivas para HER2.

40 **Ejemplo 10: Síntesis del reactivo bis-(valina-citrulina-paraaminobencil-monometil auristatina E) (val-cit-PAB-MMAE)<sub>2</sub> **6** que posee un mono PEG de 24 unidades de repetición con funcionalidad bis-sulfona terminal.**

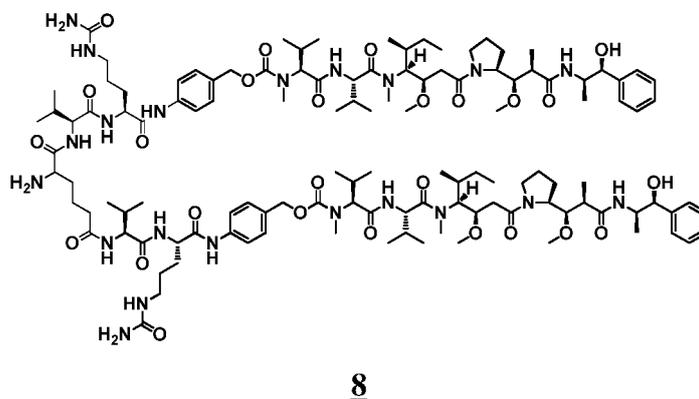


Etapa 1: Conjugación de H<sub>2</sub>N-val-cit-PAB-MMAE en ácido Fmoc-L-α-amino adípico.



- 5 A una solución agitada de sal H<sub>2</sub>N-val-cit-PAB-MMAE.TFA (120 mg, Concartis), ácido Fmoc-L-α-amino adípico (16,9 mg) y hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU) (34,2 mg) en dimetilformamida anhidra (1,5 ml) se le añadió diisopropiletilamina (51 ml) a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h y se dejó calentar a temperatura ambiente durante 16 h. Después, la mezcla de reacción se purificó directamente por cromatografía en columna C18 de fase inversa eluyendo con tampón A (v/v):
- 10 agua:acetonitrilo al 5 %:TFA al 0,1 % y tampón B (v/v): TFA al 0,1 % en acetonitrilo (100:0 v/v a 0:100). El disolvente orgánico se retiró al vacío y el disolvente acuoso se retiró por liofilización. El ácido-bis-[val-cit-PAB-MMAE] Fmoc-L-α-amino adípico **7** se aisló en forma de un sólido de color blanco (99,0 mg). m/z [M+H]<sup>+</sup> 2593.

Etapa 2: La desprotección de ácido-bis-[val-cit-PAB-MMAE] Fmoc-L-α-amino adípico **7**

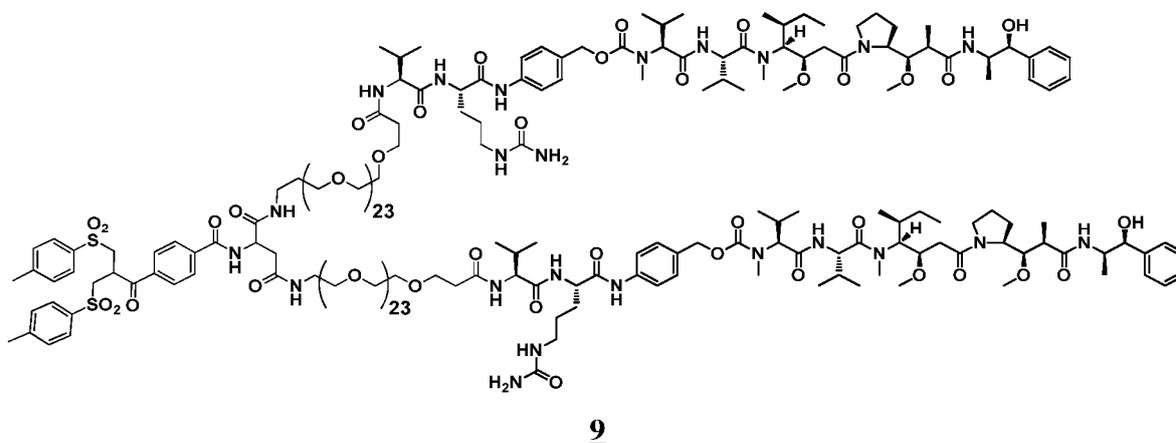


- 15 Se disolvió ácido-bis-[val-cit-PAB-MMAE] Fmoc-L-α-amino adípico **7** (15 mg) en dimetilformamida anhidra (1 ml) y se añadió piperidina (0,1 ml). Después de 16 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se acidificó mediante la adición de ácido acético (0,2 ml) y después se purificó directamente por cromatografía en columna C18 de fase inversa eluyendo con tampón A (v/v): Agua:acetonitrilo al 5 %:TFA al 0,1 % y tampón B (v/v): TFA al 0,1 % en acetonitrilo (100:0 v/v a 0:100), el disolvente orgánico se retiró al vacío y el disolvente acuoso se retiró por liofilización y después se aisló el ácido-bis-[val-cit-PAB-MMAE] H<sub>2</sub>N-L-α-amino adípico **8** en forma de un sólido de
- 20 color blanco (7,0 mg). m/z [M+H]<sup>+</sup> 2374.

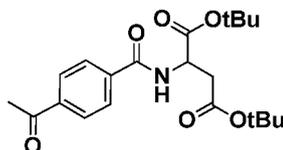
Etapla 3: Conjugación de ácido-bis-[val-cit-PAB-MMAE] L- $\alpha$ -amino adípico **8** en bis-sulfona PEGilada terminada en ácido **2**

A una solución agitada que contenía el ácido-bis-[val-cit-PAB-MMAE] H<sub>2</sub>N-L- $\alpha$ -amino adípico **5c** (7 mg) y el ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonyl)-metil]acetil]benzoico conocido (**6** mg) en dimetilformamida anhidra (0,5 ml) se le añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU) (1,4 mg, 10  $\mu$ l de 14 mg en 100  $\mu$ l de una solución madre de DMF), y la solución se agitó durante 5 min a 0 °C. Después, se añadió N-metilmorfolina (NMM) (0,37  $\mu$ l, (10  $\mu$ l de una solución madre de 37  $\mu$ l en 963  $\mu$ l de DMF), y la solución se agitó. A intervalos de 1 h, se añadieron porciones adicionales de HATU (1,4 mg (10  $\mu$ l de solución madre)) y NMM (0,37  $\mu$ l, (10  $\mu$ l de solución madre)) hasta un total de 3 adiciones. Después, el material se purificó directamente por cromatografía en columna C18 de fase inversa eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:TFA al 0,1 % y tampón B (v/v): TFA al 0,1 % en acetonitrilo (100:0 v/v a 0:100), el disolvente orgánico se retiró al vacío y el disolvente acuoso se retiró por liofilización y la bis-sulfona-PEG(24)-H<sub>2</sub>N-bis-[val-cit-PAB-MMAE] **6** se aisló en forma de una película incolora (3,3 mg, 31 %). m/z [M+H]<sup>2+</sup> 1992.

**Ejemplo 11: Síntesis de reactivo de bis-(mono PEG-valina-citrulina-paraaminobencil-monometil auristatina E de 24 unidades de repetición) (PEG(24u)-val-cit-PAB-MMAE)<sub>2</sub> **9** con funcionalidad bis-sulfona terminal.**

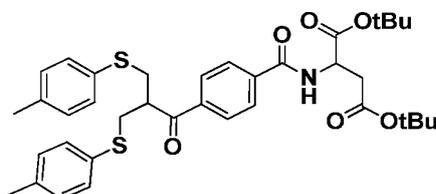
**9**

Etapla 1: Conjugación de ácido aspártico en ácido acetilbenzoico.

**10**

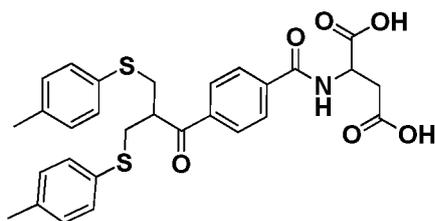
A una solución agitada de clorhidrato de  $\beta$ -t.-butil  $\alpha$ -t.-butil éster del ácido L-aspártico (3,43 g) y diclorometano anhidro (30 ml) se le añadió 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (1,786 g). Después de 2 h, se añadieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) (2,80 g) y ácido 4-acetilbenzoico (2,00 g) y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 28 h, la solución se repartió con agua (100 ml) y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 10 ml). La fase orgánica combinada se lavó con agua (2 x 50 ml) y salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío. El residuo sólido se purificó por cromatografía en columna eluyendo con diclorometano-metanol (99,5:0,5 v/v), el disolvente se retiró al vacío y el 2-[(4-acetilbenzoil)amino]butanodioato de di-terc-butilo **10** se aisló en forma de un sólido de color blanquecino (3,856 g, 81 %). <sup>1</sup>H RMN  $\delta$ <sub>H</sub> (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 1,45 (9H, s, t-Bu), 1,48 (9H, s, t-Bu), 2,52 (3H, s, CH<sub>3</sub>-COAr), 2,80 (2H, dd, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>tBu) 4,80 (1H, m, CH-CH<sub>2</sub>), 7,25 (1H, m, NH), 7,85 (2H, d, Ar), 8,00 (2H, d, Ar).

Etapla 2: Formación de butanodioato de bis-tolilsulfanilo **11**

**11**

A una suspensión agitada de 2-[[4-(4-acetilbenzoil)amino]butanodioato de di-terc-butilo **10** (1,00 g) en etanol absoluto (20 ml) se le añadió 4-metilbencenotiol (635 mg). A la mezcla de reacción se le añadió formaldehído (solución ac. al 37 %) (0,3 ml) Nature Protocols, 2006, 1(54), 2241-2252) y después se calentó a reflujo. Después de 2 h y 8 h se añadió una porción más de formaldehído (solución ac. al 37 %, 0,3 ml). Después de 16 h más, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se concentró al vacío, se diluyó en diclorometano (50 ml), se lavó con agua (3 x 25 ml), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró al vacío. El material en bruto se purificó por cromatografía en columna eluyendo con diclorometano-metanol (99,5:0,5 v/v a 98:2 v/v), el disolvente se retiró al vacío y el 2-[[4-[3-(p-tolilsulfanil)-2-(p-tolilsulfanilmetil)propanoil]benzoil]amino]butanodioato de di-terc-butilo **11** se aisló en forma de un sólido de color amarillo pálido (0,594 g, 35 %).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) 1,45 (9H, s, t-Bu), 1,48 (9H, s, t-Bu), 2,35 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 2,85 (2H, dd,  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{tBu}$ ), 3,15 (2H, dd,  $\text{CH}_2\text{-SAr}$ ), 3,75 (1H, m,  $\text{CHCH}_2\text{S}$ ), 4,80 (1H, m,  $\text{CH-CH}_2$ ), 7,10 (4H, d, SAr), 7,15 (4H, d, SAr), 7,25 (1H, m, NH), 7,55 (2H, d, Ar), 7,5 (2H, d, Ar).

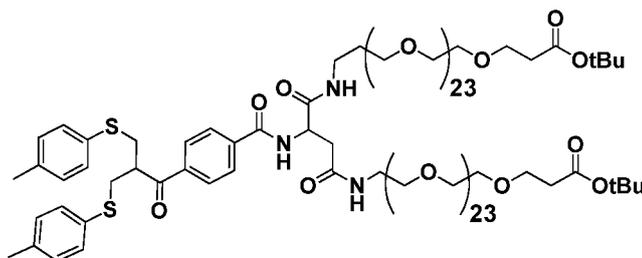
Etapas 3: Eliminación de los grupos de protección terc-butilo.



**12**

A una solución agitada de 2-[[4-[3-(p-tolilsulfanil)-2-(p-tolilsulfanilmetil)propanoil]benzoil]amino]butanodioato de di-terc-butilo **11** (527 mg) en diclorometano anhidro (2,5 ml) se le añadió cuidadosamente ácido trifluoroacético (2,5 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera inerte. Después de 16,5 h, la reacción se concentró al vacío y el ácido trifluoroacético residual se retiró por destilación azeotrópica con tolueno (2 x 3 ml). El producto en bruto se concentró al vacío para dar ácido 2-(4-(3-(p-toliltio)-2-((p-toliltio)metil)propanoil)benzamido)succínico **12** en forma de un aceite de color amarillo pálido (490 mg, se asumió un rendimiento cuantitativo) que se usó sin purificación adicional.  $^1\text{H}$  RMN  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) 2,25 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 2,80-3,15 (6H, m,  $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  y  $\text{CH}_2\text{-SAr}$ ), 3,65 (1H, m,  $\text{CHCH}_2\text{S}$ ), 5,00 (1H, m,  $\text{CH-CH}_2$ ), 6,85 (4H, d, SAr), 6,95 (4H, d, SAr), 7,50 (2H, d, Ar), 7,55 (1H, s a, NH), 7,65 (2H, d, Ar), 10,95 (2H, s a,  $\text{CO}_2\text{H}$ ).

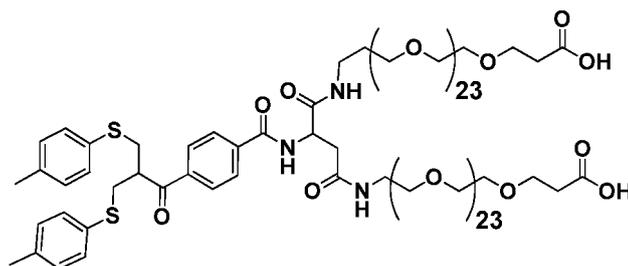
Etapas 4: Conjugación de bis-toliltio-Asp-ácido en  $\text{H}_2\text{N.dPEG}(24)\text{-CO-OtBu}$ .



**13**

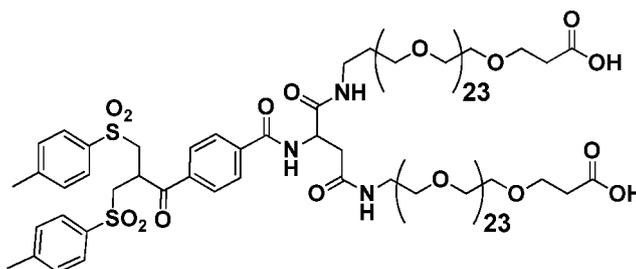
Una solución en tolueno (3 ml) de  $\text{H}_2\text{N-dPEG}(24)\text{-CO-OtBu}$  (240 mg, Iris Biotech) se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió de nuevo en diclorometano (15 ml). En agitación, se añadieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) (17,4 mg) y ácido 2-(4-(3-(p-toliltio)-2-((p-toliltio)metil)propanoil)benzamido)succínico **12** (50 mg) y la mezcla de reacción se agitó en una atmósfera inerte a temperatura ambiente. Después de 16 h, se añadió más cantidad de  $\text{H}_2\text{N.dPEG}(24)\text{-CO-OtBu}$  (240 mg) y EDCI (17,4 mg). Después de un total de 96 h, el residuo sólido se purificó directamente por cromatografía en columna eluyendo con diclorometano-metanol (99:1 v/v a 90:10 v/v), el disolvente se retiró al vacío y el bis-toliltio-bis PEG **13** se aisló en forma de un sólido ceroso de color amarillo (179,5 mg, 68 %).  $^1\text{H}$  RMN  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) 1,45 (18H, s, t-Bu), 2,30 (6H, s,  $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 2,75 (2H, dd,  $\text{CH}_2\text{CON}$ ), 3,20 (2H, dd,  $\text{CH}_2\text{-SAr}$ ), 3,45-3,80 (m, PEG y  $\text{CHCH}_2\text{S}$ ), 4,85 (1H, m,  $\text{CH-CH}_2$ ), 7,05 (4H, d, SAr), 7,10 (4H, d, SAr), 7,55 (2H, d, Ar), 7,85 (2H, d, Ar), 7,90 (1H, m, NH), 8,50 (1H, m, NH).

Etapas 5: Eliminación de los grupos de protección terc-butilo.

**14**

5 A una solución agitada de bis-toluidil-bis PEG-éster **13** (179,5 mg) en diclorometano anhidro (3,0 ml) se la añadió cuidadosamente ácido trifluoroacético (3,0 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera inerte. Después de 2 h 45 min, la reacción se concentró al vacío y el ácido trifluoroacético residual se retiró por destilación azeotrópica con tolueno (2 x 7 ml). El producto en bruto se concentró al vacío y después se purificó por cromatografía en columna eluyendo con diclorometano-metanol (98:2 v/v a 85:15 v/v), el disolvente se retiró al vacío y el bis-toluidil-bis PEG-ácido **14** se aisló en forma de un aceite de color amarillo pálido (102 mg, 59 %). <sup>1</sup>H RMN  $\delta_H$  (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 2,05 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 2,60 (2H, t, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 2,80 (2H, dd, CH<sub>2</sub>CON), 3,20 (2H, dd, CH<sub>2</sub>-SAr), 3,45-3,80 (m, PEG y CHCH<sub>2</sub>S), 4,95 (1H, m, CH-CH<sub>2</sub>), 7,05 (4H, d, SAr), 7,10 (4H, d, SAr), 7,55 (2H, d, Ar), 7,70 (1H, m, NH), 7,75 (1H, m, NH), 7,85 (2H, d, Ar), 8,75 (1H, m, NH).

Etapa 6: Oxidación del bis-tolilsulfanil-bis-PEG-ácido.

**15**

15 Se añadió agua (3 ml) a una solución agitada de bis-toluidil-bis PEG-ácido **14** (102 mg) en metanol (3 ml) seguido de la adición en porciones de Oxone® (67,1 mg). La suspensión resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente y después de 18 h, la mezcla de reacción se pasó a través de un lecho de lana de algodón y se lavó con 1:1 de MeOH/agua (2 ml). Los lavados orgánicos combinados se concentraron al vacío para retirar metanol y la capa acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 7 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl acuoso (1 x 5 ml, pH 3), se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron al vacío para producir bis-sulfona-bis-PEG-ácido **15** en forma de un sólido de color amarillo pálido (79 mg, 76 %). <sup>1</sup>H RMN  $\delta_H$  (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) 2,45 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Ar), 2,55 (2H, t, CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H), 2,80 (2H, dd, CH<sub>2</sub>CON), 3,25-3,80 (m, PEG y CH<sub>2</sub>-Ts), 4,25 (1H, m, CH-CH<sub>2</sub>-Ts), 4,85 (1H, m, CH-CH<sub>2</sub>), 7,35 (4H, d, Ts), 7,60 (1H, m, NH), 7,65 (2H, d, Ar), 7,70 (4H, d, Ts), 7,85 (2H, d, Ar), 7,95 (1H, m, NH), 8,75 (1H, m, NH).

Etapa 7: Conjugación de H<sub>2</sub>N-val-cit-PAB-MMAE en bis-sulfona PEGilada terminada en bis-ácido.

25 A una solución agitada de bis-sulfona-bis-PEG-ácido **15** (24,0 mg) en una atmósfera inerte se le añadieron sal H<sub>2</sub>N-val-cit-PAB-MMAE.TFA (37,2 mg) y carbonato sódico anhidro (2,7 mg) en dimetilformamida anhidra (0,8 ml). Después se añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de ona-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU) (9,6 mg) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 42 h, la mezcla de reacción se acidificó por ácido acético (50  $\mu$ l) y después se purificó directamente por cromatografía en columna C18 de fase inversa eluyendo con tampón A (v/v): Agua:acetonitrilo al 5 %:TFA al 0,1 % y tampón B (v/v): TFA al 0,1 % en acetonitrilo (100:0 v/v a 0:100). Para las fracciones de producto, el disolvente orgánico se retiró al vacío y el disolvente acuoso se retiró por liofilización. La purificación adicional se consiguió usando cromatografía en columna sobre sílice-diol de fase inversa eluyendo con acetato de etilo-isopropanol (100:0 v/v a 0:100 v/v). El disolvente se retiró al vacío y la bis-sulfona-PEG(24)-bis-[val-cit-PAB-MMAE] **9** se aisló en forma de un aceite incoloro (8,0 mg, 21 %). m/z M+Na 5104.

35 **Ejemplo 12: Conjugación de reactivo bis-sulfona MMAE dicargado **8** y reactivo bis-sulfona MMAE dicargado **9** en un fragmento de anticuerpo (Fab)**

Dos alícuotas de 5 ml de Fab (2,14 mg/ml en PBS), derivadas de la digestión de papaína de trastuzumab, se

5 redujeron con DTT (50 µl de una solución 1 M de DTT añadidos) a 22 °C durante 1 h. Para eliminar el exceso de DTT, las soluciones de Fab reducidas se intercambiaron entonces con tampón en fosfato sódico 20 mM, pH 7,4 (NaCl 150 mM y EDTA 20 mM) usando dos columnas PD-10. Después del intercambio de tampón, la concentración de la muestra se midió por UV. Las soluciones Fab intercambiadas con tampón se diluyeron a 1,1 mg/ml (3,6 ml de volumen final) con fosfato sódico 20 mM, pH 7,4 (NaCl 150 mM y EDTA 20 mM).

10 A una alícuota de Fab reducido se le añadió una solución de bis-sulfona-PEG(24u)-val-cit-PAB-MMAE2 (1,2 mg/ml, 0,4 ml) en 50:50 v/v de acetonitrilo y fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y EDTA 20 mM. A la segunda alícuota de Fab se le añadió una solución de bis-sulfona-[PEG(24u)-val-cit-PAB-MMAE]2 (0,4 ml, 1,5 mg/ml) en 50:50 v/v de acetonitrilo y fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y EDTA 20 mM. Ambas mezclas de reacción se incubaron a 22 °C durante 22 h. Tras la finalización de la incubación, las mezclas de reacción (4,0 ml) se intercambiaron con tampón en PBS usando una columna giratoria de 10 ml Zeba™. Ambos de los conjugados de Fab-MMAE resultantes se purificaron a una pureza de más del 93 % por HIC preparativa usando una columna Toyopearl Phenyl HIC (1 ml). Cada muestra se cargó en NaCl 2 M, fosfato sódico 50 mM, pH 7,0 y se eluyó en un gradiente al 0-100 % de propan-2-ol al 20 %, fosfato sódico 50 mM, pH 7,0.

### 15 **Ejemplo 13: Análisis de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) por ensayo de viabilidad celular *in vitro***

La eficacia *in vitro* de los reactivos de anticuerpo del reactivo **6** y el reactivo **9** preparados en el Ejemplo 12 se determinaron midiendo el efecto inhibitor sobre el crecimiento celular de las líneas celulares de cáncer que sobreexpresan el receptor de HER-2 mediante el método del Ejemplo 9.

20 Las células SK-BR-3 y BT-474 positivas a HER2 se tripsinizaron con 3 ml de Tripsina EDTA durante 5-15 min. La tripsinización se detuvo añadiendo 10 ml de medio completo, y las células se transfirieron a un tubo de 50 ml Falcon. Las células se contaron usando un hemocitómetro Neubauer y se ajustaron a una densidad celular de  $1 \times 10^5$ /ml para BT-474 y  $5 \times 10^4$ /ml para SK-BR-3 respectivamente. Las células se sembraron (100 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos de pared opaca revestidas con poli-D-lisina y se incubaron durante 24 h a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Las líneas celulares de tumor SK-BR-3 (ATCC-HTB-30) y BT-474 (ATCC-HTB-20) se adquirieron a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Las células SK-BR-3 se cultivaron en medio 5A de McCoy (Life Technologies®), suero fetal bovino al 10 %, 100 u/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células BT-474 se cultivaron en medio DMEM/F-12 (Life Technologies®), suero fetal bovino al 10 %, 100 u/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

30 Las líneas celulares positivas a HER2, BT-474 y SK-BR-3 se trataron con las concentraciones de fármaco mostradas en la Tabla 6. Después, las células se incubaron con el fármaco (volumen total 200 µl/pocillo), a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % durante 96 h más.

Tabla 6

Línea celular	Conjugado farmacológico fármaco/anticuerpo	Intervalo de concentración (nM)
SK-BR-3	MMAE	2,5-0,02
	Conjugado de reactivo <b>6</b>	1,25-0,01
	Conjugado de reactivo <b>9</b>	2,5-0,02
BT-474	MMAE	5-0,04
	Conjugado de reactivo <b>6</b>	2,5-0,02
	Conjugado de reactivo <b>9</b>	5-0,04

35 El ensayo de viabilidad celular se realizó usando el reactivo de luminiscencia Cell-Titer Glo®, como se describe por las instrucciones del fabricante (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Lewis Phillips G.D, Cancer Res 2008; 68: 9280-9290). Los tiempos de incubación, por ejemplo, la lisis celular y la incubación con reactivo luminiscente, se prolongaron a 3 min y 20 min, respectivamente, para obtener una señal luminescente óptima. La luminiscencia se registró usando un lector de placas (por ejemplo, el lector de placas MD Spectramax M3), y los datos se analizaron posteriormente usando un modelo de regresión no lineal de cuatro parámetros.

40 Los resultados se muestran en la figura 7, que ilustra las respuestas de viabilidad celular al tratamiento con conjugado de reactivo **6** o conjugado de reactivo **9** dentro de células SKBR-3 o BT-474. La viabilidad se expresa como % de células no tratadas. El % de viabilidad (eje Y) se representa frente al logaritmo de concentración de fármaco en nM (eje x) para determinar los valores de CI50 para todos los conjugados, así como el fármaco libre. Los

valores de  $CI_{50}$  se muestran en la Tabla 7

Tabla 7

	SK-BR-3	BT-474
Muestra	$CI_{50}$ (nM)	$CI_{50}$ (nM)
Conjugado del reactivo <u>6</u>	0,14	0,32
Conjugado del reactivo <u>9</u>	0,2	0,42
MMAE	0,27	0,85

5 Como se muestra en la figura 7 y la Tabla 7, ambos conjugados de anticuerpo son activos en las líneas celulares positivas a HER2. La potencia del conjugado del reactivo 6 se aumenta en comparación con el conjugado del reactivo 9. Ambos conjugados reducen la proliferación más eficientemente que el fármaco libre.

**Ejemplo 14: Estudio de xenoinjerto *in vivo* para los conjugados anticuerpo-fármaco producidos usando el reactivo bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE 1**

10 Se produjeron cuatro conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) con DAR = 1, DAR = 2, DAR = 3, y DAR = 4, a partir de la conjugación del reactivo bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE 1 con trastuzumab y se purificó por HIC para tener cada uno más del 95 % de pureza de DAR individual. Después, cada conjugado se usó en un estudio de xenoinjerto como se indica a continuación.

15 Ratones inmunodeprimidos combinados graves hembra (Fox Chase SCID®, C.B-17/lcr-Prkdcscid, Charles River Laboratories) tenían once semanas de edad, con un intervalo de peso corporal (PC) de 18,0 a 23,1 gramos el Día 1 del estudio. A los animales se les dio agua *ad libitum* (osmosis inversa, 1 ppm Cl), y Lab Diet® modificada e irradiada por NIH 31 que consistía en proteína en bruto al 18,0 %, grasa en bruto al 5,0 %, y fibra en bruto al 5,0 %. Los ratones se alojaron en jaulas para animales de laboratorio Enricho'cobs™ irradiadas en micro-aisladores estáticos en un ciclo de luz de 12 horas a 20-22 °C (68-72 °F) y un 40-60 % de humedad.

20 Los xenoinjertos se iniciaron con carcinomas de mama humanos BT474 mantenidos por trasplante subcutáneo en serie en ratones SCID. El día del implante del tumor, cada ratón de ensayo recibió un fragmento de 1 mm<sup>3</sup> de BT474 implantado por vía subcutánea en el costado derecho, y el crecimiento tumoral se controló a medida que el tamaño medio alcanzó el intervalo diana de 90 a 120 mm<sup>3</sup>. Los tumores se midieron en dos dimensiones usando calibradores, y el volumen se calculó usando la fórmula:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \cdot l}{2}$$

25 donde w = anchura y l = longitud, en mm, del tumor.

Veintiocho días después del implante del tumor, designado como Día 1 del estudio, los animales se clasificaron en grupos que consistían cada uno en diez ratones con volúmenes tumorales individuales que variaban entre 63 y 126 mm<sup>3</sup> y volúmenes tumorales medios de grupo de 99 a 101 mm<sup>3</sup>.

30 El tratamiento comenzó el Día 1 en todos los grupos de ratones (n = 10) con tumores BT474 subcutáneos establecidos (63-126 mm<sup>3</sup>). El grupo 1 era un grupo de control tratado con vehículo. Los grupos 2-5 recibieron ADC que tenían DAR = 1, DAR = 2, DAR = 3 y DAR = 4, respectivamente, cada uno a 20 mg/kg por vía intravenosa los Días 1, 8 y 15. Los tumores se midieron dos veces por semana hasta que el estudio terminó el Día 61. Los ratones se controlaron individualmente y cada animal fue sacrificado cuando su tumor alcanzó el volumen de criterio de valoración de 1500 mm<sup>3</sup> o el día final, lo que ocurriera primero. Se calculó el tiempo hasta el criterio de valoración (TTE) para cada ratón. El resultado del tratamiento se determinó a partir del porcentaje de retraso del crecimiento tumoral (% de TGD), definido como el aumento porcentual en el TTE medio para los ratones tratados frente a los ratones de control, con diferencias entre los grupos considerados estadísticamente significativos a P ≤ 0,05 utilizando el análisis de supervivencia de rango logarítmico. Los ratones también se controlaron para determinar las respuestas de regresión completa (CR) y regresión parcial (PR). Un animal con una CR al final del estudio se clasificó adicionalmente como un superviviente libre de tumor. La tolerabilidad al tratamiento se evaluó mediante medidas de peso corporal y observación frecuente de los signos clínicos de los efectos secundarios relacionados con el tratamiento.

45 El TTE medio para los controles tratados con vehículo era de 34,9 días, estableciendo un TGD máximo posible de 26,1 días (75 %) para el estudio de 61 días. Todos los regímenes fueron bien tolerados y pudo evaluarse su eficacia. Los ADC con DAR = 1 y DAR = 2 produjeron TGD medibles de 14,4 días (41 %) y 16,9 días (48 %),

respectivamente, pero no hubo diferencia significativa en la supervivencia con los controles ( $P > 0,05$ ). El grupo DAR = 1 tuvo un superviviente libre de tumor, que fue la única regresión registrada entre los tres grupos. Los ADC con DAR = 3 y DAR = 4 produjeron cada uno el TGD máximo (26,1 días, 75 %) y una diferencia de supervivencia significativa frente a los controles ( $P < 0,001$ ), pero los dos regímenes fueron distintos basándose en las respuestas de regresión. El tratamiento DAR = 3 produjo tres PR, mientras que la DAR = 4 produjo 10/10 supervivientes libres de tumores. Los resultados se muestran en la figura 8.

**Ejemplo 15: Conjugación de Bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE 1 con el anticuerpo parental y la variante de anticuerpo IgGC226S: Mayor retención de puente de cadena intermedia con IgGC226S.**

La conjugación del anticuerpo parental y la variante de disulfuro de bisagra única IgGC226S que se describe en el Ejemplo 4 con 1 equivalente molar del reactivo de conjugación Bis-sulfona-PEG(24)-val-cit-PAB-MMAE 1 por enlace disulfuro de cadena intermedia se realizó después de la reducción del anticuerpo (TCEP, 1 equivalente molar por disulfuro de cadena intermedia, 15 min, 40 °C). El reactivo de conjugación se preparó en DMSO (para dar DMSO al 5 % (v/v) en solución de reacción) inmediatamente antes de la conjugación. Las concentraciones de anticuerpo durante la conjugación fueron 4 mg/ml. Las reacciones se realizaron durante una noche (16 h) a 40 °C, momento después del cual las mezclas de reacción se trataron con DHA 10 mM durante 1 h a temperatura ambiente y después se analizaron por SDS-PAGE. Los geles de SDS-PAGE se tiñeron con InstantBlue™ y se formaron por imagen usando un instrumento IMAGEQUANT™ LAS 4010 (GE Healthcare) para determinar el % de cada especie presente en un carril. Los resultados de SDS-PAGE se muestran en la figura 9. En la figura 9, los carriles marcados M muestran Novex Protein Standards (Invitrogen). Los carriles 1 y 2 muestran los perfiles de migración de una reacción de pre y post-conjugación de IgGC226S respectivamente. Los carriles 3 y 4 muestran las reacciones equivalentes para el anticuerpo parental. Cuando los disulfuros de cadena intermedia pesada a pesada de un anticuerpo no están puenteados covalentemente tras la conjugación, por ejemplo, debido a la codificación de enlaces disulfuro, una banda justo por debajo del marcador de 80 kDa del dímero de cadena pesada-ligera (H + L) es visible por SDS-PAGE. Por el contrario, cuando se unen puentes de los disulfuros de cadena intermedia pesada a pesada después de la conjugación, es visible una banda justo por encima del marcador de 160 kDa del tetrámero de cadena pesada-ligera del anticuerpo (2H + 2L). Comparando los carriles 2 y 4, puede observarse que la conjugación con IgGC226S, que posee un único disulfuro de cadena pesada intermedia, conduce a un mayor grado de puente entre las dos cadenas pesadas en comparación con el anticuerpo parental, con dos disulfuros de cadena pesada intermedia (80 % frente al 67 % del tetrámero de cadena ligera-pesada del anticuerpo respectivamente) y una menor extensión de la formación de dímero de cadena pesada-ligera (17 % frente al 31 % respectivamente). Por lo tanto, el proceso mejora la estabilidad del conjugado de anticuerpo mediante el puenteo eficiente del enlace disulfuro de cadena pesada intermedia.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Polytherics Limited

35 <120> Conjugados fármaco-proteína novedosos

<130> P020853 WO

<140> PCT/GB 2013/052661

<141> 11-10-2013.

<150> US 61/717.710

40 <151> 24-10-2012.

<150> US 61/717.743

<151> 24-10-2012.

<150> US 61/811.285

<151> 12-04-2013.

45 <150> PCT/GB 2013/051593

<151> 19-06-2013.

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

ES 2 623 209 T3

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> la secuencia es sintetizada

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

ES 2 623 209 T3

<210> 2

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> la secuencia es sintetizada

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr  
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

ES 2 623 209 T3

Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
340 345 350

ES 2 623 209 T3

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

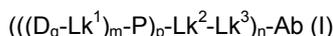
<223> Secuencia de región bisagra

<400> 3

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1.- Un conjugado que contiene auristatina de la fórmula general:



en la que D representa un resto de auristatina;

5 q representa un número entero de 1 a 10;

Lk<sup>1</sup> representa un enlazador;

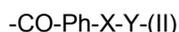
m representa un número entero de 1 a 10;

P representa un enlace o un grupo valente z -P<sup>1</sup>-NH- donde z es de 2 a 11 y P<sup>1</sup> es un grupo que contiene al menos una unidad de etileno -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- o una unidad de etilenglicol -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;

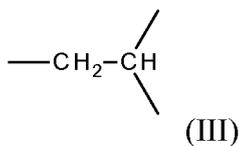
10 p representa un número entero de 1 a 10;

Lk<sup>2</sup> representa un enlace o un enlazador valente y donde y es de 2 a 11 y que consiste en 1 a 9 residuos de aspartato y/o glutamato;

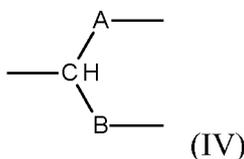
Lk<sup>3</sup> representa un enlazador de la fórmula general:



15 en la que Ph es un grupo fenilo opcionalmente sustituido; X representa un grupo CO o un grupo CH.OH; e Y representa un grupo de fórmula:



o



20 en la que cada uno de A y B representa un grupo alquileo o alquenileno C<sub>1-4</sub>;

Ab representa una proteína o péptido de unión capaz de unirse a un compañero de unión en una diana, estando dicha proteína o péptido de unión unido a Lk<sup>3</sup> a través de dos átomos de azufre derivados de un enlace disulfuro en la proteína o péptido de unión; y

25 n representa un número entero de 1 a s donde s es el número de enlaces disulfuro presentes en la proteína o péptido de unión antes de la conjugación en Lk<sup>3</sup>;

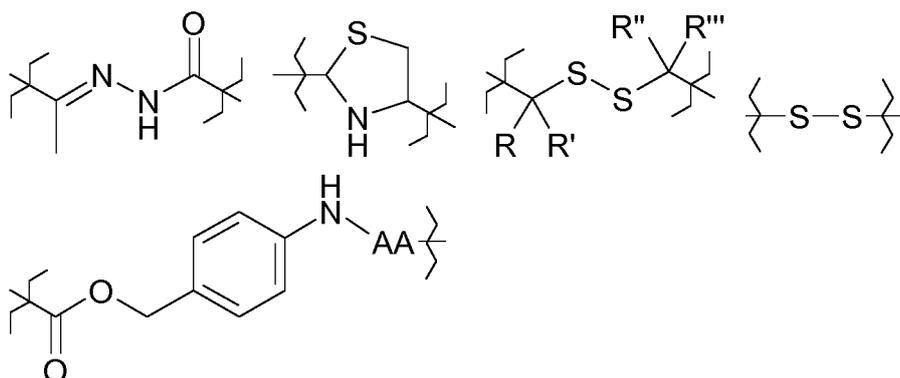
escogiéndose los significados de m, n, p, c, y y z de tal forma que el conjugado contiene de 1 a 10 grupos D.

2.- Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la auristatina es monometilauristatina E o monometilauristatina F unida a través de su átomo de nitrógeno terminal.

30 3.- Un conjugado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la auristatina es monometilauristatina E unida a través de su átomo de nitrógeno terminal.

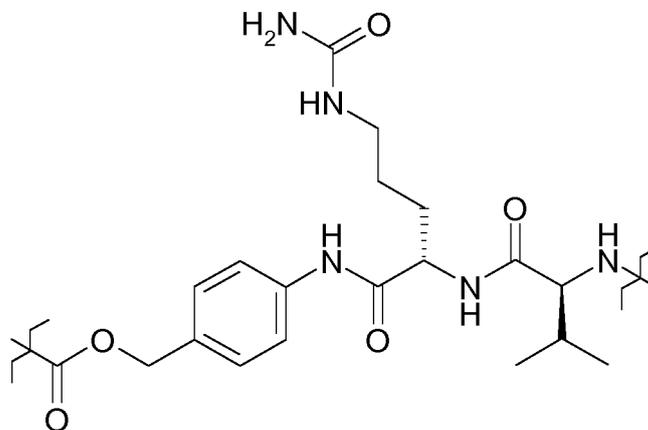
4.- Un conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Lk<sup>1</sup> es un enlazador degradable.

5.- Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, donde Lk<sup>1</sup> incluye uno de los siguientes grupos:



en los que cada uno de R, R', R'' y R''' representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo y AA representa una secuencia aminoacídica específica de proteasa.

6.- Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 5, en el que Lk<sup>1</sup> incluye:



5

(V)

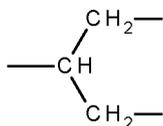
7.- Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que q es un número entero de 2 a 10 y Lk<sup>1</sup> es un enlazador multivalente que incorpora uno o más residuos de aspartato o glutamato.

8.- Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que P representa un enlace, o P representa -P<sup>1</sup>-NH- donde P<sup>1</sup> contiene de 2 a 10 unidades de etilenglicol.

10 9.- Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que P representa polietilenglicol.

10.- Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el grupo fenilo Ph en Lk<sup>3</sup> está sin sustituir.

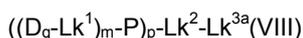
11.- Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en que Y tiene la fórmula:



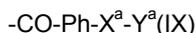
15 12.- Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que Ab representa un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno del anticuerpo de longitud completa.

13.- Un conjugado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que Ab representa IgG1 o IgG4 o un fragmento de IgG1 o IgG4.

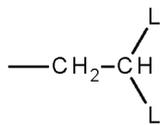
20 14.- Un proceso para la preparación de un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende reducir uno o más enlaces disulfuro en una proteína de unión y posteriormente reacción con un reactivo de conjugación de la fórmula general:



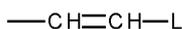
en la que D, Lk<sup>1</sup>, P, Lk<sup>2</sup> y m, p y q tienen los significados dados en la reivindicación 1, y Lk<sup>3a</sup> representa un grupo de fórmula:



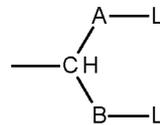
en la que Ph tiene el significado dado en la reivindicación 1, X<sup>a</sup> representa un grupo CO, e Y<sup>a</sup> representa un grupo:



(X),



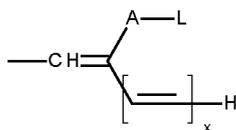
(XI),



(XII)

5

o

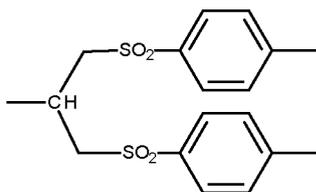


(XIII)

10

en el que A y B tienen los significados dados en la reivindicación 1, cada L representa independientemente un grupo saliente, y x representa un número entero de 1 a 4, para producir un conjugado de fórmula I en la que X representa CO; y opcionalmente reducir dicho grupo CO formado inicialmente X para dar un conjugado que tenga un grupo CH.OH X.

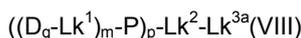
15.- Un proceso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que Y<sup>a</sup> representa:



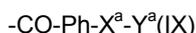
(XIIa)

16.- Un compuesto de la fórmula general:

15

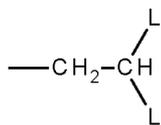


en la que D tiene el significado dado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; Lk<sup>1</sup> tiene el significado dado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 7; P tiene el significado dado en una cualquiera de las reivindicaciones 1, 8 y 9; Lk<sup>2</sup>, m, p y q tienen los significados dados en la reivindicación 1, y Lk<sup>3a</sup> representa un grupo de fórmula:

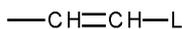


20

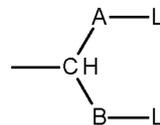
en la que Ph tiene el significado dado en la reivindicación 1 o la reivindicación 10, X<sup>a</sup> representa un grupo CO, e Y<sup>a</sup> representa un grupo:



(X),

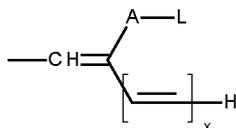


(XI),



(XII)

o

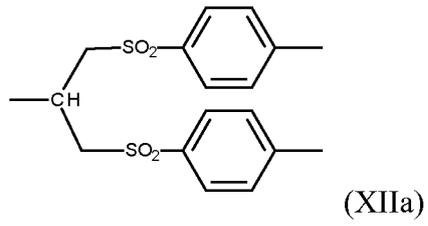


(XIII)

25

en el que A y B tienen los significados dados en la reivindicación 1, cada L representa independientemente un grupo saliente, y x representa un número entero de 1 a 4.

17.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 16, en el que Y<sup>a</sup> representa:



18.- Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, opcionalmente junto con un agente terapéutico adicional.

- 5 19.- Un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o una composición de acuerdo con la reivindicación 18 para su uso en terapia

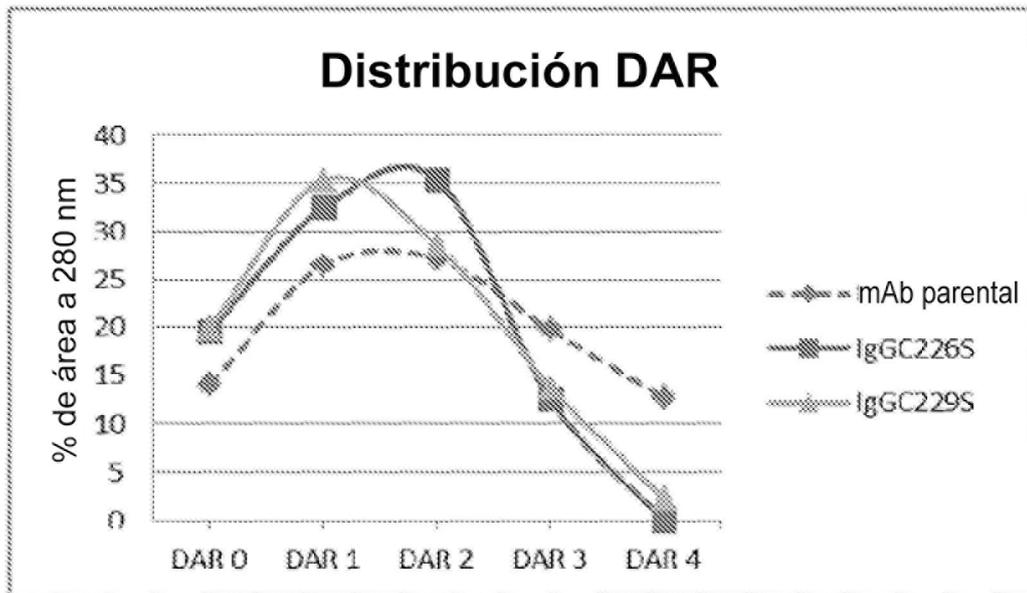


Figura 1

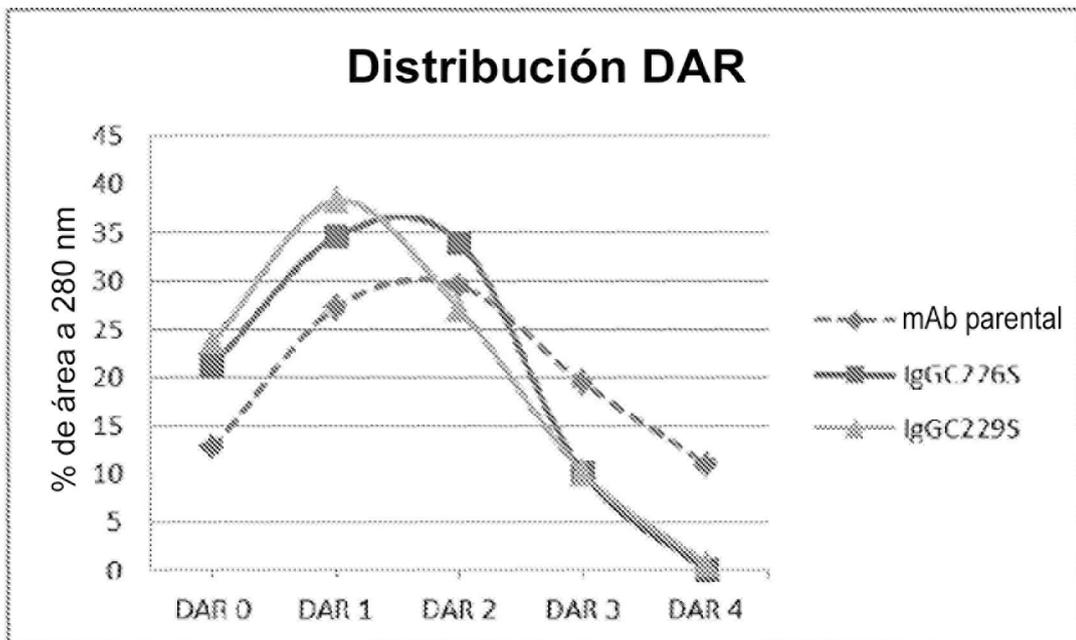


Figura 2

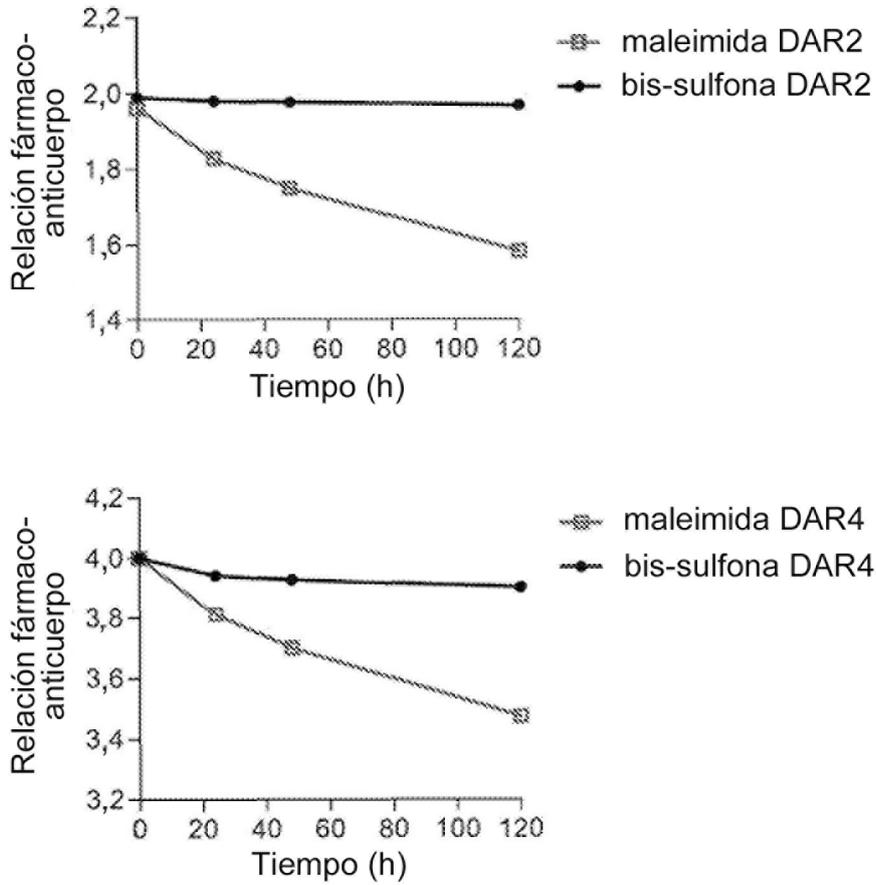


Figura 3

**Conjugado de reactivo 1 de bis-sulfona**

**Conjugado de maleimida**

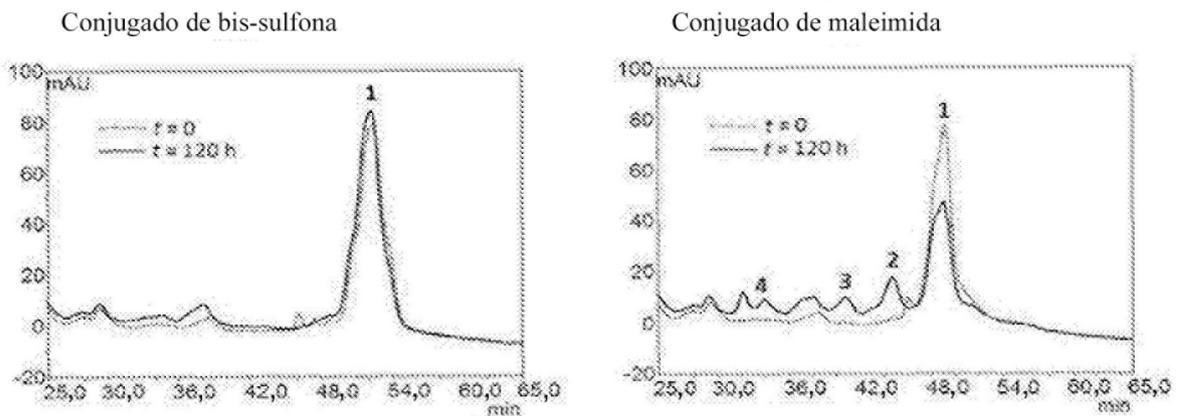


Figura 4

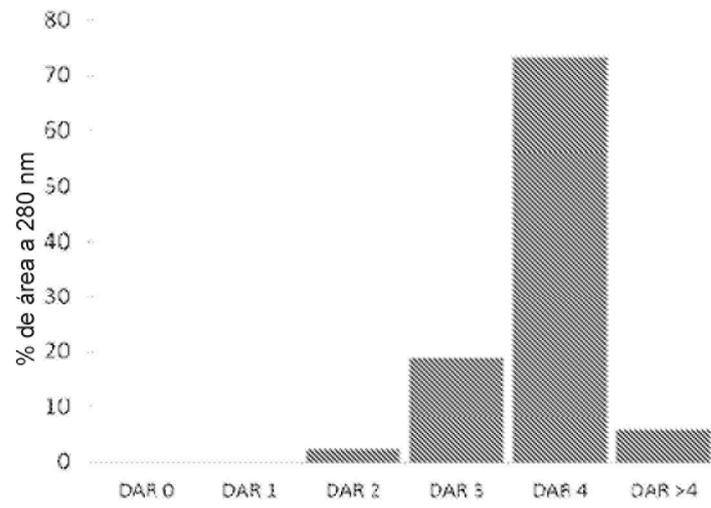


Figura 5

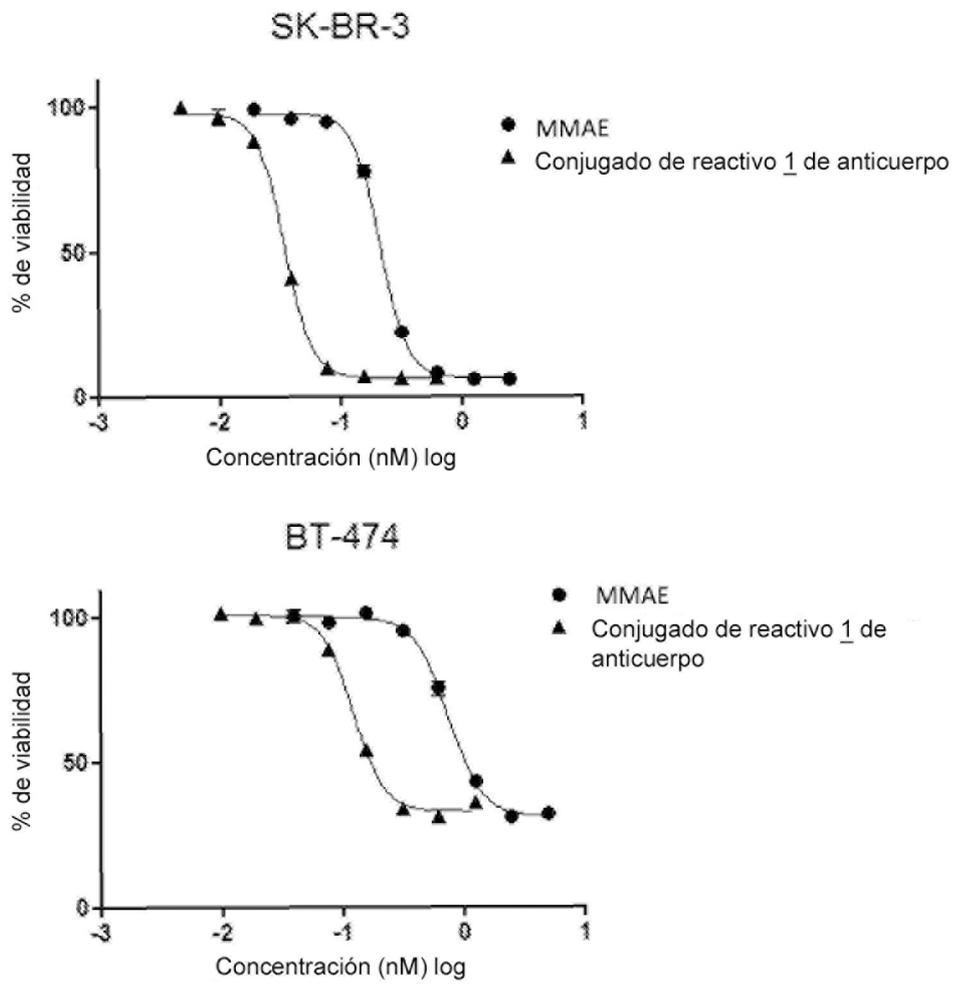


Figura 6

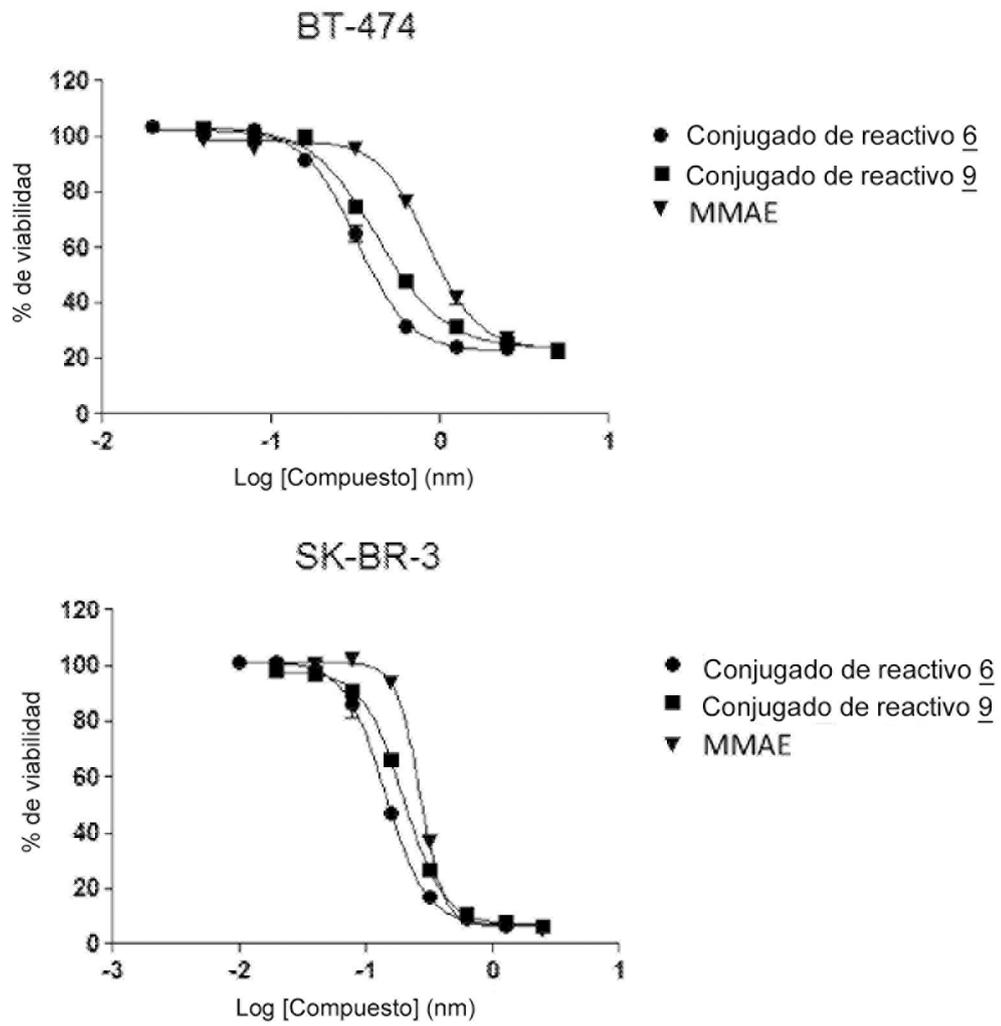


Figura 7

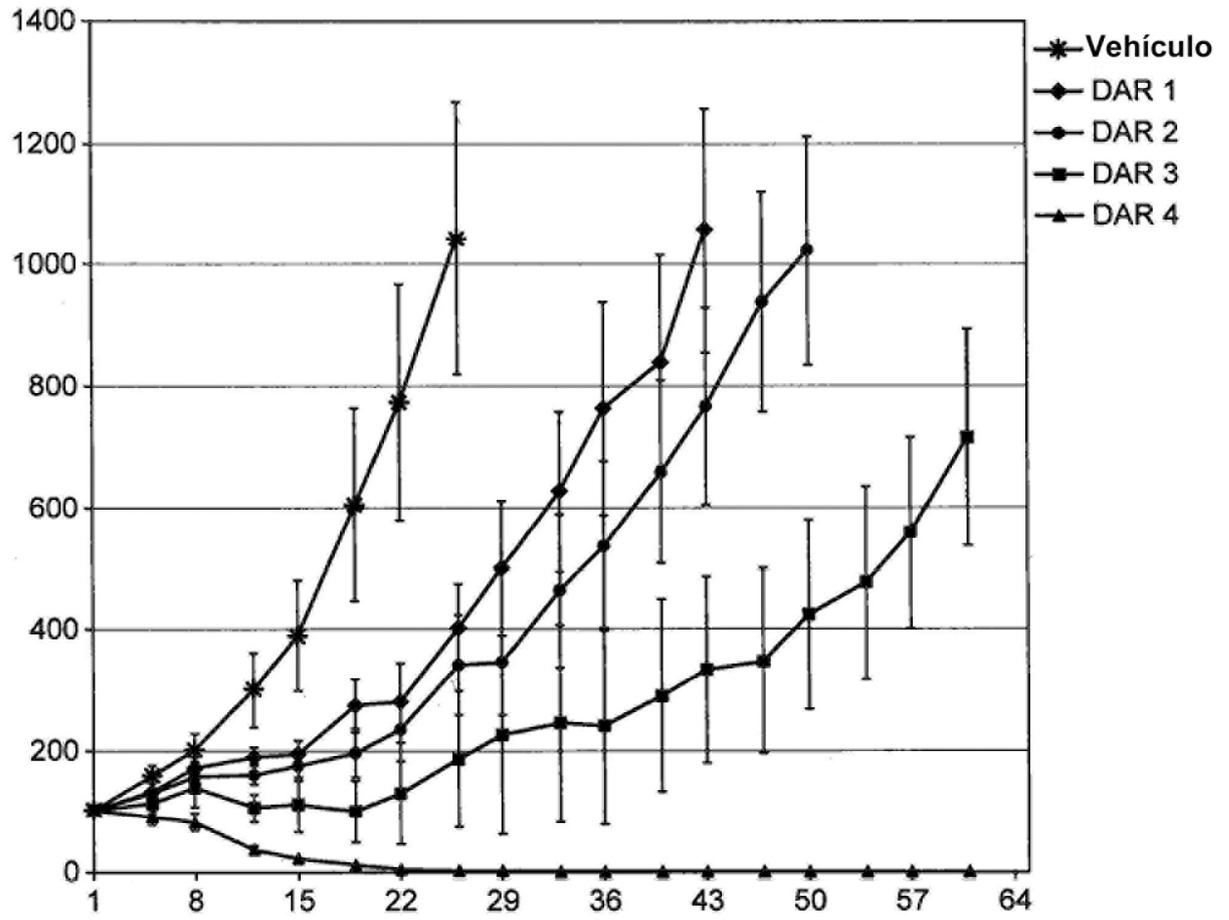


Figura 8

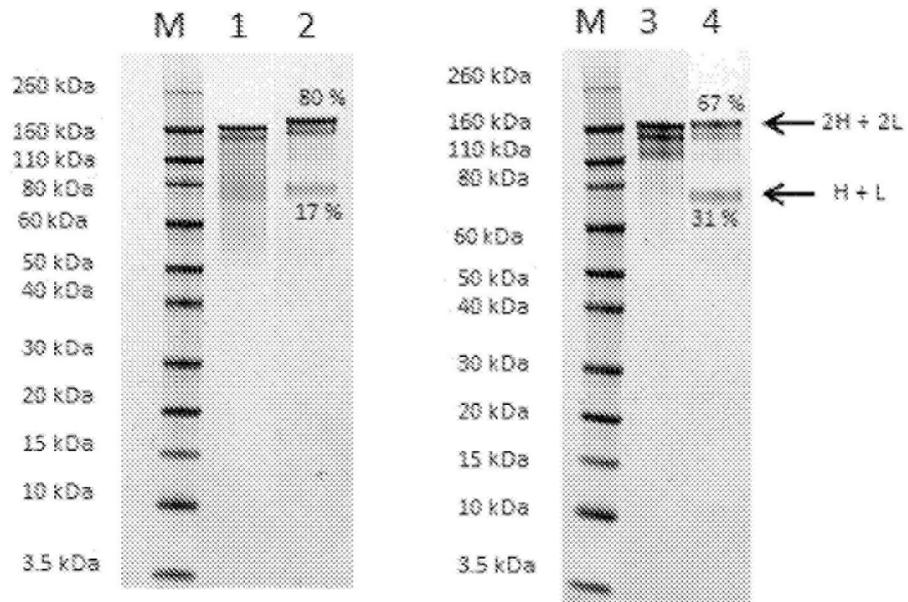


Figura 9