

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 643**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/54** (2007.01)

**A61K 47/62** (2007.01)

**A61K 47/64** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2014 PCT/IB2014/066300**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15079376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2014 E 14815051 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 3074048**

54 Título: **Métodos para la conjugación de oxima con polipéptidos modificados con cetona**

30 Prioridad:

**26.11.2013 US 201361909236 P**  
**23.05.2014 US 201462002614 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.11.2019**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)**  
**Lichtstrasse 35**  
**4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HU, QI-YING y**  
**IMASE, HIDETOMO**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 729 643 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

Métodos para la conjugación de oxima con polipéptidos modificados con cetona

## ANTECEDENTES

5 Se ha adherido covalentemente una amplia diversidad de restos químicos ("cargas") a enzimas, anticuerpos y otros polipéptidos o proteínas grandes, para formar conjugados. Las cargas pueden usarse para ubicar la proteína a la que están adheridas (por ejemplo, marcadores), para modificar las propiedades fisicoquímicas o la estabilidad de la proteína (por ejemplo, PEGilación), para posibilitar que la proteína se adhiera a otra molécula o proteína (grupos de acoplamiento para conectar el conjugado a otro compuesto u otro conjugado) o para modificar la función o actividad de la carga o la proteína (por ejemplo, conjugados de vacuna). La proteína también puede actuar como un vehículo  
10 para suministrar la carga adherida a un tejido o tipo celular particular, tal como en conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC). Las clases de cargas que pueden unirse de forma útil a proteínas incluyen restos detectables (marcadores), restos de anclaje para adherir la proteína a una superficie u otro compuesto, antígenos que provocan una respuesta inmunitaria cuando se conjugan con una proteína, grupos de acoplamiento que reaccionan fácilmente con un compañero de acoplamiento químicamente complementario (conectando de este modo la proteína a otra entidad) y  
15 restos terapéuticos tales como citotoxinas y otros agentes bioactivos. La adhesión de estas diversas estructuras a proteínas de una manera controlada y reproducible a menudo es crítica para que los conjugados funcionen correctamente. Por tanto, hay una necesidad de una diversidad de métodos para adherir muchos tipos de cargas a muchas proteínas o polipéptidos diferentes.

20 Se han desarrollado varios métodos para adherir cargas a proteínas para formar conjugados proteínicos. Véase, por ejemplo, Sletten, E. M. y Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974 - 6998; Baslé, E.; Joubert, N.; y Pucheault, M. *Chemistry & Biology* **2010**, *17*, 213-227. En algunos conjugados proteínicos, el método por el que la proteína y la carga se conectan puede tener impacto indetectable sobre la actividad o las propiedades pertinentes del conjugado; en otros casos, la naturaleza de la unión entre la proteína y la carga puede afectar significativamente a la actividad o las propiedades del conjugado. A veces, es crítico controlar el número de restos de carga por proteína, por  
25 ejemplo, o controlar la ubicación precisa donde se adhieren las cargas de modo que no interfieran con las funciones de la proteína. Los ADC, por ejemplo, requieren que la proteína reconozca y se una a estructuras superficiales en células diana para conferir selectividad, de modo que una carga no debe estar colocada impidiendo la unión del anticuerpo a las estructuras superficiales (antígeno) que el anticuerpo debe reconocer. Véase, por ejemplo, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2012**, *12*, 1191-1206; *Toxins* **2011**, *3*, 848-883; y Laurent Ducry *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy*, 1.<sup>a</sup> edición. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. **2012**, *12*, 355-374.  
30

La mayoría de los métodos para adherir cargas a proteínas implican añadir una estructura química de unión (conector) entre la proteína y la carga particular de interés. El conector proporciona una manera de conectar la carga de interés a la proteína usando grupos funcionales disponibles en cada resto. El conector a menudo permite que la distancia entre la carga y la proteína se module, y también puede incluir una parte escindible que pueda lisarse o degradarse *in vivo* para liberar la carga de la proteína cuando la liberación es importante para que la carga consiga sus objetivos.  
35 Por ejemplo, en ADC, puede ser crítico que el conjugado se descomponga y libere la carga en una ubicación donde puede tener un efecto deseado. A causa de los diversos tipos de conjugados de proteína-carga que requieren diferentes exigencias sobre la manera en que la carga y la proteína se conectan, sigue habiendo una necesidad de métodos novedosos para unir cargas a proteínas de forma constante y eficaz.

40 Los métodos más habituales para formar conjugados proteínicos dependen de la reactividad química de determinados aminoácidos que existen de forma natural en muchas proteínas naturales: a menudo se usan lisina y cisteína porque proporcionan un sitio reactivo para conectar la carga a la proteína. La lisina tiene un grupo amina libre que puede reaccionar con una funcionalidad electrófila adecuada en un grupo de unión o carga, y la cisteína puede reaccionar mediante su grupo sulfhidrilo libre. Sin embargo, dependiendo de estos sitios reactivos de origen natural, puede complicarse:  
45 cuando hay muchos o muy pocos del tipo particular de aminoácido en una proteína de interés, por ejemplo, llega a ser difícil obtener exactamente la "carga" correcta de carga en la proteína. La alta abundancia de lisina en las superficies de la proteína hace que la conjugación selectiva de sitio y regioselectiva sea difícil, y da lugar a productos heterogéneos. En contraste, las cisteínas son comparativamente infrecuentes, y existen principalmente en pares unidos por disulfuro en proteínas. La conjugación en cisteína a menudo requiere la reducción de un disulfuro, seguido de reacción con un reactivo de conjugación (por ejemplo, maleimida) para marcar cisteínas individuales por separado. Como esto elimina un enlace disulfuro, la estructura y la estabilidad de la proteína podrían ser  
50 indeterminadas mediante este proceso.

Las proteínas a menudo también tienen más lisinas que el número óptimo de cargas a adherir: añadir suficientes restos de carga para ocupar todas las lisinas disponibles para garantizar un producto coherente, homogéneo puede  
55 añadir demasiadas moléculas de carga para una eficacia óptima. Esto puede evitarse usando solamente algunas de las lisinas para la conjugación, pero dicha carga parcial o incompleta en general proporcionará un producto heterogéneo, que puede ser problemático por una diversidad de razones, en el caso de Mylotarg™, el primer ADC comercializado, por ejemplo, la heterogeneidad del producto ADC parece haber contribuido probablemente a las cuestiones que dieron lugar a una decisión de retirar el producto del registro.

Fuenmayor, et al., *Cancers*, vol. 3, 3370-93 (2011). Además, incluso cuando hay suficientes grupos aminoácido de un tipo particular (por ejemplo, lisinas) presenten para una carga óptima, algunos o todos ellos puede estar "enterrados" dentro de la proteína cuando la proteína está en su conformación en solución, haciendo que no estén disponibles de forma eficaz para la conjugación, o haciendo que estén "parcialmente" accesibles, lo que también puede provocar heterogeneidad del conjugado. Por tanto, aunque la lisina puede ser un sitio útil para la conjugación, en muchas situaciones no es ideal.

La frecuencia de existencia de cisteína en proteínas naturales es inferior a la de lisina, y la cisteína puede ser adecuada para su uso como un sitio de conjugación cuando está disponible en números adecuados; cuando hay muy pocas cisteínas presentes, puede insertarse una o más por métodos convencionales de modificación de proteínas. Sin embargo, a menudo es preferible evitar la modificación de la secuencia de la proteína natural insertando una cisteína; además, las cisteínas accesibles en superficie en proteínas naturales a menudo están ubicadas cerca de otras cisteínas para formar disulfuros, que pueden ser importantes para mantener la conformación activa de la proteína. Aunque es difícil convertir un disulfuro en dos cisteínas libres reduciendo el disulfuro, hacerlo puede alterar la estructura secundaria o terciaria de la proteína.

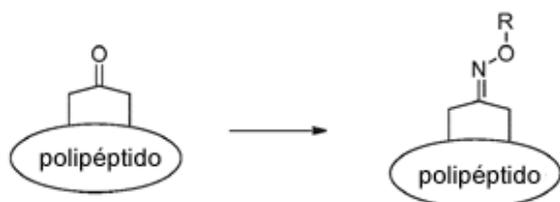
Se ha informado de algunos métodos para intentar la inserción de una fijación entre restos de cisteína formados por reducción de un disulfuro en una proteína. Uno de dichos métodos implica un derivado de metacrilato sustituido con sulfona. Documento US2006/0210526. Este método forma un intermedio reactivo que requiere una etapa de eliminación antes de la ciclación, y las condiciones para ese proceso de múltiples etapas puede provocar la formación incompleta de un conector (fijación) entre cisteínas, y las condiciones de reacción incluso pueden causar desnaturalización de la proteína. Otra estrategia usa un derivado de maleimida. Documento WO2011/018613. Sin embargo, el conjugado formado en este proceso tiene problemas de estabilidad porque la adición de Michael de los tioles en la maleimida es reversible. Por tanto, hay una necesidad de métodos mejorados para conjugar restos químicos con proteínas que contienen enlaces disulfuro para formas conjugados proteínicos. En particular, se necesitan métodos que usen los componentes del disulfuro (sulfhidrilos) sin sacrificar el efecto que controla la conformación del disulfuro, aunque también proporcionando una conjugación eficaz, estabilidad y relaciones de carga/proteína constantes. Además, hay una necesidad de métodos de grapado para mantener las proteínas en una conformación particular (véase, por ejemplo, *Expert Opin. Drug Discov.* (2011) 6(9):937-963; *Tetrahedron* 55 (1999) 11711-11743) que también proporciona un medio para conjugar la proteína grapada con una carga. La presente invención proporciona dichos métodos, incluyendo métodos mejorados para formar una oxima entre una proteína o polipéptido modificado con cetona y un compuesto de alcoxiamina.

El documento WO 2005/007197 A2 divulga la preparación de conjugados proteínicos a partir de proteínas que tienen al menos dos cisteínas que forman un enlace disulfuro, que comprende reducir el enlace disulfuro para proporcionar dos cisteínas libres para la reacción con un conector de bisalquilación de reacoplamiento que tiene un grupo cetona al que puede adherirse un compuesto.

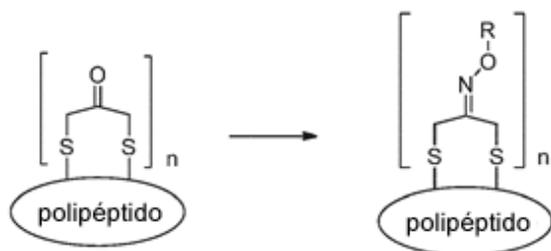
Documento WO 2014/083505 A1, A.T. Shandiz et al., *Biochemistry* 46(48), 13711-13719 (2007), Z.M. Carrico et al., *ACS Nano* 6(8), 6675-6680 (2012) y Xu Q et al., *Molecular Diversity* 8(2), 301-310 (2004) son otras publicaciones que tratan de la producción de proteínas conjugadas con carga.

## SUMARIO

La invención que está representada en las reivindicaciones proporciona métodos mejorados para la conjugación de un polipéptido o proteína modificada con cetona con un compuesto aminooxi (una alcoxiamina o ariloxiamina, por ejemplo) para formar un polipéptido o proteína modificada con oxima como se ilustra en la reacción a continuación. El método implica la selección de condiciones que promuevan la formación de oxima altamente eficaz como se define en las reivindicaciones, proporcionando mayores rendimientos de oxima y formación de oxima más completa; el resultado es un rendimiento mejorado de formación de oxima y, para un polipéptido o proteína que tiene dos o más modificaciones de cetona, homogeneidad mejorada del producto. El método comprende el uso de una amina o sal de amina como promotor, típicamente en un tampón a pH 3-8. Habitualmente, el promotor o el tampón o ambos contendrán un ácido carboxílico, por ejemplo, puede usarse un tampón de acetato o benzoato. Opcionalmente, la amina puede usarse como una sal de carboxilato, o puede ser un compuesto de amina carboxisustituido que puede ser zwitteriónico. La anilina, ácido aminobenzoico, ácido 3,5-diaminobenzoico, hidrazinas y 3,5-dicarboxianilina son aminas adecuadas para su uso en estos métodos.



En una realización preferida, el polipéptido modificado con cetona y la oxima son de las fórmulas mostradas a continuación, en las que los átomos de azufre son de grupos de cisteína en el polipéptido:



donde  $n$  es 2-8, preferiblemente 2 o 4, y  $n$  indica el número de modificaciones de cetona u oximas derivadas de modificaciones de cetona que están presentes en el polipéptido. El polipéptido puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, donde los dos átomos de azufre derivan de enlaces disulfuro intercatenarios del polipéptido. Como los métodos mejorados aumentan la eficacia de la formación de oxima, son particularmente útiles en péptidos donde  $n$  es más de uno, porque mejoran la homogeneidad del producto de conjugación. En anticuerpos, especialmente, cuando hay típicamente cuatro disulfuros disponibles para la modificación de cetona, los métodos mejorados aumentan el rendimiento de productos de conjugación tal como un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) que tiene 4 grupos de carga por molécula de anticuerpo (DAR = 4). La importancia de la homogeneidad en ADC está bien establecida, como se ejemplifica por la historia de Mylotarg™, donde se cree que la heterogeneidad ha contribuido a la retirada del primer ADC aprobado por la FDA estadounidense del mercado.

En un aspecto, la invención representada en las reivindicaciones proporciona un método para usar dos restos de cisteína que forman un disulfuro en la superficie de una proteína para unir una carga a la proteína, formando un conjugado proteínico. El método implica reducir el disulfuro para proporcionar dos grupos tiol libres, y ligar los dos grupos tiol junto con una fijación formada a partir de una 1,3-dihaloacetona que los mantiene en aproximadamente las mismas posiciones que ocupaban cuando formaban un disulfuro. Mantener los grupos cisteína en sus mismas posiciones aproximadas minimiza cualquier efecto adverso en la conformación de la proteína que pueda producirse tras la reducción del disulfuro. La fijación que se introduce para unir los dos grupos tiol juntos contiene un grupo cetona funcional que puede usarse para adherir una carga de interés. La fijación, por tanto, contiene un grupo carbonilo que es suficientemente reactivo para formar un enlace oxima con un grupo amina externo, y la carga se conjuga con la proteína activada formando dicho enlace. La proteína reducida puede hacerse reaccionar con una 1,3-dihaloacetona tal como dicloroacetona o dibromoacetona, insertando de ese modo una fijación de 3 carbonos que conecta los dos átomos de azufre juntos. Esto puede simular adecuadamente el efecto del disulfuro, es decir, mantener la proteína en una conformación muy similar a la que tenía cuando estaba presente el disulfuro, mientras que también proporciona mayor estabilidad que el disulfuro, así como un lugar para adherir una carga. Las fijaciones usadas en los métodos y composiciones de la invención proporcionan un grupo funcional químicamente reactivo, y una proteína que contiene este tipo de fijación entre dos átomos de azufre de cisteína se menciona en este documento como una proteína activada. Una fijación es el conector de cetona obtenido haciendo reaccionar el grupo disulfuro reducido con 1,3-dicloroacetona, es decir,  $-\text{CH}_2\text{-C(O)-CH}_2-$ . Una carga puede adherirse a la proteína activada usando el grupo funcional en la fijación.

La fijación formada haciendo reaccionar los tioles de una proteína con una dihaloacetona proporciona un carbonilo como sitio para conjugación, por ejemplo. Una carga que contiene una amina adecuada (carga aminada), concretamente un aminooxi de fórmula  $\text{R-O-NH}_2$  como se describe adicionalmente en este documento, puede conjugarse fácilmente con dicha proteína activada formando una oxima entre la funcionalidad aminooxi de la carga y el grupo carbonilo (cetona) de la fijación. En una realización preferida, el polipéptido o proteína activada que tiene una cetona insertada entre dos restos de cisteína se pone en contacto con una alcóxiamina ( $\text{RONH}_2$ ) en presencia de un promotor de amina, donde el grupo alcoxi (R) como se define en las reivindicaciones comprende una carga tal como un agente terapéutico o un grupo reactivo que puede usarse para adherir un agente terapéutico. Los promotores de amina adecuados incluyen anilina o una sal de anilinio (por ejemplo, acetato de anilinio, benzoato de anilinio y similares), acilhidrazinas (por ejemplo, acetilhidrazina) o un ácido aminobenzoico tal como PABA, ácido 3-aminobenzoico, ácido 3,5-diaminobenzoico, 3,5-dicarboxianilina y similares. Las condiciones de reacción adecuadas para promover una formación eficaz de oxima se proporcionan en este documento.

Estos métodos pueden aplicarse a cualquier proteína que tenga uno o más enlaces disulfuro accesibles, y típicamente son útiles para proteínas naturales que tienen un peso molecular por encima de 500 Da y típicamente por encima de 2000 Da, donde un disulfuro está presente en la forma nativa o activa de la proteína. Pueden usarse con proteínas que contienen más de un disulfuro, tal como 2-10, o típicamente hasta 6 grupos disulfuro, al menos uno de los cuales es accesible en superficie suficientemente para reducirse por agentes convencionales de reducción de disulfuro. Estos métodos producen un conjugado que contiene al menos una carga para cada grupo disulfuro que se utiliza, y la fijación retiene sustancialmente la conformación nativa o activa de la proteína.

En otra realización, la invención proporciona una manera para grapar una proteína ligando dos restos de cisteína juntos, proporcionando una conformación con rigidez, en la que el método de grapado liga dos cisteínas junto con un enlace que contiene cetona que entonces es útil de acuerdo con la invención representada en las reivindicaciones para conjugar la proteína grapada a una carga. El grapado se consigue haciendo reaccionar una proteína que contiene al menos dos restos de cisteína con una dihaloacetona tal como 1,3-dicloroacetona o 1,3-dibromoacetona para formar

una proteína ciclada que contiene un enlace [cys1]-S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S-[cys2], después permitiendo que el enlace reaccione con un compuesto de aminooxi de fórmula H<sub>2</sub>N-O-L-PL para formar un conjugado mediante la formación de oxima como se describe adicionalmente en este documento. La invención proporciona métodos mejorado de generación de estos péptidos conjugados grapados.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un esquema que ilustra una aplicación de la invención (cuando X es O) que empieza con una proteína que contiene disulfuro y proporciona un conjugado de proteína-carga.

La figura 2 ilustra el acoplamiento de dos conjugados de proteína-carga que tienen grupos de acoplamiento complementarios como sus cargas.

10 La figura 3 muestra los espectros de masas para la proteína de partida, la proteína activada y el conjugado proteínico del ejemplo 1.

La figura 4 muestra el análisis de gel de SDS Page de la construcción de CRM197 sustituida con del ejemplo 1.

La figura 5 muestra una representación esquemática de la proteína activada para el ejemplo 4 y los datos de CL-EM para la proteína activada (modificada con cetona).

15 La figura 6 muestra una representación esquemática de un conjugado de proteína-carga descrito en el ejemplo 4 y los datos de CL-EM para el producto.

La figura 7 muestra un gel del conjugado y el conjugado reducido del ejemplo 6, método A, acompañado de una escala de peso molecular para la comparación. También muestra la CL-EM del producto del método B, que muestra la formación de varios conjugados diferentes.

20 La figura 8 muestra los datos de CL-EM para productos de la etapa 1; etapa 2, método A (PL1); y etapa 2, método B (PL2) del ejemplo 7.

La figura 9 muestra el gel de SDS PAGE y los datos de CL-EM para el producto del ejemplo 8.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES DE LA INVENCIÓN

25 "Proteína" y polipéptido, como se usan en este documento, se refieren a péptidos que contienen cinco o más, típicamente diez o más restos de aminoácido conectados por enlaces amida (peptídicos). Típicamente, las proteínas descritas en este documento comprenden principal o únicamente aminoácidos de origen natural, aunque los métodos son igual de útiles con polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos no naturales. Habitualmente (pero no necesariamente), los aminoácidos son principal o completamente de la configuración L y se seleccionan de los aminoácidos "esenciales" comunes.

30 Abreviaturas

DAR	Relación de fármaco a anticuerpo
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropil carbodiimida
DIPEA	Diisopropil etil amina
35 EDT	Etanoditiol
HBTU	Hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio
MeCN	Acetonitrilo
NMP	N-Metil pirrolidinona
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
40 TCEP	Tris(carboxietil)fosfina
TFA	Ácido trifluoroacético
TIPS	Triisopropil silano

La invención proporciona condiciones mejoradas para la formación de oxima cuando se conjuga un polipéptido modificado con cetona con una alcoxiamina sustituida de fórmula R-O-NH<sub>2</sub> como se define en las reivindicaciones. Las condiciones mejoradas usan un promotor de amina para facilitar la formación de oxima: puede usarse anilina,

pero son más adecuadas anilinas sustituidas, particularmente anilinas carboxisustituidas tales como las divulgadas en este documento. También pueden usarse acilhidrazidas tales como acetilhidrazina o benzoilhidrazida. El promotor de amina puede añadirse como una amina libre, o como una sal de amina que tiene algún contraión adecuado; en algunas realizaciones, se prefiere un contraión carboxilato, tal como acetato o citrato. Típicamente, se usa un exceso del promotor de amina.

La reacción se ejecuta típicamente en un tampón a pH 3-8, preferiblemente pH 4-8. Pueden usarse diversos tampones, incluyendo PBS, Tris, fosfato de sodio, acetato, formiato, citrato y similares para mantener un pH adecuado. Las concentraciones adecuadas de polipéptido para la reacción son mayores que las concentraciones usadas convencionalmente: La concentración de polipéptido es de al menos 1 mg/ml, o de al menos 2 mg/ml, y es preferiblemente de 5 mg/ml o mayor, hasta una concentración donde está comprometida la solubilidad, por ejemplo, hasta 25 mg/ml.

La reacción se realiza típicamente a una temperatura adecuada para mantener la estructura y función del polipéptido; la temperatura es habitualmente entre 4 y 70 °C, preferiblemente entre 10 y 30 °C. Pueden usarse tiempos de reacción de 0,5 a 48 horas: un tiempo de reacción adecuado puede determinarse fácilmente controlando el progreso de la reacción por métodos conocidos. A una temperatura entre 4 °C y 25 °C, en general es suficiente un tiempo de reacción de menos de una hora a 4 horas.

En algunas realizaciones, el método comprende reducir un disulfuro de un polipéptido en presencia de 1,3-dicloroacetona. Los datos proporcionados en este documento demuestran que la adición de dicloroacetona a una solución tamponada del polipéptido antes de la adición del agente reductor que abre el enlace disulfuro proporciona inesperadamente mejora sustancial en el rendimiento del producto. Tener la dicloroacetona presente cuando se inicia la reducción de disulfuro es particularmente importante cuando se reduce más de un enlace disulfuro en un polipéptido. Por ejemplo, cuando el polipéptido es un anticuerpo, la reducción con TCEP reduce cuatro enlaces disulfuro intercatenarios, que permite que la reacción con dicloroacetona introduzca cuatro grupos de fijación que contienen cetona. Cuando la reacción se realiza añadiendo en primer lugar TCEP para iniciar la etapa de reducción antes de añadir dicloroacetona, el rendimiento de anticuerpo completamente modificado fue de aproximadamente un 33-35 % (pH 8,0, TRIS 50 mM como tampón, temperatura ambiente). Aproximadamente un 50 % del producto polipeptídico contenía un fragmento de cadena pesada unido covalentemente a un fragmento de cadena ligera. Cuando se preincubaba 1,3-dicloroacetona con sustrato polipeptídico antes de la adición de TCEP en las mismas condiciones, el rendimiento de anticuerpo completamente modificado aumentó hasta un 75-77 %. La composición del producto para estas reacciones se evaluó por método de electroforesis con SDS en microchip (ref: Electrophoresis 2012, 33, 765-772.) La detección de fragmentos HC-HC, HC-LC y HC-HC-LC indica modificación parcial al producto fijado covalentemente de interés (se ha remplazado uno o dos de los disulfuro intercatenarios por la fijación derivada de dicloroacetona), y el anticuerpo "intacto" correspondiente a  $(HC)_2(LC)_2$  corresponde a anticuerpo tetramérico completamente modificado que tiene cada uno de los disulfuros intercatenarios remplazados por una fijación derivada de dicloroacetona.

Un ejemplo de una aplicación de la invención se muestra en la figura 1. La figura representa una proteína, representada como un círculo y que tiene un grupo disulfuro expuesto. El disulfuro se reduce, formando una proteína reducida que tiene dos tioles libres derivados del disulfuro. Entonces se permite que la proteína reducida reacciones con una dihaloacetona (por ejemplo, 1,3-dicloroacetona o 1,3-dibromoacetona) o (como se divulga con fines de referencia) un bis-electrófilo similar para formar una proteína activada en la que los dos tioles están unidos juntos a través de una fijación funcionalizada: la fijación en este ejemplo contiene un grupo cetona que es relativamente reactivo hacia la formación de base de Schiff. Entonces se une una molécula de carga a la fijación de la proteína activada mediante una formación de base de Schiff para proporcionar un conjugado proteínico. La carga en el ejemplo se adhiere mediante un grupo conector a la fijación. El compuesto de fórmula  $H_2N-X-L-PL$  donde PL es el compuesto de carga contiene un grupo amina activado ( $H_2N-$ ) que está conectado a PL mediante un conector L, y la amina se hace especialmente reactiva usando un aminooxi o (como se divulga con fines de referencia) amina activada similar,  $-X-NH_2$  donde X es O, que facilita la formación de base de Schiff entre el carbonilo de cetona y la amina adherida a PL. Una realización alternativa empieza con una proteína que tiene dos grupos cisteína libres, tal como la proteína reducida en la figura 1, y los usa para "grapapar" la proteína en una conformación limitada mientras proporciona también un punto de adhesión para una carga a conjugar en la proteína grapada.

Los métodos, como se divulga con fines de referencia, son adecuados para su uso con cualquier polipéptido modificado con cetona, pero de acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, son especialmente útiles para formar conjugados a partir de proteínas que contienen al menos un enlace disulfuro entre dos cisteínas, o (como se divulga con fines de referencia) que contienen dos restos de cisteína libres que pueden conectarse juntas por reacción con un reactivo de 1,3-dihaloacetona. Típicamente, la proteína es una donde los dos tioles reacciona con dicloroacetona o dibromoacetona en condiciones descritas en este documento para producir al menos un 50 % de reticulación de los dos tioles, y frecuentemente el grado de reticulación es de al menos aproximadamente un 70 %, 80 % o 90 %.

Las dos cisteínas a unir juntas pueden estar en un único polipéptido, o pueden estar en polipéptidos diferentes que forman un complejo proteínico. En determinadas realizaciones, los métodos utilizan una proteína que tiene 1-6 enlaces disulfuro, o (con fines de referencia) 2-6 restos de cisteína libres, e implican la reducción de al menos uno de estos

disulfuros. La proteína que contiene disulfuro puede ser cualquier polipéptido que tenga al menos 5 restos de aminoácido, preferiblemente al menos 10 aminoácidos, que contenga un enlace disulfuro dentro de una única secuencia polipeptídica o un complejo proteínico donde un disulfuro conecta una secuencia polipeptídica con otro aminoácido o polipéptido, con la condición de que el complejo no se disocie rápidamente cuando el disulfuro se reduzca para la inserción de la fijación entre los átomos de azufre. Las proteínas típicas para su uso en los métodos de la invención incluyen péptidos cíclicos y péptidos lineales que contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 5000 aminoácidos, típicamente al menos 10 aminoácidos y hasta aproximadamente 1000, incluyendo proteínas funcionales tales como enzimas o receptores; complejos proteínicos que tienen al menos un enlace disulfuro (que a menudo conecta dos hebras polipeptídicas separadas); proteínas estructurales; proteínas usadas como armazones de vacuna tales como CRM197 u otras proteínas que tienen actividad adyuvante; y anticuerpos o fragmentos de anticuerpo. Las proteínas particularmente útiles para estos métodos incluyen anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales incluyendo anticuerpos genomanipulados, anticuerpos modificados y fragmentos de anticuerpo; proteínas de vehículo de vacuna tales como CRM197; y proteínas de una hebra que tienen al menos un enlace disulfuro o al menos dos restos de cisteína y que tienen un peso molecular entre 500 y 500 000, típicamente entre 1000 y 200 000. Los métodos para genomanipular un anticuerpo u otra proteína para introducir uno o más restos de cisteína, por ejemplo, y para modificar anticuerpos, son bien conocidos en la técnica.

Los métodos son especialmente útiles con anticuerpos y variantes de anticuerpo que tienen al menos dos disulfuros intercatenarios, incluyendo IgG y Fc. Los métodos también son útiles con proteínas de vehículo de vacuna tales como toxoide diftérico, material no tóxico con reactividad cruzada de toxina diftérica (197) (CRM197), toxoide tetánico, hemocianina de lapa californiana, proteína de membrana externa de *N. meningitidis* y proteína D derivada de *H. influenza* no tipificable. Estas proteínas de vehículo de vacuna pueden funcionalizarse con antígenos por métodos conocidos y/o por los métodos divulgados en este documento. Los presentes métodos también pueden usarse para adherir un compuesto adyuvante tal como un agonista de TLR (un ligando de TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 o TLR9) incluyendo imiquimod, imidazoquinolinas y gardiquimod, ligandos de PRR, ligandos de RLR, ligandos de NOD2, di-AMP cíclico, di-GMP cíclico, flagelina, monofosforil lípido A, muramuldipéptido N-glicolado, oligodesoxinucleótidos CpG (CpG ODN), lipoproteína triacilada, o poli (I:C), para proporcionar una respuesta inmunitaria potenciada.

Los enlaces disulfuro de proteínas que contienen disulfuro para su uso en los métodos y composiciones de la invención se reducen para formar dos grupos tiol libres: los métodos para dicha reducción son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la reducción se realiza usando un agente reductor que reduce selectivamente enlaces disulfuro que son fácilmente accesibles al disolvente alrededor de la proteína: un agente reductor adecuado es tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y sus sales, véase *Analytical Biochemistry* 273, 73-80 (1999). También pueden usarse otros agentes reductores de disulfuro conocidos tales como ditioneitol, 2-mercaptoetanol, cisteamina y ditiobutilamina (JM Perkel, *Chem. Eng'g News*, Feb. 29, 2012; Lukesh, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 4057-59 (2012)) y trialquilfosfinas tales como tributilfosfina (documento WO2008/157380). Los métodos para reducir disulfuros en proteínas son bien conocidos en la técnica.

El grupo conector L puede ser cualquier enlace orgánico adecuado que conecte el compuesto de carga a -X-NH<sub>2</sub>, donde X representa O. Algunos ejemplos de enlaces adecuados incluyen [X]-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-6</sub>-[PL]; [X]-CH<sub>2</sub>C(=O)-[PL]; [X]-CH<sub>2</sub>C(=O)-NH-[PL]; [X]-CH<sub>2</sub>C(=O)-O-[PL]; [X]-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-[PL]; [X]-fenil-C(O)NH-[PL], [X]-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-C(=O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2-10</sub>-NH-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-10</sub>-(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>0-10</sub>-(AA)<sub>0-10</sub>-[PL] (AA puede ser cualquiera de los aminoácidos esenciales, por ejemplo, glu, gly, ala, asp, etc.), y similares, donde n es típicamente 1-20, y [X] y [PL] respectivamente indican el extremo del conector que está adherido a X y el que lo está a PL. En algunas realizaciones, el conector L puede tener dos o tres cargas adheridas para aumentar la carga de la carga en el conjugado, y cuando hay más de una carga adherida a un conector dado, las cargas pueden ser iguales o diferentes. Los conectores adecuados también incluyen combinaciones de los componentes de estos grupos: la naturaleza del conector no es importante para la práctica de la invención y puede basarse en la conveniencia y disponibilidad de los métodos para la adhesión a al menos una carga PL, o en las propiedades fisicoquímicas deseadas para el conjugado. La selección de un conector adecuado pertenece al nivel de las habilidades habituales y depende de la estructura de la carga y los métodos disponibles para modificarlo para adherir el conector L. Típicamente, el conector se adhiere a uno o ambos extremos mediante un grupo amida o éster; frecuentemente el conector L contiene un enlace peptídico o éster para permitir la lisis *in vivo* por las actividades proteasa o esterasa (por ejemplo, val-cit, un dipéptido que se escinde por catepsina B, o Gly-phe-leu-gly, que también es escindible por catepsina B); opcionalmente contiene una o más unidades de óxido de etileno (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); y en muchas realizaciones contiene al menos uno y hasta seis restos de aminoácido. Las realizaciones adecuadas de L también pueden comprender uno o más espaciadores, que pueden seleccionarse de los siguientes grupos:

(a) un enlace, -O-, -S-, -S-S-, -NH-, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- , -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-;

(b) alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -Z-alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-, -Z-alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -Z-alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-Z-alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)-Z-alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)-Z-alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), donde Z es -NH-, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- , -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), fenileno, heteroarileno o heterociclono y donde dicho alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), dicho alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), y dichos restos alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>) cada uno independientemente contiene opcionalmente uno o más átomos de oxígeno intercalados dentro de dichos restos, de modo que los átomos de oxígeno están separados por al menos uno y preferiblemente dos átomos de carbono;

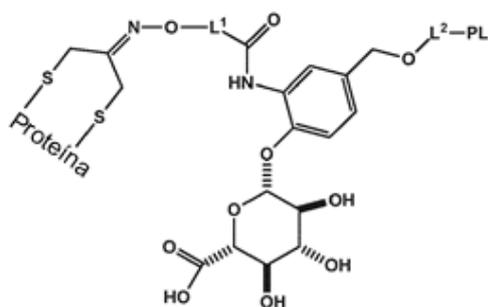
(c) cicloalquileo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), cicloalquileo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-Y-cicloalquileo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), -Y-cicloalquileo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), fenileno, -Y-fenileno, fenileno-Y-fenileno, heteroarileno, Y-heteroarileno, heteroarileno-Y-heteroarileno, heterociclono, -Y-heterociclono, o heterociclono-Y-heterociclono, donde Y es alquileo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), alquilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquinileno(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-, -C(O)-, -S-, -NH-, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, o -NH-C(O)- y donde dicho cicloalquileo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), dicho fenileno, dicho heteroarileno y dichos restos heterociclono cada uno individualmente está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) halosustituido;

(d)  $[-\text{OCH}_2\text{CH}_2]_v$ , donde v es 1-2000, preferiblemente 1-10; y

(e) un péptido que comprende de 1 a 100 aminoácidos, preferiblemente 1-30 o 1-6 aminoácidos;

(f) un conector multivalente que puede portar 2, 3, 4, 5 o 6, o 2-10, restos de carga.

Además, L puede ser o puede comprender un conector escindible tal como Val-Cit (valina-citrulina, un dipéptido que se escinde selectivamente por catepsina B) o val-cit-PABC (p-aminobencilcarbamato de valina-citrulina, véase *Bioconjugate Chem.* 19(10), 1960-63 (2008)), un disulfuro o un conector escindido por glucuronidasa, tal como el conector presente en esta fórmula:



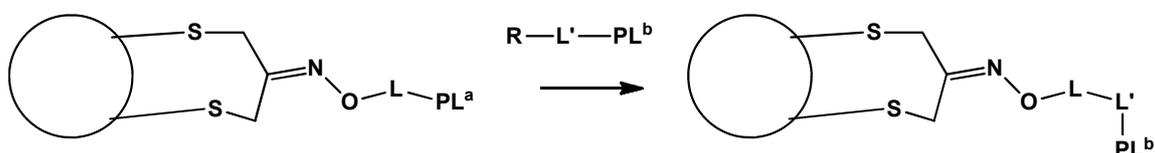
donde Proteína representa una proteína para conjugación, PL representa una carga como se describe en este documento, y L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> son independientemente conectores opcionales tales como los grupos L descritos anteriormente. (*ACS Med. Chem. Letters*, vol. 1, 277-280 (2010)).

La carga (PL) puede ser cualquier resto que sea útil para adherirse a una proteína. Muchos ejemplos de compuestos que pueden adherirse de forma útil a proteínas son conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen restos de marcador que posibilitan que un usuario ubique o identifique la proteína, incluyendo quelantes que se unen a iones metálicos para proporcionar detectabilidad del conjugado; restos de unión tales como biotina o avidina, polinucleótidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, poli-Arg o poli-lys que contienen 5-15 restos de aminoácido, etc., que hacen que sea fácil purificar o aislar la proteína o fijarla a una superficie; grupos modificadores de propiedades tales como grupos ácido graso o polietilenglicol (PEG); grupos antigénicos tales como polisacáridos o proteínas de superficie celular que son características de un tipo particular de célula o bacteria; grupos de acoplamiento que posibilitan que la proteína o péptido modificado se adhiera a otra molécula para generar conjugados más complejos, tales como anticuerpos biespecíficos (véase la figura 2); y compuestos bioactivo incluyendo ácidos nucleicos como ARN, ADN, ARNm, ARNip y fragmentos de estos; compuestos farmacéuticos tales como diversos fármacos terapéuticos; y radionúclidos y citotoxinas, que pueden verse transportados sobre la proteína hasta un tejido o célula deseada donde pueden producir un efecto deseado. Estos compuestos transportados pueden actuar mientras permanecen conjugados a la proteína o una parte de la misma, o en primer lugar pueden desprenderse de la proteína si el grupo conector es uno que puede escindirse fácilmente *in vivo*. Las cargas farmacéuticas adecuadas para su uso con estos métodos incluyen inhibidores de microtúbulos, inhibidores de topoisomerasa I, agentes intercalantes, inhibidores de rutas de señalización intracelular, inhibidores de cinasa, inhibidores de la transcripción tales como ARNip, ARNa y miARN y agentes de unión al surco menor del ADN; estas cargas incluyen clases de compuestos tales como maitansinoides, auristatinas, amanitinas, caliqueamicinas, psimberinas, duocarmicinas, antraciclina, camptotecinas, doxorubicinas, taxoles, pirrolobenzodiazepinas y similares.

Los ejemplos específicos de estas cargas farmacéuticas que tienen usos terapéuticos o de diagnóstico incluyen paclitaxel, docetaxel, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, mitramicina, actinomicina, glucocorticoides, puromicina, epirubicina, ciclofosfamida, metotrexato, citarabina, f-fluorouracilo, platinos, estreptozotocina, minomicina C, antraciclina, dactinomicina o actinomicina, bleomicina, mitramicina, antramycin, duocarmicinas, ifosfamida, mitoxantrona, daunomicina, carminomicina, animoterina, melfalán, esperamicinas, lexitropsinas, auristatinas (por ejemplo, auristatina E, auristatina F, AEB, AEVB, AEFP, MMAE, MMAF), eleutorobina, netropsina, podofilotoxinas, maitansinoides incluyendo maitansina y DM1, y combretastatinas.

Los grupos de acoplamiento adecuados que pueden usarse como cargas (grupos que pueden usarse para acoplar el conjugado a otro resto) incluyen maleimida, tioles, alfa-halocetonas (por ejemplo,  $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{X}$  donde X es cloro, bromo o yodo), ácidos carboxílicos, aminas, hidroxilos, alquenos, alquinos incluyendo octinos cíclicos que pueden usarse en química "click" sin cobre, azida y similares. Los métodos para usar estos grupos de acoplamiento para

conectar los conjugados de la invención a otros compuestos que tienen grupos de acoplamiento complementarios sin bien conocidos en la técnica, e incluyen la adición de Michael de un tiol a una maleimida, alquilación de un tiol con una alfa-halocetona, formación de enlace amida entre amina y un ácido carboxílico, química "click" (véase, por ejemplo, Meldal, et al., *Chem Rev.*, vol. 108, 2952-3015 (2008)) para unir una azida a un alquino formando un anillo 1,2,3-triazol, y química "click sin cobre". Véase, por ejemplo, Meeuwissen, et al. *Polymer Chemistry*, vol. 3, 1783-95 (2012). Los grupos de acoplamiento "complementarios" son dos grupos de acoplamiento que combinan fácilmente para formar un enlace covalente, tales como las parejas mencionadas anteriormente (carboxilato más amina para formar una amida; azida más alquino para formar un 1,2,3-triazol; maleimida más tiol, donde el tiol se añade al doble enlace mediante una adición de Michael; alfa-halocetona más tiol que forma una alfa-tiocetona por alquilación del tiol; etc.). Se proporciona una representación de un conjugado que contiene un grupo de acoplamiento como carga que se está acoplando con un segundo conjugado que contiene un grupo de acoplamiento complementario en la figura 2. En ejemplos particulares, un grupo de acoplamiento para que sirva como carga (PL) se selecciona del grupo que consiste en halógeno,  $-C\equiv CH$ ,  $-C=CH_2$ ,  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-SO_2-CH=CH_2$ ,  $-O-NH_2$ ,  $-N_3$ ,  $-O-P(O)(OH)_2$ ,  $-C(O)-H$ ,  $-C(O)-CH_3$ ,  $-NH-C(O)-CH_2-I$ , maleimidilo, 3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-4-ilo, 1*H*-pirrol-2,5-diona-1-ilo, piridin-2-il-disulfanilo, tetrahidro-1*H*-tieno[3,4-*d*]imidazol-2(3*H*)-ona-4-ilo, 1-carboniloxi-2,5-dioxopirrolidina, 1-carboniloxi-2,5-dioxopirrolidina-3-sulfonato de sodio,  $-SSR^1$ ,  $-C(O)-OR^1$ ,  $-N(R^1)H$ ,  $-NH-N(R^1)H$ , donde  $R^1$  es H o alquilo ( $C_1-C_6$ ), y  $-C(O)-R^2$ , donde  $R^2$  es H, alquilo ( $C_1-C_4$ ), alquilo ( $C_1-C_4$ ) halosustituido,  $-CH=CH_2$ ,  $N(R^1)H$  o  $-NH-N(R^1)H$ . Cuando estas cargas se usan como una carga inicial ( $PL^a$ ), el conjugado puede hacerse reaccionar con un compuesto que comprende una segunda carga ( $PL^b$ ), y puede introducir un conector adicional  $L'$  en la formación de un nuevo conjugado:



$PL^a$  es grupo de acoplamiento, por ejemplo, maleimida, tiol protegido,  $N_3$ , alquino

R es el grupo reactivo complementario para  $PL^a$

$PL^b$  es una nueva carga, tal como un marcador o agente biológico, incluyendo proteínas, anticuerpo, ARNip, toxinas, etc.

Obsérvese que en estas reacciones, los expertos en la materia entenderá que L y  $L'$  pueden retener una parte de  $PL^a$  y/o R, dependiendo de la reacción que se esté usando para conectar la nueva carga,  $PL^b$ .

Las siguientes realizaciones enumeradas ilustran aspectos particulares de la invención.

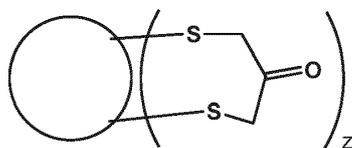
1. Un método como se define en las reivindicaciones para convertir un polipéptido modificado con cetona en un polipéptido modificado con oxima, en el que el método comprende poner en contacto el polipéptido modificado con cetona con un grupo de fórmula  $R-O-NH_2$  en presencia de un promotor de amina.

2. El método de la realización 1, en el que el promotor de amina es anilina, una anilina sustituida incluyendo ácido 3,5-diaminobenzoico o 3,5-dicarboxianilina, o una acilhidrazida tal como acetilhidrazida.

En estos métodos, el polipéptido modificado con cetona se forma a partir de un disulfuro reduciendo el disulfuro para formar dos tioles libres; y los tioles libres se unen juntos por reacción con 1,3-dicloroacetona o 1,3-dibromoacetona. En una realización particular de este método, un polipéptido que tiene un enlace disulfuro reducible se pone en contacto con un agente reductor tal como, aunque sin limitación, TCEP y 1,3-dicloroacetona en un tampón, tal como, aunque sin limitación, TRIS o PBS. El polipéptido y el tampón se combinan con 1,3-dicloroacetona antes de añadir el agente reductor, de modo que hay 1,3-dicloroacetona presente según se produce la reducción.

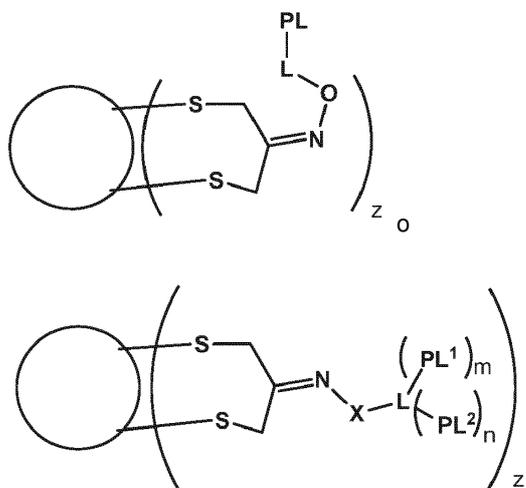
3. En el método de la realización 1 o 2, el grupo de fórmula  $R-O-NH_2$  es un compuesto de fórmula  $H_2N-O-L-PL$ , donde L representa un conector y PL representa un grupo de carga.

4. El método de la realización 1, en el que el polipéptido modificado con cetona es de fórmula



donde el círculo representa el polipéptido, y cada átomo de azufre es el sulfhidrilo de un resto de cisteína del polipéptido, y z es un número entero de 1 a 10.

5. El método de cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el conjugado de polipéptido-carga es un conjugado de proteína-carga de fórmula:



5 en la que X es O, L representa un conector, y PL, PL<sup>1</sup> y PL<sup>2</sup> independientemente cada vez que aparecen representan un grupo de carga, donde m y n son cada uno independientemente de 1 a 10; z es 1-10, preferiblemente 1-5, con la condición de que m y n no sean ambos 0.

6. El método de cualquiera de las realizaciones precedentes, en el que el polipéptido es un anticuerpo (por ejemplo, IgG, Fab o F(ab)<sub>2</sub>, Fc).

10 7. El método de cualquiera de las realizaciones 1-5, en el que el polipéptido es un vehículo de vacuna.

8. El método de cualquiera de las realizaciones 1-8, en el que la carga comprende un agente terapéutico.

9. El método de cualquiera de las realizaciones 1-7, en el que la carga comprende un marcador detectable o un grupo reactivo adecuado para adherir un grupo de carga que comprende un grupo reactivo complementario.

10. El método de la realización 8, en el que L comprende un resto conector escindible.

15 11. El método de una cualquiera de las realizaciones 1-10, en el que L comprende al menos un espaciador seleccionado de:

(a) un enlace, -O-, -S-, -NH-, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))H-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-;

20 (b) alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -Z-alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-, -Z-alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -Z-alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-Z-alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)-Z-alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)-Z-alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), donde Z es -NH-, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- , -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), fenileno, heteroarileno o heterociclono y donde dicho alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), dicho alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), y dichos restos alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>) cada uno independientemente contiene opcionalmente 1-10 átomos de oxígeno intercalados dentro de dichos restos;

25 (c) cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-Y-cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), -Y-cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), fenileno, -Y-fenileno, fenileno-Y-fenileno, heteroarileno, Y-heteroarileno, heteroarileno-Y-heteroarileno, heterociclono, -Y-heterociclono, o heterociclono-Y-heterociclono, donde Y es alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-, -C(O)-, -S-, -NH-, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))H-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, o -NH-C(O)- y donde dicho cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), dicho fenileno, dicho heteroarileno y dichos restos heterociclono cada uno individualmente está opcionalmente sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados de halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) halosustituido;

30 (d) -[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>-, -X[CH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>]- donde v es 1-2000, w es 1-4; X es C o N y

(e) un péptido que comprende de 1 a 100 aminoácidos; y

(f) macromoléculas dendríticas, incluyendo dendrímeros, dendrones y polímeros hiperramificados.

35 12. Un método como se define en las reivindicaciones para convertir un polipéptido que comprende un enlace disulfuro reducible en un polipéptido modificado con cetona que comprende un grupo de fórmula [PP]-S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S-[PP], donde cada S es un azufre del enlace disulfuro, y [PP] indica el lugar donde los extremos del grupo conector están adheridos al polipéptido,

en el que el método comprende formar una mezcla de un polipéptido que contiene un enlace disulfuro reducible, un tampón acuoso y 1,3-dihaloacetona, añadir después un agente reductor que puede reducir el enlace disulfuro.

13. El método de la realización 12, en el que la 1,3-dihaloacetona es 1,3-dicloroacetona.

14. El método de la realización 12 o 13, en el que el agente reductor es una fosfina soluble en agua o sal de fosfina. TCEP es un agente reductor adecuado.

15. El método de cualquiera de las realizaciones 12-14, en el que el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Adecuadamente, el polipéptido es un anticuerpo, que puede ser monoclonal y puede estar humanizado. Los anticuerpos contra antígenos que son característicos de células cancerosas son polipéptidos adecuados.

16. (Como se divulga con fines de referencia) Un método para convertir un polipéptido modificado con cetona en un polipéptido modificado con oxima, en el que el método comprende poner en contacto el polipéptido modificado con cetona con un grupo de fórmula R-O-NH<sub>2</sub> en presencia de un promotor de amina y a una concentración de polipéptido de al menos aproximadamente 1 mg/ml. Típicamente, R en estos métodos comprende una carga como se describe en este documento, y un conector. Las cargas adecuadas incluyen maitansinoides (por ejemplo, DM1, DM4), auristatinas (por ejemplo, MMAE, MMAF), amanitinas, caliqueamicinas, psimberinas, duocarmicinas, antraciclinas, camptotecinas, doxorubicinas, taxoles, pirrolobenzodiazepinas y similares.

17. El método de la reivindicación 5, en el que el polipéptido modificado con cetona se genera por el

Los métodos de la invención, como se resumen en la figura 1 y se define en las reivindicaciones, implican reducir un disulfuro de una proteína a modificar, formando una proteína reducida que contiene dos grupos tiol libres. La proteína reducida se pone en contacto con un compuesto de fijación funcionalizado que puede reaccionar con ambos tioles libres en la proteína reducida para fijar los tioles libres juntos, reteniendo también al mismo tiempo al menos un grupo funcional en la fijación que es adecuada para adherir una carga. En algunas realizaciones, el grupo funcional en la fijación es un grupo carbonilo, por ejemplo, la cetona obtenida cuando se permite que los tioles libres reaccionen con una 1,3-dihaloacetona. Como los tioles libres son fuertemente nucleófilos, reaccionan fácilmente con electrófilos tales como haluros de alquilo o tosilatos de alquilo, mediante reacciones irreversibles que implican desplazar un grupo saliente y formar un enlace covalente de azufre-carbono. Algunos ejemplos adecuados de compuestos de fijación que contienen carbonilo funcionalizados incluyen 1,3-dicloroacetona y 1,3-dibromoacetona. Estos reactivos se han usado para proporcionar estabilización de restos disulfuro en péptidos cíclicos pequeños fijando sulfhidrilos juntos. Véase, por ejemplo, el documento WO2008/157380 (reacción de dicloroacetona con un pentapéptido cíclico reducido, seguido de reducción del carbonilo). Con fines de referencia, también pueden usarse sulfonatos de 1,3-dihidroxiacetona (por ejemplo, mesilato, triflato, fenilsulfonato, tosilato y similares). Estos reactivos son suficientemente reactivos hacia los tioles libres de una proteína reducida para proporcionar reacción razonablemente rápida para formar una proteína activada con dos restos de cisteína fijados juntos, en la que cada uno de los tioles libres está adherido covalentemente al grupo de fijación funcionalizado.

La proteína reducida y el compuesto de fijación funcionalizado se ponen en contacto en condiciones adecuadas para promover la reacción entre el compuesto de fijación y los dos tioles libres de la proteína reducida, y particularmente en condiciones de concentración y temperatura que favorezcan provocar que ambos tioles libres que se unieron previamente en un enlace disulfuro reaccionen con una única molécula del compuesto de fijación de modo que una vez más se ligen juntos, pero ahora con una corta fijación conectándolos en lugar de un enlace disulfuro directo. Esta reacción forma una proteína activada como se ilustra en la figura 1, que tiene una fijación funcionalizada [-CH<sub>2</sub>C(O)-CH<sub>2</sub>-] entre los dos átomos de azufre. La fijación en la figura 1 incluye un carbonilo que puede usarse para adherir de forma eficaz una carga mediante química de formación de bases de Schiff limpia y eficaz.

Se entiende en toda la discusión que la proteína, aunque se representa como un círculo o esfera, puede ser un polipéptido pequeño de menos de 10 aminoácidos o una enzima grande o complejo de dos o más subunidades o proteínas distintas. Los dos átomos de azufre del disulfuro pueden estar en una subunidad de un complejo multimérico, o pueden estar en subunidades diferentes. Además del disulfuro que participa en las transformaciones descritas en este documento, la proteína también puede contener otros enlaces disulfuro que pueden reducirse y funcionalizarse, o pueden no reducirse debido a su ubicación dentro de la proteína. Aunque se muestra únicamente un disulfuro, grupo de fijación o conjugación, se entiende que un polipéptido o proteína que comprende uno de dichos disulfuros, grupos de fijación o conjugación también puede contener más de uno. Los métodos de la invención pueden utilizar métodos conocidos para reducir selectivamente enlaces disulfuro accesibles al disolvente cerca de la superficie de la proteína plegada, a menudo sin reducir los disulfuros "enterrados" que pueden ser esenciales para mantener la forma global y funcionalidad de la proteína, o para mantener dos subunidades unidas juntas en un complejo de múltiples subunidades. Como ilustran los ejemplos, una proteína o polipéptido puede contener más de un grupo de fijación funcionalizado y, por tanto, puede contener más de un sitio de conjugación, aunque se representa típicamente uno solamente por simplicidad.

Una vez se ha formado la proteína activada, puede adherirse una carga a la fijación funcionalizada. Por ejemplo, y por motivos de referencia, una carga que contiene amina (o aminada) puede adherirse a la fijación formada a partir de dihaloacetona formando una base de Schiff entre la amina de la carga y la cetona de la fijación. Los compuestos de

carga adecuados contienen un grupo amina -NH<sub>2</sub> que es accesible y reactivo; en realizaciones preferidas, la amina es una que se activa hacia la formación de una base de Schiff. Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen (en la invención definida en las reivindicaciones) oxiaminas (X = O), o (por motivos de referencia) tioaminas (X = S), e hidrazinas (X = NH), por ejemplo: estas aminas sustituidas con heteroátomo son conocidas por condensarse fácilmente con cetonas tal como la de la fijación de una proteína activada formada a partir de una dihaloacetona como se muestra en la figura 1.

La proteína activada típicamente se pone en contacto con una carga que contiene amino sin purificación o aislamiento de la proteína activada. Con fines de referencia, un grupo -NH<sub>2</sub> libres en la carga (PL) puede usarse si está disponible, pero si no hay ninguno disponible, se puede añadir unir mediante un grupo conector como se ilustra en la figura 1 y en los ejemplos para formar el compuesto de fórmula H<sub>2</sub>N-O-L-PL como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, una vez generada la proteína activada, se añade la amino-carga a la mezcla de reacción donde se forma la proteína activada en condiciones que promueven la formación de la base de Schiff deseada. La amino-carga entonces reacciona mediante su grupo amina con el carbonilo de la proteína activada como se ilustra en la figura 1, formando de ese modo el conjugado de proteína-carga deseado, en el que X es O (realización de la invención), o con fines de referencia NH o N sustituida; L es un grupo conector; y PL representa una carga.

### Ejemplos

Se usan los siguientes métodos de HPLC en los ejemplos a continuación.

**Método A:** Eluyente A: agua + 0,1 % de ácido fórmico, eluyente B: acetonitrilo + 0,08 % de ácido fórmico

Gradiente: de un 3 a un 80 % de B en 2 min - flujo 1,0 ml/min. Columna: Proswift Monolith 4,6\*50 mm 40 °C

**Método B:** Eluyente A: agua + 0,1 % de ácido fórmico, eluyente B: acetonitrilo + 0,04% de ácido fórmico

Gradiente: de un 3 a un 80 % de B en 2 min - flujo 1,0 ml/min. Columna: Proswift Monolith 4,6\*50 mm 40 °C

**Método C:** Eluyente A: agua + acetato amónico 3,75 mM + 2 % de acetonitrilo, eluyente B: acetonitrilo

Gradiente: de un 2 a un 98 % de B en 1,7 min - flujo 1,0 ml/min. Columna: Acquity CSH 2,1\*50 mm 50 °C

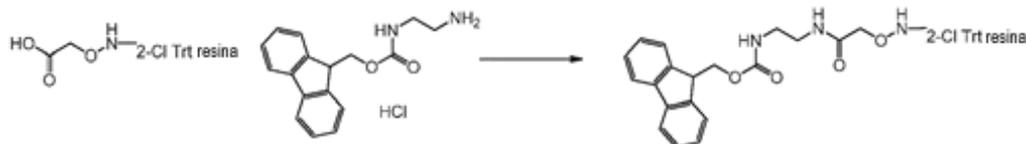
**Método D (EMAR):** Eluyente A: agua + 0,05 % de ácido fórmico + acetato amónico 3,75 mM, eluyente B: acetonitrilo + 0,04 % de ácido fórmico.

Gradiente: de un 2 a un 98 % de B en 4,4 min - flujo 1,0 ml/min. Columna: Acquity CSH 2,1\*50 mm 50 °C

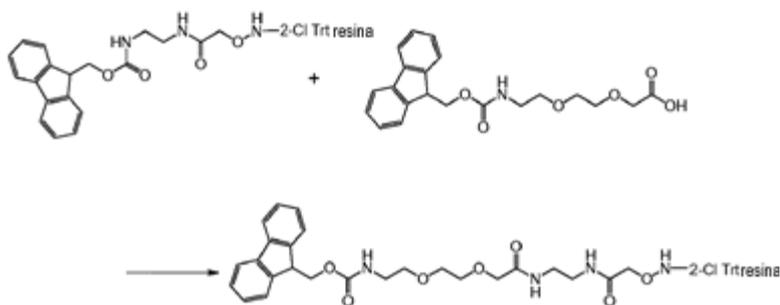
### Síntesis de un conector



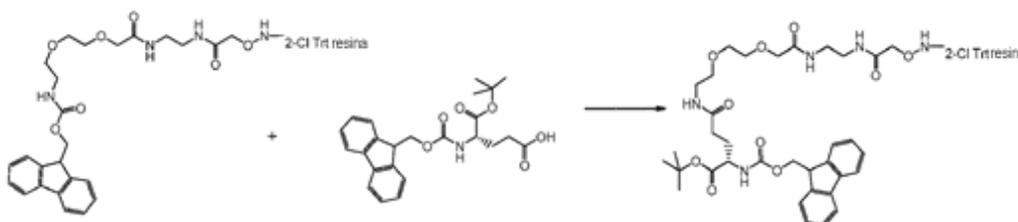
Una resina de cloruro de 2-clorotritilo (1,55 mmol/g) (0,500 g, 0,775 mmol) en objeto de cristal de 100 ml se hinchó en DCM (20 ml) durante 30 min y se drenó. Una suspensión de hemiclóridato del ácido 2-(aminooxi)acético (0,338 g, 3,10 mmol) y DIPEA (1,354 ml, 7,75 mmol) en NMP (7 ml)/DCM (4 ml) se añadieron a la resina, que se agitó durante 5 h. Se drenó el disolvente. La resina se aclaró con DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1, 40 ml), DCM(50 ml), NMP(50 ml) y DCM(50 ml) respectivamente. La resina resultante se secó con KOH/NaOH durante una noche.



La resina (0,775 mmol) en objeto de vidrio de 100 ml se hinchó en DCM (20 ml) durante 30 min y se drenó. A una suspensión de clorhidrato de 2-aminoetilcarbamato de (9H-fluoren-9-il)metilo (0,081 g, 0,775 mmol), HOAt (0,422 g, 3,10 mmol) y DIPEA (1,354 ml, 7,75 mmol) en NMP (8 ml) se añadió HBTU (1,176 g, 3,10 mmol) en NMP (2,5 ml), que se agitó durante 2 h a TA. Se drenó el disolvente y la resina se aclaró con NMP (10 ml) y DCM (10 ml) secuencialmente. La resina resultante se secó durante una noche.

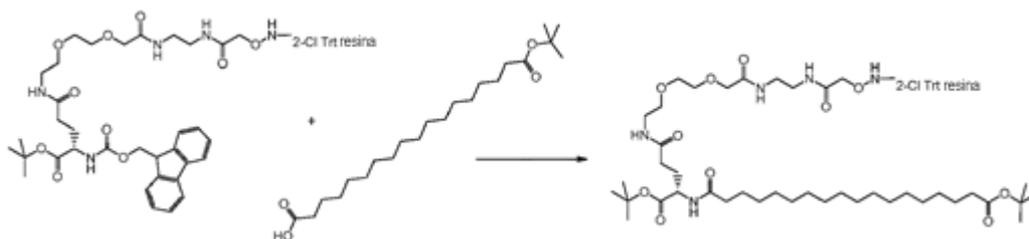


5 La resina (0,775 mmol) se cargó en un recipiente de reacción. Se añadieron 10 ml de PIPERIDINA/NMP al 20 % (v/v) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. Después de drenar el disolvente, se añadieron 10 ml adicionales de PIPERIDINA/NMP al 20 % (v/v) y se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Una solución de HOAt (0,316 g, 2,325 mmol) y ácido 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-oico (0,896 g, 2,325 mmol) en NMP (8 ml) se añadió a la resina y se añadió DIC (0,362 ml, 2,325 mmol) en NMP (1 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente y la resina se retiró por filtración y se aclaró con NMP (10 ml) cuatro veces. La resina resultante se secó durante una noche.

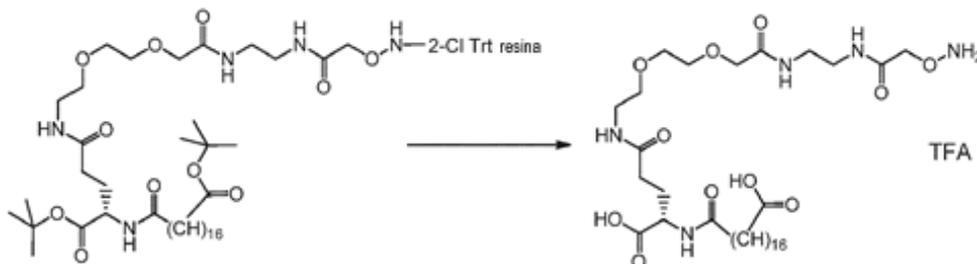


10 La resina (0,775 mmol) se cargó en un recipiente de reacción. Se añadieron 10 ml de PIPERIDINA/NMP al 20 % (v/v) a la resina y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. Después de drenar el disolvente, se añadieron 10 ml adicionales de PIPERIDINA/NMP al 20 % (v/v) y se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Una solución de HOAt (0,316 g, 2,325 mmol) y Fmoc-Glu-OtBu (0,989 g, 2,325 mmol) en NMP (8 ml) se añadió a la resina y se añadió DIC (0,362 ml, 2,325 mmol) en NMP (2,00 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración y se aclaró con NMP (10 ml) cuatro veces. La resina resultante se secó durante una noche.

Adhesión de una carga al conector



20 La resina (resina de cloruro de 2-clorotritilo, 0,775 mmol) se cargó en un recipiente de reacción. Se añadieron 10 ml de PIPERIDINA/NMP al 20 % (0,775 mmol, v/v) a la resina y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 5 min. Después de drenar el disolvente, se añadieron 10 ml adicionales de PIPERIDINA/NMP al 20 % (0,775 mmol) y se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Una solución de ácido 18-terc-butoxi-18-oxooctadecanoico (0,862 g, 2,325 mmol) y HOAt (0,316 g, 2,325 mmol) en NMP (8 ml) se añadió a la resina y se añadió DIC (0,362 ml, 2,325 mmol) en NMP (2,00 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración y se aclaró con NMP (10 ml) cuatro veces. La resina resultante se secó durante una noche.

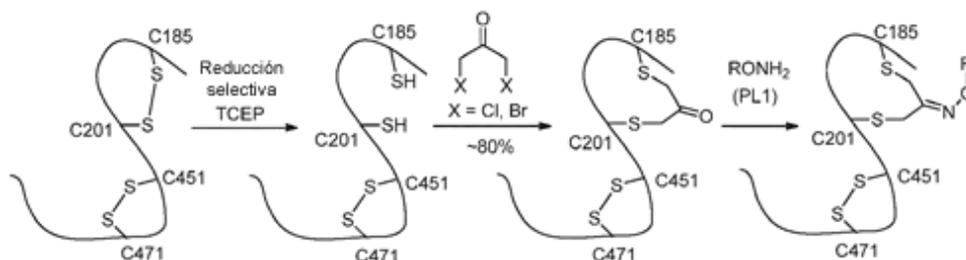


PL1

La resina de la etapa precedente (0,775 mmol) se trató con 20 ml de cóctel de escisión (TFA/TIPS/agua = 95/2,5/2,5, v/v) durante 1,5 h a temperatura ambiente. La resina se retiró por filtración y se aclaró con TFA. El filtrado se concentró al vacío. La RP-HPLC con columna C18 eluyendo con MeCN/agua al 15-50 % más TFA al 0,1 % dio ácido (S)-1-(aminoxil)-19-carboxi-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetraazaocotriacontan-38-oico con ácido 2,2,2-trifluoroacético (1:1) (207 mg, 0,294 mmol, 37,9 % de rendimiento) (PL1). EMAR [M+1] (método D); 704,4459 (observado), 704,4486 (esperado).

### Ejemplo 1 (Ejemplo de referencia)

CRM197 (ref: G. Giannini y R. Rappuoli, *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 25, 4063.) se trató con TCEP (xx), provocando la reducción del disulfuro C201-C185, con poca o ninguna reducción del disulfuro C451-C471 (véase el ejemplo 3). El CRM197 reducido se trató con 1,3-dicloroacetona para proporcionar la proteína activada, que tiene el disulfuro C451-C471 intacto y con C201 fijado a C185 mediante un enlace -CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-. Esta proteína activada se puso en contacto con PL1, conteniendo el derivado de ácido graso aminado un grupo aminooxil cuya preparación se describe a continuación, para formar una unión oxima del derivado de ácido graso con la proteína. Se espera que el conjugado con el grupo ácido graso adherido reduzca la eliminación renal, prolongando, por tanto, la semivida en circulación de la proteína CRM197 y aumentando su utilidad como vehículo en vacunas de conjugado. Los datos espectrales de masas para la proteína nativa (figura 3A, usando método A), la proteína activada (figura 3B) y el conjugado proteínico (figura 3C) se proporcionan en la figura 3.



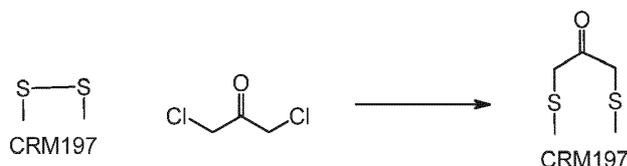
Síntesis de un compuesto azido de sitio definido que alberga CRM197

### Método A -

Eluyente A: agua + 0,1 % de ácido fórmico, eluyente B: acetonitrilo + 0,1 % de ácido fórmico

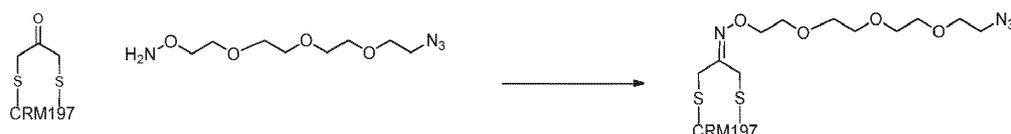
Gradiente: de un 3 a un 80 % de B en 2 min - flujo 1,8 ml/min. Columna: AcQuity BEH300 SEC 4,6 x 30 mm 50 °C

Análisis de gel de SDS Page - Gel de Bis-Tris al 4-12 % NuPage; 1,5 mm\*10 pocillos



A CRM197 (32,5 mg/ml) (185 µl, 0,103 µmol) en tampón de fosfato de sodio pH 7,4 (230 µl) se le añadió TCEP HCl (3 mg/ml, agua, 58,9 µl, 0,616 µmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h seguido de la adición de 1,3-dicloropropan-2-ona (20 mg/ml, en DMSO, 13,04 µl, 2,054 µmol). La reacción se agitó durante 3,5 h, después se pasó a través de columna de exclusión molecular de centrifugación Zeba™ de 0,5 ml (7K MWCO, de Thermo Scientific) y se intercambió el tampón a tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 6 para producir el CRM197 que alberga cetona (6,78 mg/ml, 1,3 ml, método Nanodrop)

CLEM [M+1] = 58465



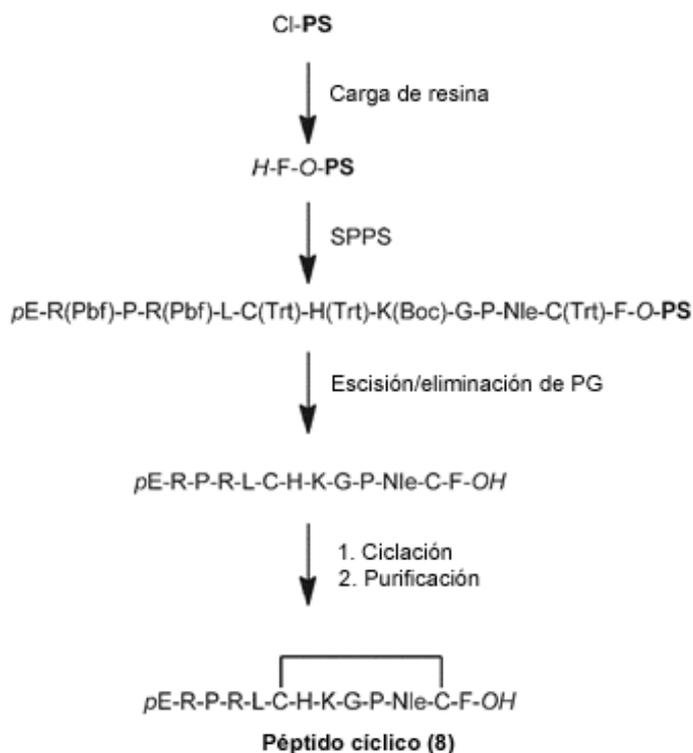
A una solución de CRM197 modificado con cetona (6,78 mg/ml - tampón de fosfato de sodio pH 6, 1,3 ml, 0,151 µmol) se añadió O-(2-(2-(2-(2-azidoeto)eto)eto)eto)etil)hidroxilamina (300 mg/ml - DMSO) (0,044 ml, 0,045 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 36 h a 23 °C, después se pasó a través de columna de centrifugación Zeba™ de 5 ml eluyendo con PBS 7,4 para proporcionar el compuesto del título (4,41 mg/ml, 1,6 ml, 80 % de rendimiento, método Nanodrop)

CLEM [M+1] = 58682,5

La figura 4 muestra la SDS Page para el compuesto del título, el CRM197 modificado.

Referencia - Ejemplo 2

Preparación del material de partida: Síntesis de  $\rho$ E-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH (disulfuro C<sup>6</sup>-C<sup>12</sup>) (**8**)



5

• Preparación de **intermedio 8a**

(Carga de resina de cloruro de 2-clorotritilo con Fmoc-F-OH, eliminación de Fmoc y determinación de la carga de la resina)

10 La resina de cloruro de 2-clorotritilo (40,0 g, 64,0 mmol) se lavó con DCM (3 x). Se añadió una solución de Fmoc-F-OH (24,8 g, 64,0 mmol) en DCM (400 ml) y DIPEA (44,7 ml, 256 mmol) y la suspensión se agitó durante 22 h a temperatura ambiente. La resina se lavó minuciosamente con DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1) (3 x), DCM (3 x), DMA (3 x), DCM (3 x). La resina entonces se trató cuatro veces durante 10 min con una mezcla de piperidina/DMA (1:4) (400 ml) seguido de lavado con DMA (2 x 180 ml). Las soluciones de piperidina/DMA y las soluciones de lavado de DMA se recogieron para la determinación de la carga de la resina. Se diluyó 1 ml de las soluciones combinadas e 500 ml

15 con MeOH y se midió la absorción de UV a 299,8 nm en A = 0,368. Esto corresponde a una cantidad de Fmoc de 46,2 mmol. La resina se lavó minuciosamente con DCM (3 x), DMA (3 x), DCM (3 x) y se secó al vacío para dar **intermedio 8a** (50,7 g; carga = 0,91 mmol/g).

• Preparación de **intermedio 8b** (Ensamblaje de péptido lineal)

20 El **intermedio 8a** (2,64 g, 2,40 mmol) se sometió a síntesis peptídica en fase sólida en el sintetizado peptídico Prelude™. El acoplamiento se realizó de la siguiente manera:

Acoplamiento	AA	Número de acoplamientos x tiempo de reacción	Ciclo de síntesis
1	C(Trt)	2 x 30 min	D
2	Nle	2 x 15 min	A
3	P	2 x 15 min	A

4	G	2 x 30 min	A
5	K(Boc)	2 x 15 min	A
6	H(Trt)	2 x 15 min	A
7	C(Trt)	2 x 60 min	D
8	L	2 x 15 min	A
9	R(Pbf)	4 x 1 h	A
10	P	2 x 15 min	A
11	R(Pbf)	4 x 1 h	A
12	pE	2 x 15 min	A

• Preparación de **intermedio 8c** (*Escisión de la resina con eliminación del grupo protector*)

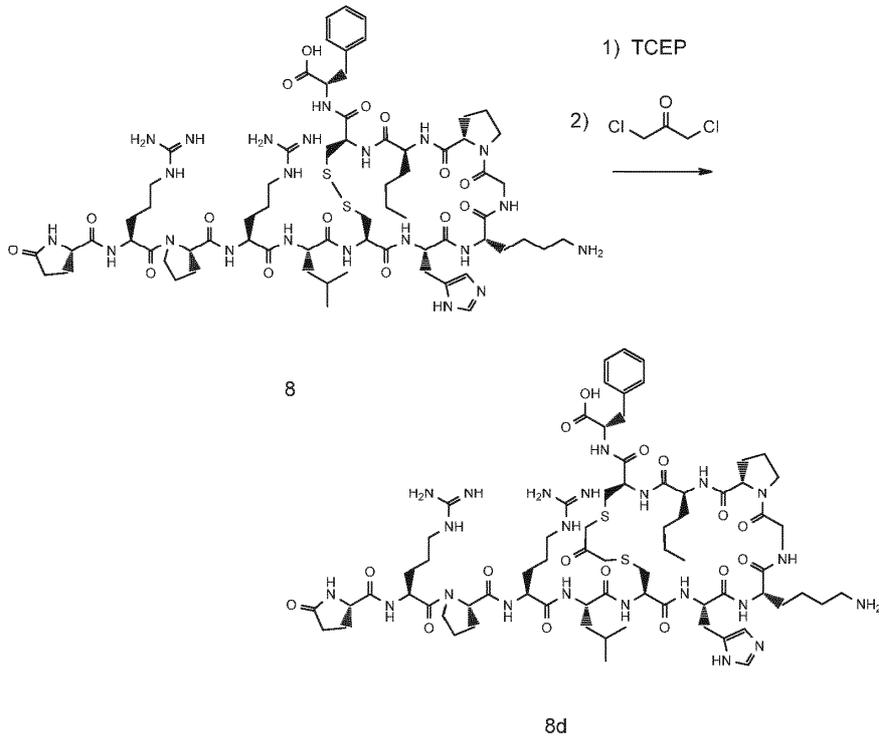
5 El **intermedio 8b** (2,40 mmol) se lavó cuidadosamente con DCM (4x). Se añadió una mezcla de TFA/EDT/TIPS (95:2,5:2,5) al 95 % ac. (50 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se retiró por filtración y se añadió solución de escisión nueva (35 ml). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después la solución de escisión se retiró por filtración. Se añadió solución nueva (35 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La solución de escisión se retiró por filtración. Las soluciones de escisión combinadas se vertieron lentamente en una mezcla agitada de heptano/éter dietílico (1:1) frío (500 ml), dando un precipitado. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y después el precipitado se dejó que sedimentara. El sobrenadante se succionó con una frita. El residuo se lavó con heptano/éter dietílico (1:1) frío (2 x 100 ml), el sobrenadante se succionó con una frita. El sólido se secó a alto vacío para producir **intermedio 8c** como un sólido blanquecino (3,75 g, 1,88 mmol).

Preparación de **péptido cíclico 8** (*Ciclación y purificación*)

15 El **intermedio 8c** (3,75 g, 1,88 mmol) se disolvió en H<sub>2</sub>O (375 ml). Una solución de I<sub>2</sub> 50 mM en AcOH (45,1 ml, 2,26 mmol) se añadió en una porción a la solución agitada y la solución se agitó durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió ácido ascórbico 0,5 M en H<sub>2</sub>O (5,64 ml, 2,82 mmol) para inactivar el exceso de I<sub>2</sub>. La solución se concentró a casi sequedad. La reacción se realizó en dos porciones: tamaño de 0,188 mmol y tamaño de 1,69 mmol. Los crudos se combinaron para la purificación. El crudo se purificó por HPLC preparativa y se liofilizó en ACN/H<sub>2</sub>O para producir **compuesto 8** como un sólido blanco (1,53 g, 0,767 mmol).

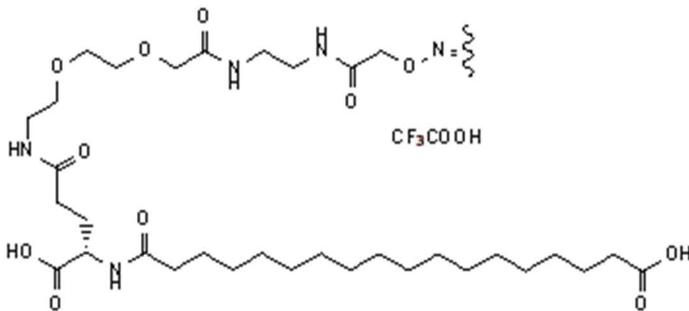
20 El producto puro se analizó por HPLC analítica (método analítico C: t<sub>R</sub>=3,43 min) y UPLC-EM (método analítico B; medido: [M+3]/3 = 512,4; calculado: [M+3]/3 = 512,6).

Este ejemplo ilustra la formación de una proteína activada partiendo con el péptido cíclico **8**.

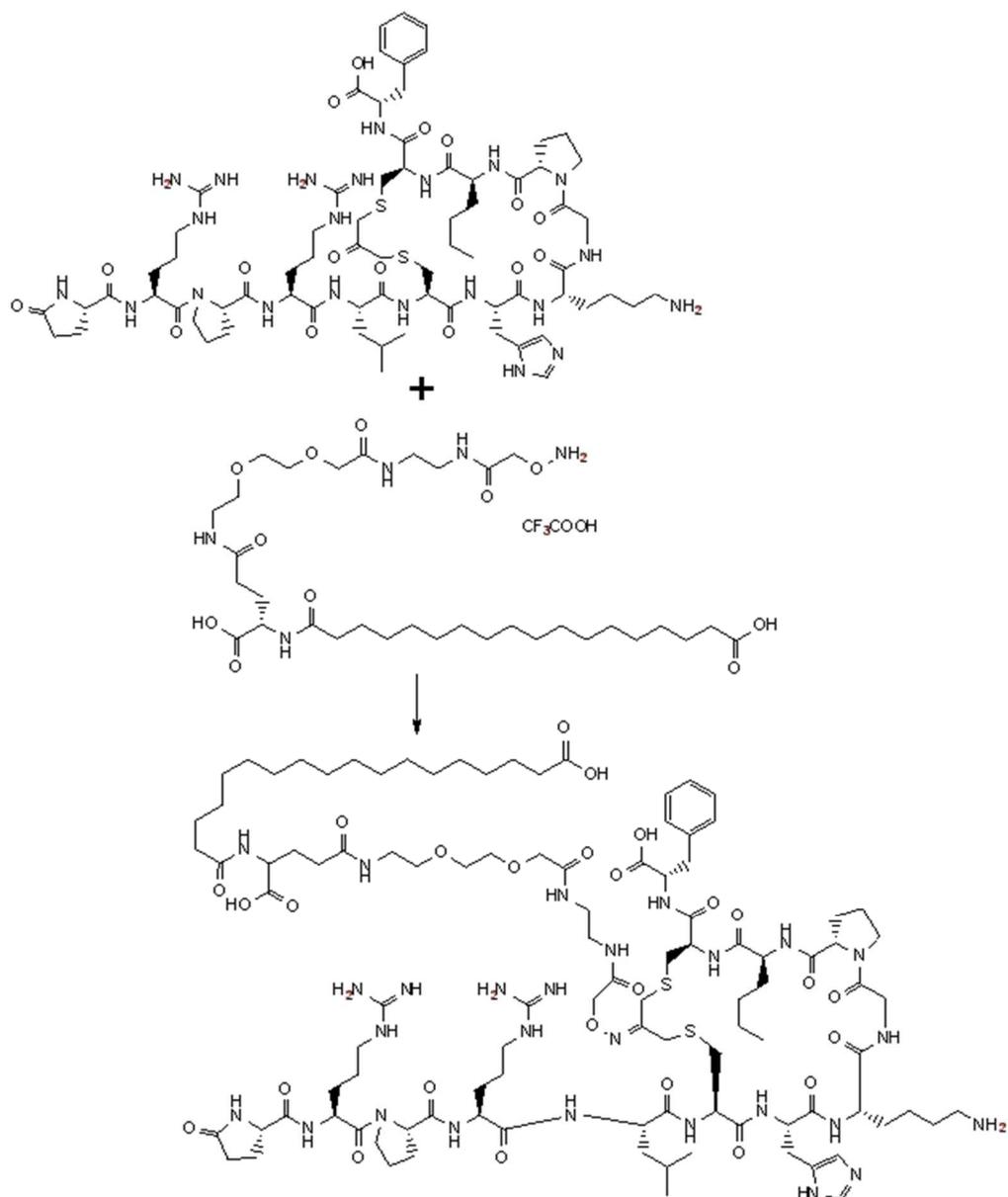


5 El péptido cíclico **8** (12 mg, 6,76  $\mu\text{mol}$ ) se disolvió en tampón de fosfato de Na 50 mM pH 6,5 (1,5 ml), en que se añadió TCEP HCl (2,91 mg, 10,13  $\mu\text{mol}$ ) a temperatura ambiente. Esta mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. A la solución anterior se añadió 1,3-dicloropropan-2-ona (4,29 mg, 0,034 mmol) a temperatura ambiente, que se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. La RP-HPLC eluyendo con MeCN/agua al 15-60 % con TFA al 0,1 % dio proteína activada **8d** (6 mg, 2,93  $\mu\text{mol}$ , 43,4 % de rendimiento). EMAR [M+1] (método D); 1590,7911 (observado), 1590,7912 (esperado).

*pE-R-P-R-L-C-H-K-G-P-Nle-C-F-OH* con un enlace -S-CH<sub>2</sub>-C(=Z)-CH<sub>2</sub>-S- entre las 2 cisteínas en la posición 6 y 12 [C<sup>6</sup>-C<sup>12</sup>], y Z es:



10

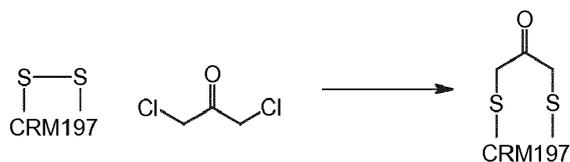


A una solución de compuesto 8 (ácido (S)-2-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-imidazol-5-il)metil)-20-(4-aminobutil)-3-butil-14-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxopirrolidina-2-carboxamido)pentanoil)pirrolidina-2-carboxamido)pentanamido)-4-metilpentanamido)-1,4,10,15,18,21,24-heptaioxohexacosahidropirrol[2,1-i][1,23,4,7,10,13,16,19]ditiahexaazaciclohexacosina-6-carboxamido)-3-fenilpropanoico)

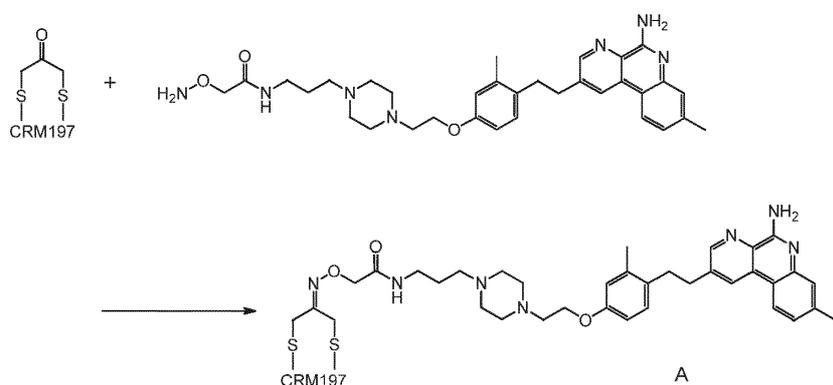
(11,5 mg, 5,62  $\mu\text{mol}$ ) y compuesto ácido (S)-1-(aminooxi)-19-carboxi-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetrazaoctatriacontan-38-oico con ácido 2,2,2-trifluoroacético (1:1) (9,19 mg, 0,011 mmol) en tampón de fosfato de Na 100 nM pH 6,0 (1 ml) se añadió anilina (2,051  $\mu\text{l}$ , 0,022 mmol) a temperatura ambiente. La adición de DMSO (50  $\mu\text{l}$ ) dio solución homogénea. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La RP-HPLC eluyendo con MeCN/agua al 15-60 % con TFA al 0,1 % dio el conjugado esperado, (ácido 1-((Z)-((3S,6R,14R,17S,20S,28aS)-17-((1H-imidazol-5-il)metil)-20-(4-aminobutil)-3-butil-6-((S)-1-carboxi-2-feniletilcarbamoil)-14-((S)-2-((S)-5-guanidino-2-((S)-1-((S)-5-guanidino-2-((S)-5-oxopirrolidina-2-carboxamido)pentanoil)pirrolidina-2-carboxamido)pentanamido)-4-metilpentanamido)-1,4,15,18,21,24-hexaoxodocosahidropirrol[2,1-i][1,23,4,7,10,13,16,19]ditiahexaazaciclohexacosin-10(1H,9H,11H)-ilideno)aminooxi)-19-carboxi-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetrazaoctatriacontan-38-oico)

(4,5 mg, 1,646  $\mu\text{mol}$ , 29,3 % de rendimiento). EMAR (método D) [(M+3)/3]; 759,7487 (observado), 759,7462 (esperado). Tiempo de retención 4,12 min.

## Referencia - Ejemplo 3

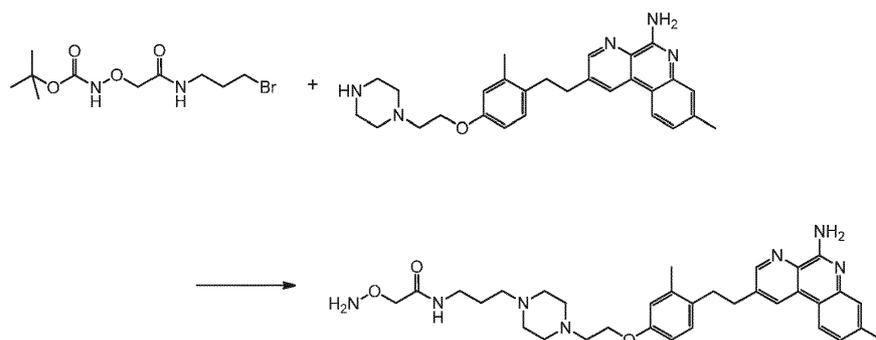


A una solución de CRM197 (200  $\mu\text{g}$ , 6,2  $\mu\text{l}$ , 0,0034  $\mu\text{mol}$ ) en tampón de fosfato de Na 50 mM pH 7,4 (10  $\mu\text{l}$ ) se añadió solución acuosa de TCEP HCl (5,89  $\mu\text{g}$ , 0,021  $\mu\text{mol}$ ). Esta mezcla de reacción se dejó durante 15 h a temperatura ambiente. Se añadió 1,3-dicloropropan-2-ona (4,58  $\mu\text{g}$ , 0,034  $\mu\text{mol}$ , 10 equiv.) a la mezcla. Esta reacción se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. El crudo se pasó a través de una columna de exclusión molecular Zeba™. CLEM; [M+1] = 58465. Esta proteína activada puede hacerse reaccionar con una carga aminada tal como un agonista de TLR, para formar una proteína de vehículo conjugada con un compuesto que puede potenciar las respuestas inmunitarias contra cualquier antígeno añadido a la proteína de vehículo.



A una solución de CRM197 modificado con cetona (5 mg/ml, tampón de fosfato de Na, pH 6,0) (50  $\mu\text{g}$ , 0,00086  $\mu\text{mol}$ ) se añadieron N-(3-(4-(2-(4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenoxi)etil)piperazin-1-il)propil)-2-(aminoxil)acetamida (66,8  $\mu\text{g}$ , 0,064  $\mu\text{mol}$ ) y anilina (0,0020  $\mu\text{l}$ , 0,021  $\mu\text{mol}$ ). Esta reacción se dejó durante 14 h a 23 °C para dar el conjugado A deseado basándose en el análisis de CLEM. La mezcla de reacción se pasó a través de columna de exclusión molecular Zeba™ de 0,5 ml eluyendo con tampón PBS pH 7,2. CLEM; [M+1] = 59032.

## Síntesis de PL:

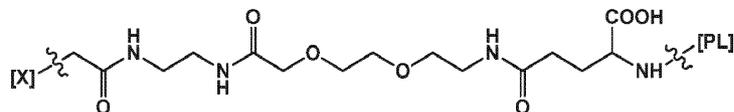


A una solución de 2-(3-bromopropilamino)-2-oxoetoxicarbamato de terc-butilo (53,3 mg, 0,171 mmol) y 8-metil-2-(2-metil-4-(2-(piperazin-1-il)etoxi)fenetil)benzo[f][1,7]naftiridin-5-amina (52 mg, 0,114 mmol) en DMF (0,5 ml) se añadió carbonato de potasio (39,4 mg, 0,285 mmol) a TA, que se agitó durante 24 h a TA. Se añadió agua y EtOAc. La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró al vacío para dar material protegido con Boc crudo. Este se disolvió en DMF (0,5 ml), en que se añadió TFA (0,5 ml, 6,49 mmol). Este se agitó durante 30 min a TA. Después de la eliminación del disolvente, la purificación por RP-HPLC eluyendo con MeCN/agua al 15-60 % con TFA al 0,1 % dio N-(3-(4-(2-(4-(2-(5-amino-8-metilbenzo[f][1,7]naftiridin-2-il)etil)-3-metilfenoxi)etil)piperazin-1-il)propil)-2-(aminoxil)acetamida (25 mg, 0,024 mmol, 21,02 % de rendimiento). CLEM; [M+1] = 586.

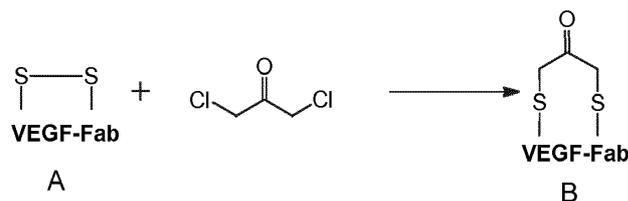
## Referencia - Ejemplo 4

El siguiente ejemplo usa un fragmento de anticuerpo anti-VEGF (VEGF-Fab) y un derivado de ácido graso que se añade para aumentar la semivida en suero del fragmento de anticuerpo. La reducción selectiva del disulfuro intercatenario en presencia de varios enlaces disulfuro intracatenarios menos accesibles se consigue usando TCEP

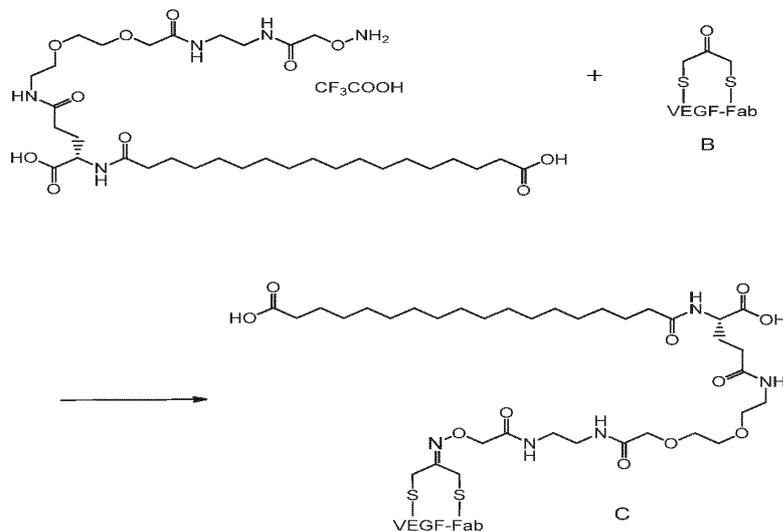
en PBS a pH 7. La proteína reducida se hace reaccionar con una dihaloacetona (dibromoacetona o dicloroacetona) para proporcionar una proteína activada que tenga la fijación de tres carbonos -CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>- que une los átomos de azufre juntos. La proteína activada se pone en contacto con un resto de conector-carga que tiene un aminooxi como parte reactiva para formar una oxima con la cetona derivada de la dihaloacetona. El grupo conector L en este ejemplo es



donde [X] y [PL] indican los puntos de adhesión para -X-NH<sub>2</sub> y la carga PL, respectivamente, y la carga es un grupo ácido graso C18. En el ejemplo, X es -ONH<sub>2</sub>, que forma una oxima con el carbonilo de la acetonicetona de la proteína activada. La figura 5 representa la formación de la proteína activada para este ejemplo y muestra la evidencia espectral de masas para su formación.

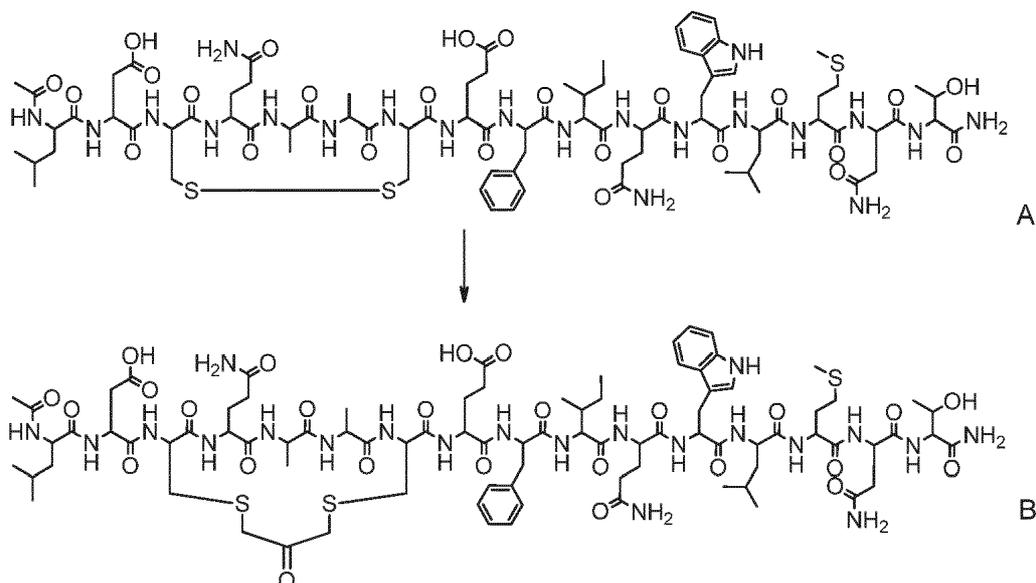


A una solución de **A** (72,72 µg, 6,0 µl, 0,0015 µmol) en PBS pH 7,4 (8 µl) se añadió TCEP HCl (2,63 µg, 0,0092 µmol). Esta mezcla de reacción se dejó durante 3 h a temperatura ambiente. Se añadió 1,3-dicloropropan-2-ona (1,945 µg, 0,015 µmol) y la reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 h. **A** se consumió y se convirtió en el producto **B** deseado. El crudo se pasó a través de una columna de exclusión molecular. CLEM; [M+1] = 47538



A una solución de **B** (36,36 µg, 0,00076 µmol) en PBS pH 7,4 (22,5 µl) se añadieron compuesto ácido (S)-1-(aminooxi)-19-carboxi-2,7,16,21-tetraoxo-9,12-dioxa-3,6,15,20-tetraazaocotriacontan-38-oico con ácido 2,2,2-trifluoroacético (1:1) (64,33 µg, 0,079 µmol) y anilina (0,00105 µl, 0,011 µmol) a temperatura ambiente, que se agitó durante 14 h a 23 °C. **B** se consumió y se convirtió en el producto **C** deseado. El crudo se pasó a través de una columna de desalación de centrifugación Zeba™, 7K MWCO (de Thermo Scientific) CLEM; [M+1] (método A) = 48222. La figura 6 representa la formación del conjugado proteínico y muestra la evidencia espectral de masas para la formación de conjugado.

## Referencia - Ejemplo 5

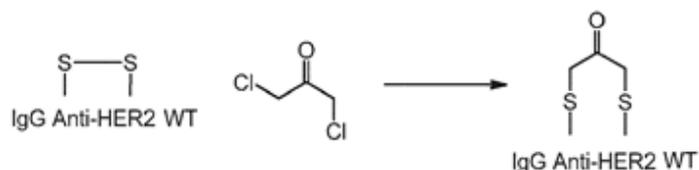


- 5 El péptido A (1 mg, 0,519  $\mu\text{mol}$ ) se disolvió en tampón (2,5 ml) (tampón de fosfato de sodio 50 mM pH 6,5 (1,5 ml), MeCN al 40 % (0,9 ml), DMF al 2,5 % (0,1 ml)), en que se añadió TCEP HCl (0,164 mg, 0,571  $\mu\text{mol}$ ) a temperatura ambiente. Esta mezcla de reacción se agitó durante 60 min. Se añadió 1,3-dibromoacetona (0,164 mg, 0,571  $\mu\text{mol}$ ) en DMF (0,1 ml) a la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Después de agitarse durante 3 min, se observó que se formaba aducto de acetona B en conversión cuantitativa basándose en el análisis de CLEM. CLEM (método C)  $[M+2]/2 = 991$ .

## Ejemplo 6: Preparación de conjugados de anticuerpo anti-Her2-fármaco.

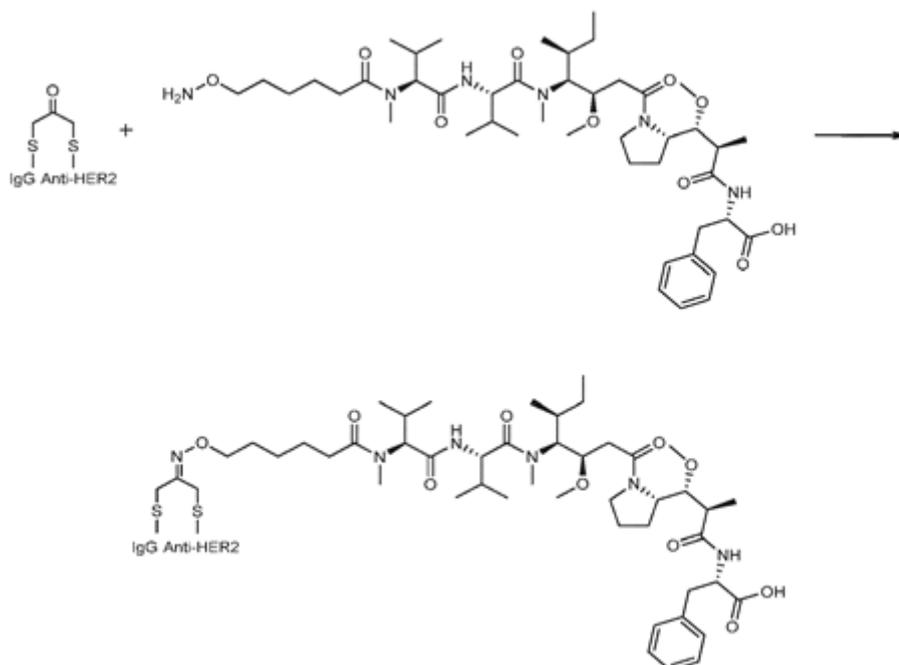
## 10 Método A:

## Etapa 1.



- 15 Etapa 1: A una solución de IgG anti-HER2 (20,36 mg/ml en Tris/HCl 0,1 M, 30  $\mu\text{l}$ , 610,8  $\mu\text{g}$ , 0,0041  $\mu\text{mol}$ ) y 1,3-dicloropropan-2-ona (66,1  $\mu\text{g}$ , 0,495  $\mu\text{mol}$ ) se añadió TCEP HCl (14,17  $\mu\text{g}$ , 0,049  $\mu\text{mol}$ ), que se agitó durante 16 h a 4 °C. La mezcla de reacción se pasó a través de columna de centrifugación Zeba™ de 0,5 ml eluyendo con tampón PBS (pH 7,2). La modificación de 4 disulfuros intercatenarios se confirmó por análisis con PNGasa F (New England Biolab), endoproteinasa Lys-C (Roche) y SDS PAGE no reductora/reductora (gel de Bis-Tris 4-12 % con tinción de azul coloidal) realizada con muestras recogidas de la solución de reacción. CLEM (método B); 145394 (después de desglucosilación con PNGasa F).

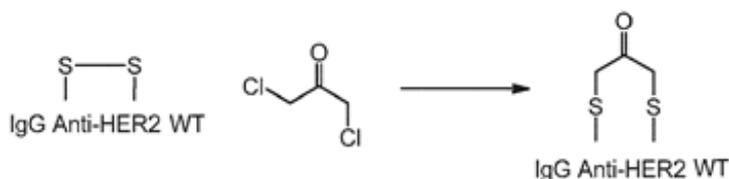
## 20 Etapa 2:



5 A una solución de IgG anti-HER2 modificada preparada en la etapa 1 (7,14 mg/ml, tampón de acetato de anilinio 100 mM pH 4,8, 600  $\mu$ g, 0,0040  $\mu$ mol) se añadió ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(aminooxi)-N-metilhexanamido)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (30 mg/ml, 104  $\mu$ g, 0,121  $\mu$ mol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 19 h. La mezcla se pasó a través de columna de centrifugación Zeba™ de 0,5 ml una vez eluyendo con tampón PBS (pH 7,2). La modificación de cetonas se confirmó por análisis con PNGasa F (New England Biolab), endoproteinasa Lys-C (Roche) y SDS PAGE no reductora/reductora (gel de Bis-Tris 4-12 % con tinción de azul coloidal, mostrada a continuación) realizada con muestras recogidas de la solución de reacción. La DAR (relación de fármaco-anticuerpo) fue 3,2. CLEM (método B); 148770 (después de desglucosilación). La figura 7 muestra el conjugado y el conjugado después de la reducción (véase a continuación). Se usó patrón preteñido SeeBlue Plus2® (Invitrogen) como escala de pesos moleculares aparentes. Esto demuestra que hay poco o nada de anticuerpo no conjugado presente en el producto de conjugación: el anticuerpo no conjugado produciría una banda de menor peso molecular tras la reducción debido a la disociación del anticuerpo mantenido junto únicamente por los enlaces disulfuro. El conjugado, que tiene los fragmentos unidos covalentemente a través del enlace -S-CH<sub>2</sub>-C(=X)-CH<sub>2</sub>-S-, no puede disociarse tras la reducción.

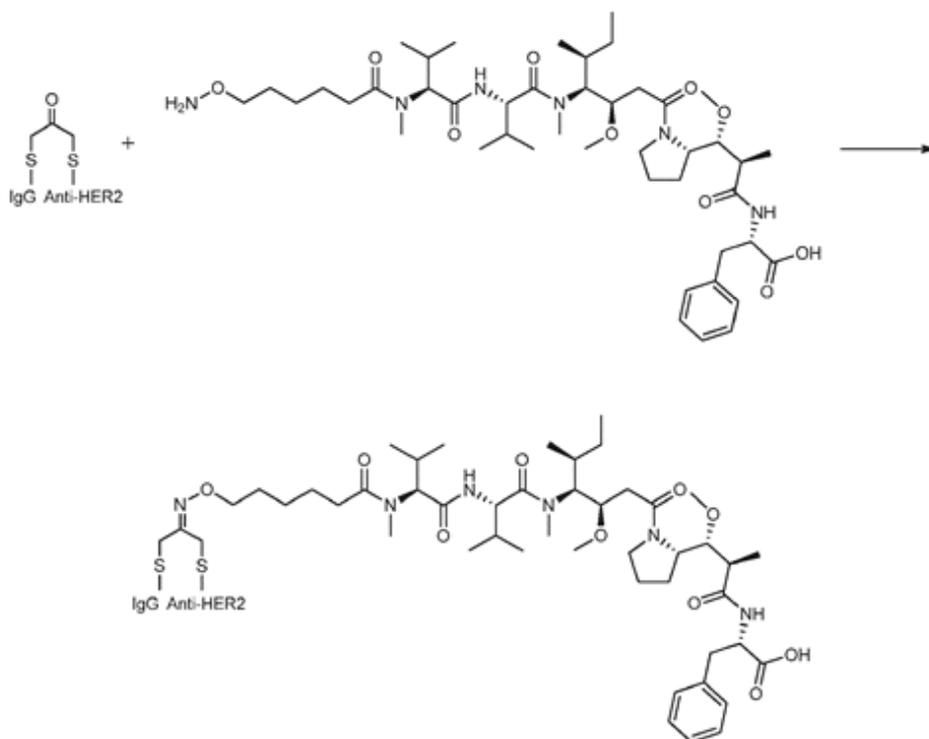
Método B:

Etapa 1:



20 A una solución de IgG anti-HER2 (20,36 mg/ml en Tris/HCl 0,1 M) (610,8  $\mu$ g, 0,0041  $\mu$ mol) (30  $\mu$ l) y 1,3-dicloropropan-2-ona (66,1  $\mu$ g, 0,495  $\mu$ mol) se añadió TCEP HCl (14,17  $\mu$ g, 0,049  $\mu$ mol), que se agitó durante 16 h a 4 °C. La mezcla de reacción se pasó a través de columna de agitación Zeba™ de 0,5 ml eluyendo con PBS pH 7,2. La modificación satisfactoria en disulfuro intercatenario por la formación de 4 acetonas se confirmó por análisis con PNGasa F (New England Biolab), endoproteinasa Lys-C (Roche) y SDS PAGE no reductora/reductora (gel de Bis-Tris 4-12 % con tinción de azul coloidal) realizada con muestras recogidas de la solución de reacción. CLEM (método B); 145394 (después de desglucosilación). La muestra reducida para SDS PAGE se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

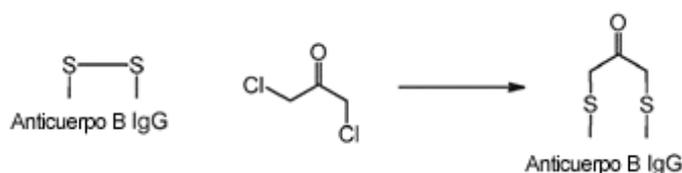
Etapa 2:



5 A una solución de IgG anti-HER2 modificada (7,14 mg/ml, tampón de acetato de anilinio 100 mM pH 4,8) (600  $\mu$ g, 0,0040  $\mu$ mol) se añadió ácido (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(6-(aminooxi)-N-metilhexanamido)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-2-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (30 mg/ml, 104  $\mu$ g, 0,121  $\mu$ mol) a TA, que se agitó durante 19 h a TA. La mezcla resultante se pasó a través de columna de centrifugación Zeba™ de 0,5 ml una vez eluyendo con PBS pH 7,2. La modificación satisfactoria de cetonas se confirmó por análisis con PNGasa F (New England Biolab), endoproteinasa Lys-C (Roche) y SDS PAGE no reductora/reductora (gel de Bis-Tris 4-12 % con tinción de azul coloidal, mostrada en la figura 8) realizada con muestras recogidas de la solución de reacción. La DAR fue 3,8. CLEM (método B); 148770 (después de desglucosilación). Se usó patrón preteñido SeeBlue Plus2™ (Invitrogen) como escala de pesos moleculares aparentes. La muestra reducida para SDS PAGE se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. La SDS PAGE se presenta en la figura 8.

Ejemplo 7: Preparación de conjugado de anticuerpo B-DM1:

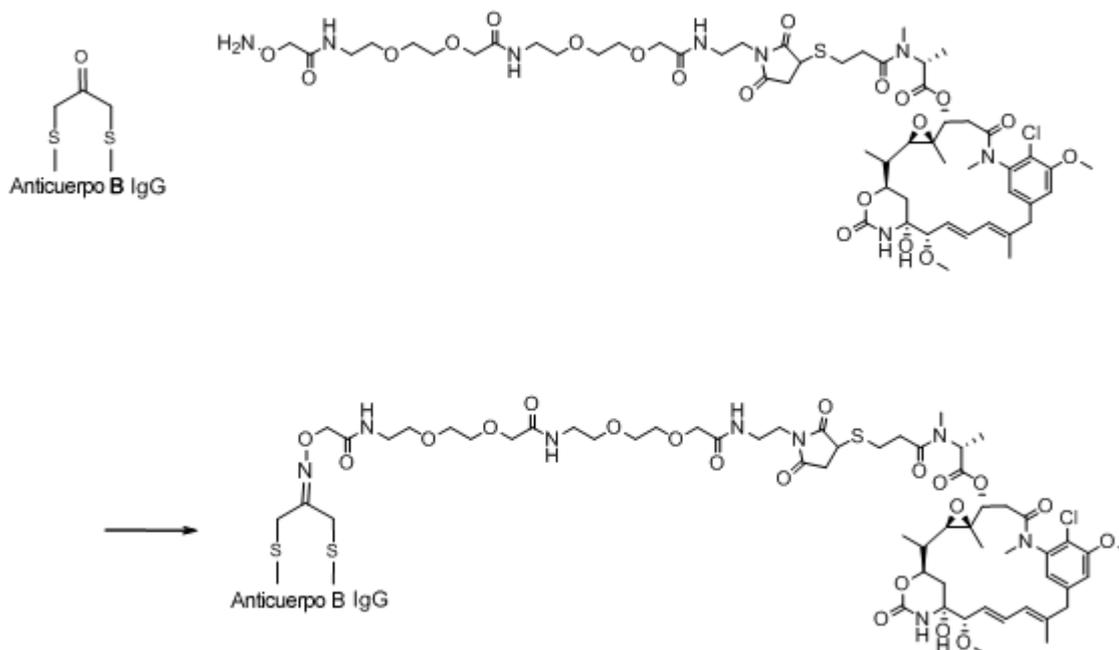
Etapa 1:



15 A una solución de dicloroacetona (7,35 mg, 0,055 mmol, 368  $\mu$ l) en tampón Tris (4800  $\mu$ l) se añadió anticuerpo B IgG (anticuerpo B IgG reconoce un antígeno diferente de Her2: 68,2 mg, 0,458  $\mu$ mol, 400  $\mu$ l), que se enfrió hasta 4 °C durante 60 min. TCEP HCl (1,576 mg, 5,50  $\mu$ mol, 524  $\mu$ l) a 4 °C, que se dejó durante 16 h a 4 °C en sala. La mezcla se concentró mediante filtración en membrana Amicon® de 10K y se diluyó con PBS. Este ciclo se repitió en 2 veces. Después de la filtración, la muestra se pasó a través de columna de desalación Zeba™ de 5 ml. La modificación satisfactoria en disulfuro intercatenario por la formación de 4 acetonas se confirmó por análisis con PNGasa F (New England Biolab) y SDS PAGE no reductora/reductora (gel de Bis-Tris 4-12 % con tinción de azul coloidal) realizada con muestras recogidas de la solución de reacción. CLEM (método B); 146020 (después de desglucosilación). La muestra reducida para SDS PAGE se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

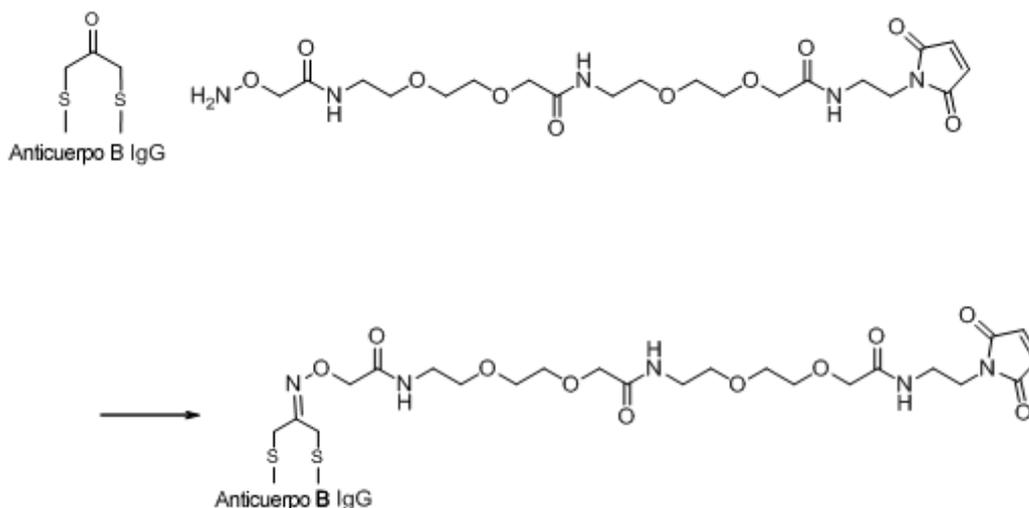
25 Etapa 2:

PL1 (método A):



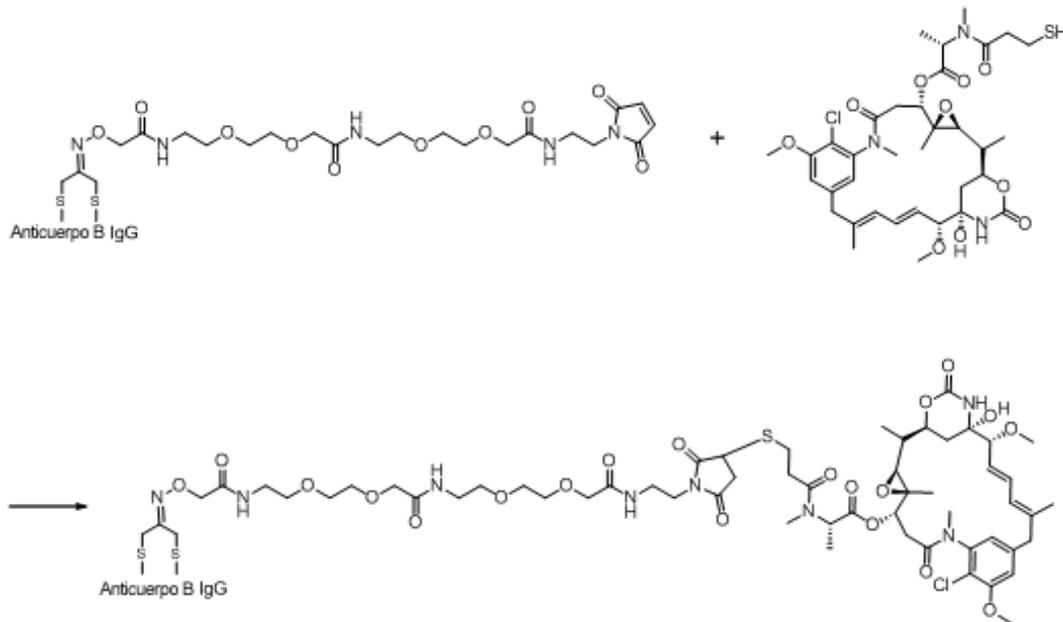
5 A una solución de anticuerpo B IgG modificado (48 mg, 0,322  $\mu\text{mol}$ , 1,2 ml) se añadieron solución en DMSO de derivados de DM-1 (10,00 mg, 8,05  $\mu\text{mol}$ , 67  $\mu\text{l}$ ) y ácido 3,5-diaminobenzoico (14,70 mg, 0,097 mmol, 30  $\mu\text{l}$ ), que se agitó a 23  $^{\circ}\text{C}$  durante 15 h. La mezcla se concentró mediante filtración en membrana Amicon® de 10K y se diluyó con PBS. Este ciclo se repitió en 3 veces. Después de la filtración, la muestra se pasó a través de columna de desalación Zeba™ de 5 ml. La modificación satisfactoria de cetonas se confirmó por análisis con PNGasa F (New England Biolab). La DAR fue 4 basándose en CLEM. CLEM (método B); 150915 (después de desglucosilación).

PL1 (método B):



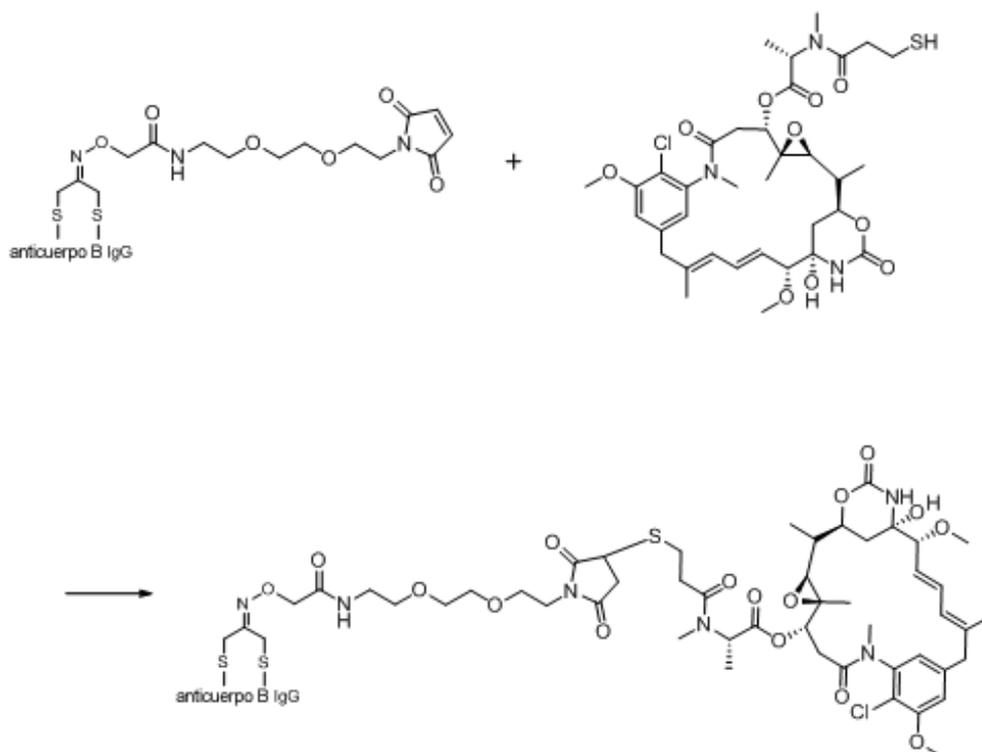
10 A una solución de anticuerpo B IgG modificado (679  $\mu\text{g}$ , 0,0046  $\mu\text{mol}$ ) en fosfato de Na 0,1 M pH 6,0 se añadieron 2-(aminooxi)-N-(1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-4,13-dioxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12-diazaicosan-20-il)acetamida en DMSO (563  $\mu\text{g}$ , 0,911  $\mu\text{mol}$ , 2,25  $\mu\text{l}$ ) a TA, que se agitó durante 20 h a 23  $^{\circ}\text{C}$ . La mezcla de reacción se pasó a través de columna de desalación de 0,5 ml eluyendo con HEPES 100 mM con EDTA 3 veces. La introducción de conector de 3,8 maleimida/anticuerpo (DAR = 3,8) se confirmó por CLEM. CLEM (método B); 147968 (después de desglucosilar con PNGasa F (New England Biolab)).

15



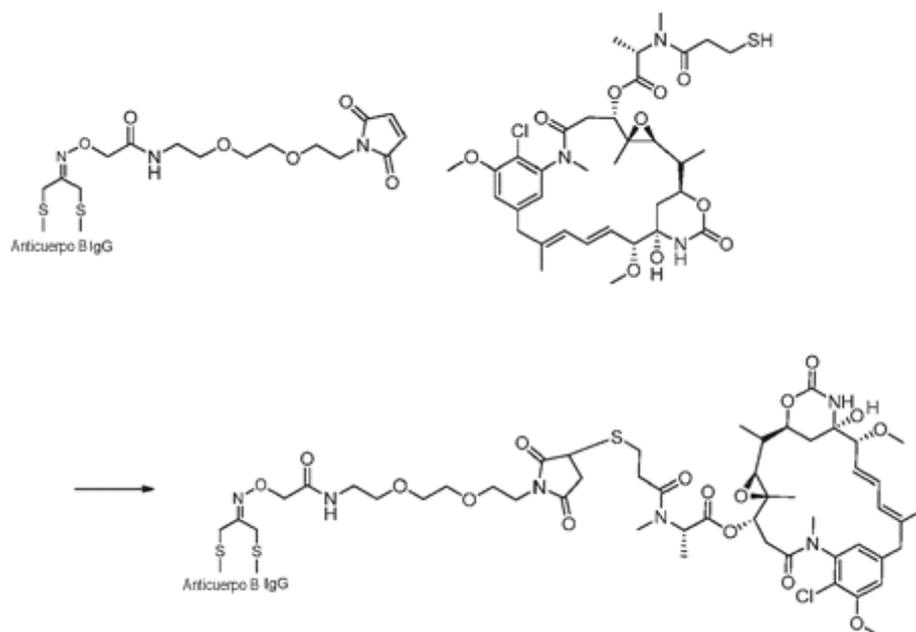
5 A una solución de anticuerpo B IgG modificado (177  $\mu\text{g}$ , 0,0012  $\mu\text{mol}$ ) en tampón HEPES 100 mM con EDTA 10 mM se añadió DM-1 en DMSO (8,65  $\mu\text{g}$ , 0,012  $\mu\text{mol}$ , 0,288  $\mu\text{l}$ ) a TA, que se agitó durante 6 h a 23  $^{\circ}\text{C}$ . Se añadió N-metilmaleimida (1,3 mg/ml en DMSO) (2,083  $\mu\text{g}$ , 0,019  $\mu\text{mol}$ ) a la solución de reacción, que se agitó durante 10 min. La mezcla de reacción se pasó a través de columna de desalación de 0,5 ml eluyendo con tampón HEPES 100 mM. La DAR fue 3,7 basándose en CLEM. CLEM (método B); 153967 (DAR4) (glucosilado).

PL2:



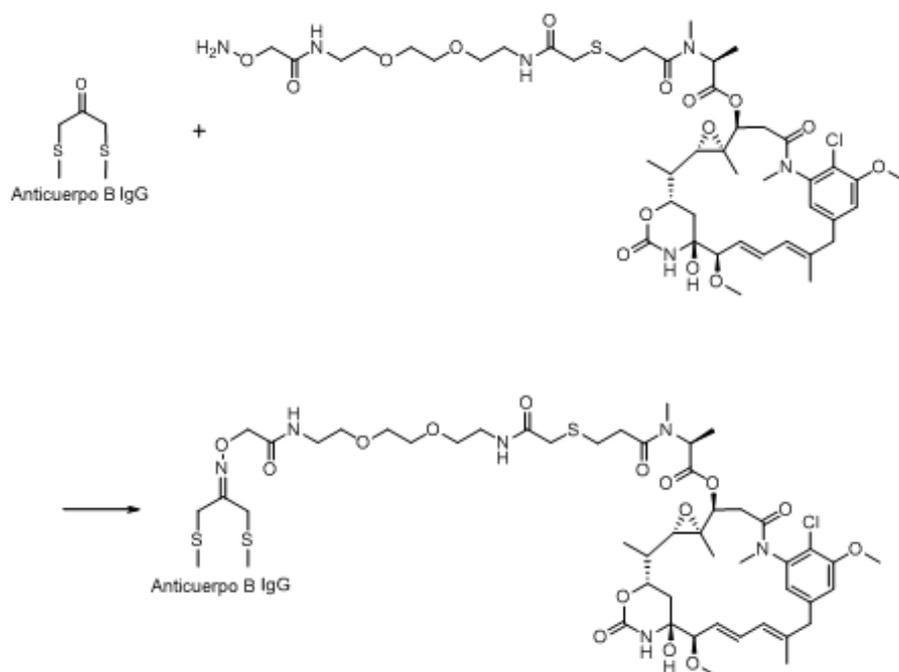
10 A una solución de anticuerpo B IgG modificado (420  $\mu\text{g}$ , 0,0028  $\mu\text{mol}$ ) en tampón HEPES con EDTA 10 mM se añadió DM-1 en DMSO (10,61  $\mu\text{g}$ , 0,014  $\mu\text{mol}$ , 0,55  $\mu\text{l}$ ) a TA, que se agitó durante 8 h a TA. La mezcla de reacción se pasó a través de columna de desalación de 0,5 ml eluyendo con HEPES 100 mM con EDTA 3 veces. La mezcla de reacción

se pasó a través de columna de desalación de 0,5 ml eluyendo con tampón HEPES 100 mM. La DAR fue 3,6 basándose en CLEM. CLEM (método B); 150101 (DAR4) (después de desglucosilar con PNGasa F (New England Biolab)).



- 5 A una solución de anticuerpo B IgG modificado (420  $\mu\text{g}$ , 0,0028  $\mu\text{mol}$ ) en tampón HEPES con EDTA 10 mM se añadió DM-1 en DMSO (10,61  $\mu\text{g}$ , 0,014  $\mu\text{mol}$ , 0,55  $\mu\text{l}$ ) a TA, que se agitó durante 8 h a TA. La mezcla de reacción se pasó a través de columna de desalación de 0,5 ml eluyendo con HEPES 100 mM con EDTA 3 veces. La mezcla de reacción se pasó a través de columna de desalación de 0,5 ml eluyendo con tampón HEPES 100 mM. La DAR fue 3,6 basándose en CLEM. CLEM (método B); 150101 (DAR4) (después de desglucosilar con PNGasa F (New England Biolab)).
- 10

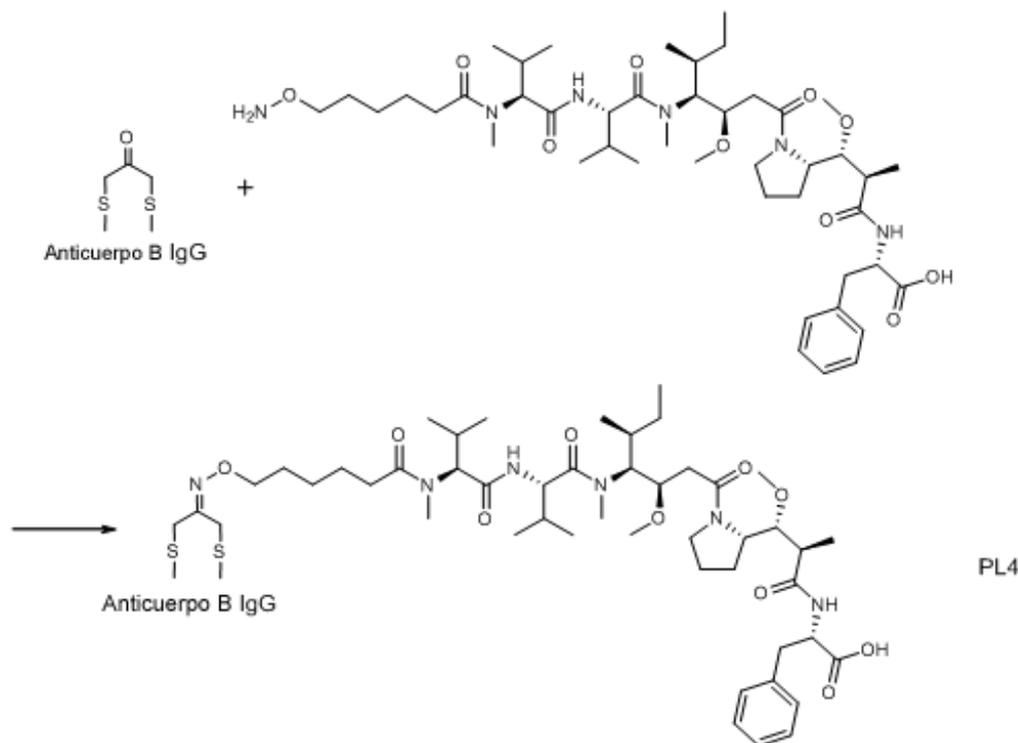
PL3:



- 15 A una solución de anticuerpo B IgG modificado (47,3 mg, 0,317  $\mu\text{mol}$ , 1,1 ml) se añadieron solución en DMSO de derivados de DM-1 (6,34 mg, 6,35  $\mu\text{mol}$ , 42,3  $\mu\text{l}$ ) y ácido 3,5-diaminobenzoico (13,52 mg, 0,089 mmol, 27  $\mu\text{l}$ ), que se agitó a 23 °C durante 15 h. La mezcla se concentró mediante filtración en membrana Amicon® de 10K y se diluyó con

PBS. Este ciclo se repitió en 2 veces. Después de la filtración, la muestra se pasó a través de columna de desalación Zeba™ de 5 ml. La modificación satisfactoria de cetonas se confirmó por análisis con PNGasa F (New England Biolab). La DAR fue 4 basándose en CLEM. CLEM (método B); 150910 (después de desglucosilación).

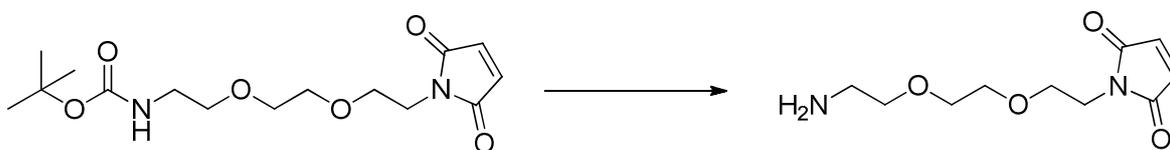
PL4:



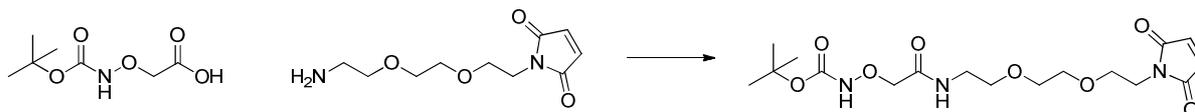
5

A una solución de anticuerpo B IgG modificado (250  $\mu\text{g}$ , 0,0017  $\mu\text{mol}$ , 10  $\mu\text{l}$ ) en PBS se añadieron la alcoxiamina requerida mostrada anteriormente (21,66  $\mu\text{g}$ , 0,025  $\mu\text{mol}$ , 0,245  $\mu\text{l}$ ) y ácido 3,5-diaminobenzoico (383  $\mu\text{g}$ , 2,52  $\mu\text{mol}$ , 0,43  $\mu\text{l}$ ) a TA, que se agitó durante 24 h a 23  $^{\circ}\text{C}$ . La mezcla de reacción se pasó a través de columna de desalación de 0,5 ml dos veces eluyendo con PBS. La DAR fue 4 basándose en CLEM. CLEM (método B); 152446 (glucosilado).

10 Síntesis de PL1:



(2-(2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)carbamato de terc-butilo (245 mg, 0,746 mmol) se disolvió en HCl 4 N en dioxano (2 ml, 8,00 mmol) a TA, que se agitó durante 1 h a TA. Después de la eliminación del disolvente, el crudo se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

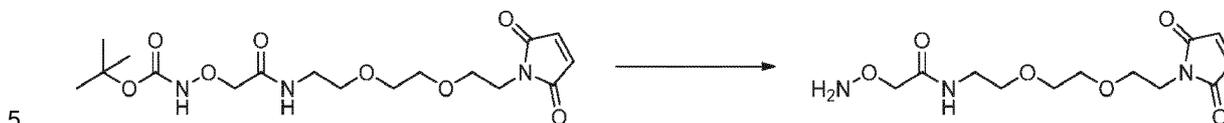


15

A una solución de ácido 2-(((terc-butoxicarbonil)amino)oxi)acético (185 mg, 0,970 mmol) y TEA (0,520 ml, 3,73 mmol) en DCM (8 ml) se añadieron EDC (172 mg, 0,895 mmol) y HOBT (114 mg, 0,746 mmol) a TA, que se agitó durante 5 min a TA. Se añadió 1-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-1H-pirrol-2,5-diona (197 mg, 0,746 mmol) en DCM (4 ml) a la mezcla de reacción anterior. Después de agitar durante 1 h, se añadieron DCM y agua. La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con DCM. La capa orgánica combinada se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró al

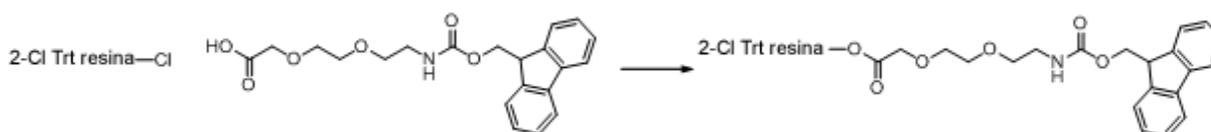
20

vacío. La purificación por RP-HPLC eluyendo con MeCN/agua al 15-65 % con TFA al 0,1 % dio 2-((2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)amino)-2-oxoetoxicarbamato de terc-butilo (62 mg, 0,154 mmol, 20,70 % de rendimiento durante 2 etapas) como un aceite incoloro. IEN-EM (método A) m/z: 402[M+1]<sup>+</sup>, tiempo de retención: 1,60 min. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-d, 400 MHz); 1,48 (s, 9H), 3,49-3,75 (m, 14H), 6,71 (s, 2H).

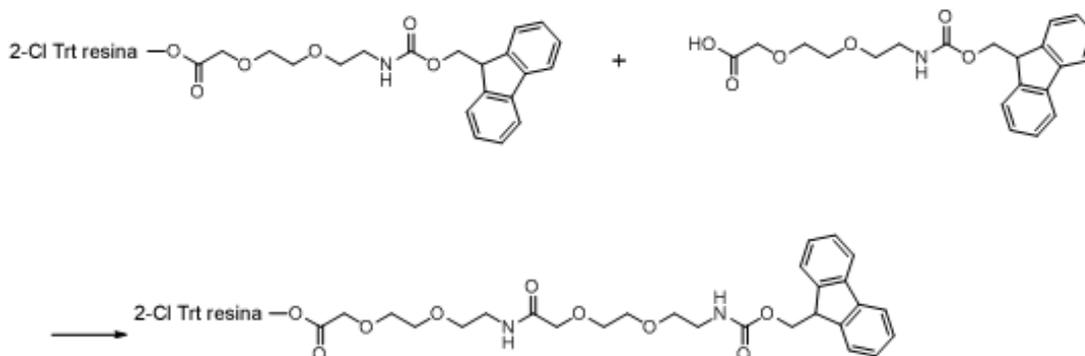


A una solución de 2-((2-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etoxi)etoxi)etil)amino)-2-oxoetoxicarbamato de terc-butilo (62 mg, 0,154 mmol) en DCM (400 µl) se añadió TFA (400 µl) a TA, que se agitó durante 1 h a TA. Después de la eliminación del disolvente, el crudo se puso al vacío para O.N. usado sin purificación adicional. IEN-EM (método A) m/z: 302[M+1]<sup>+</sup>

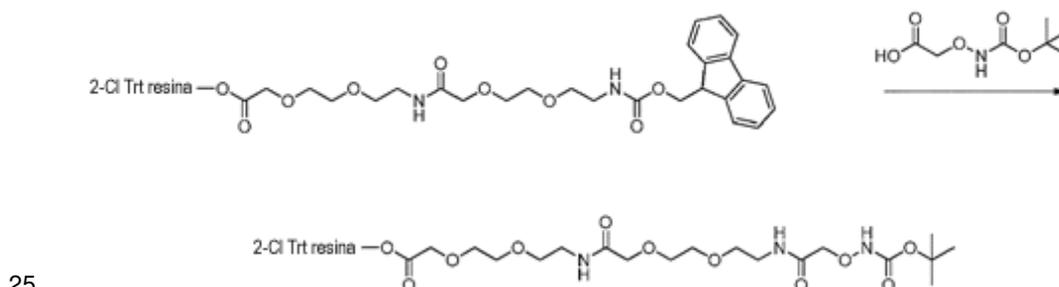
10 Síntesis de PL2:



15 A una suspensión de resina de 2-Cl Trt (1,70 mmol/g) (0,086 g, 1,7 mmol) y ácido 1-(9H-fluoren-9-il)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-oico (2 g, 5,19 mmol) en DCM (8 ml)/DMF (4 ml) se añadió gota a gota DIPEA (2,67 ml, 15,30 mmol), que se agitó durante 15 h a TA. Se drenó el disolvente. La resina se aclaró con DCM/MeOH/DIPEA (17/2/1, 40 ml), DCM (8 ml \* 2), DMF (8 ml \* 2), DCM (8 ml \* 2) y se secó al vacío.

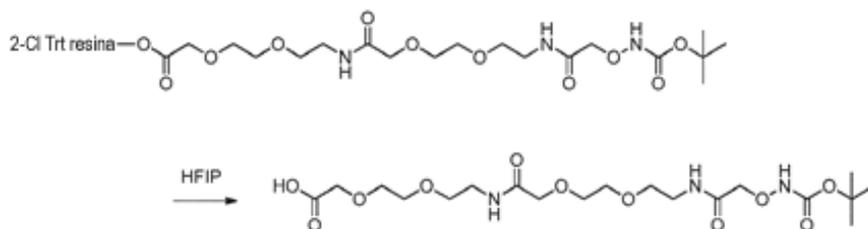


20 La resina (0,679 g, 1,7 mmol) se cargó en recipiente de reacción. Se añadieron 5 ml de piperidina al 20 % en DMF, que se agitó suavemente durante 1 min y se eliminó. Se añadieron otros 10 ml de piperidina al 20 % en DMF, se esperó durante 20 min con agitación intermitente y se eliminó. Se añadió DMF (10 ml), se agitó durante 15 s y se eliminó mediante filtración al vacío. Se repitió esta etapa cuatro veces (se comprobó con ensayo de Kaiser; azul violeta profundo, positivo). Se añadió solución de HOAt (0,463 g, 3,40 mmol) y ácido 2-(((terc-butoxicarbonil)amino)oxi)acético (0,650 g, 3,40 mmol) en DMF (8 ml) a la resina y se añadió DIC (0,530 ml, 3,40 mmol) en DMF (4 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a TA. La resina se retiró por filtración, se aclaró con DMF (10 ml) cuatro veces y se secó al vacío.

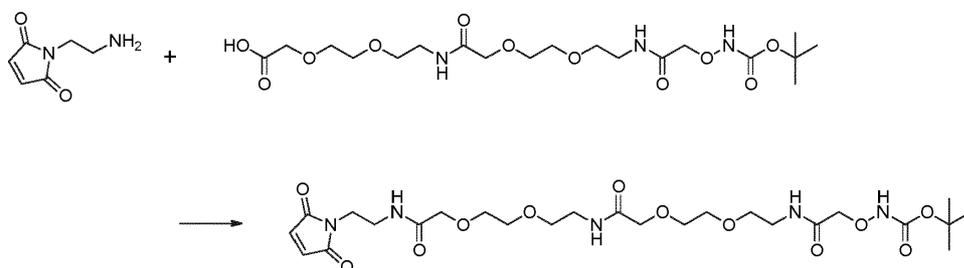


La resina (0,926 g, 1,7 mmol) se cargó en recipiente de reacción. Se añadieron 5 ml de piperidina al 20 % en DMF, que se agitó suavemente durante 1 min y se eliminó. Se añadieron otros 10 ml de piperidina al 20 % en DMF, se

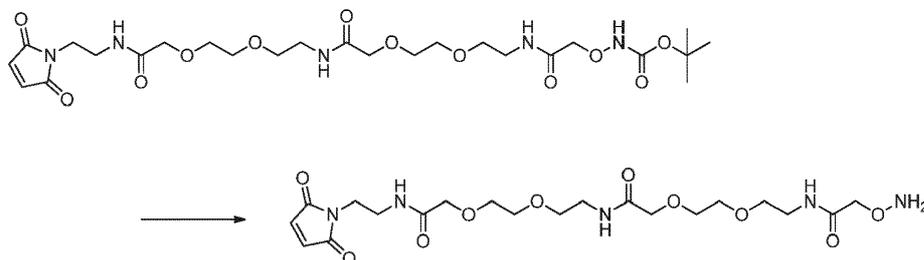
esperó durante 20 min con agitación intermitente y se eliminó. Se añadió DMF (10 ml), se agitó durante 15 s y se eliminó mediante filtración al vacío. Se repitió esta etapa cuatro veces (se comprobó con ensayo de Kaiser; azul violeta profundo, positivo). Se añadió solución de HOAt (0,463 g, 3,40 mmol) y ácido 2-((terc-butoxicarbonil)amino)oxi)acético (0,650 g, 3,40 mmol) en DMF (8 ml) a la resina y se añadió DIC (0,530 ml, 3,40 mmol) en DMF (4 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a TA. La resina se retiró por filtración, se aclaró con DMF (10 ml) cuatro veces y se secó al vacío.



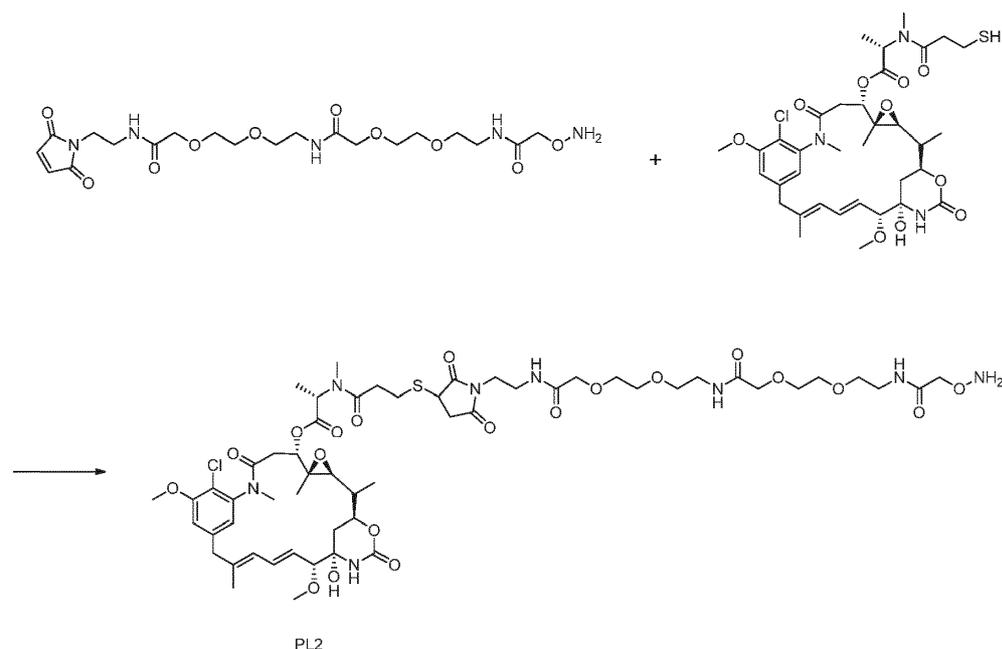
La resina se suspendió con HFIP (hexafluoroisopropanol) al 30 % en  $\text{CHCl}_3$  (20 ml, 1,700 mmol), que se agitó durante 2 h a TA. El disolvente drenado se concentró para dar ácido 2,2-dimetil-4,8,17-trioxo-3,6,12,15,21,24-hexaoxa-5,9,18-triazahexacosan-26-oico crudo (1,13 g, 2,347 mmol, 138 % de rendimiento). Este se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional. IEN-EM m/z: 482[M+1]<sup>+</sup>, tiempo de retención: 1,10 min (método B).



A una solución de ácido 2,2-dimetil-4,8,17-trioxo-3,6,12,15,21,24-hexaoxa-5,9,18-triazahexacosan-26-oico (819 mg, 1,7 mmol) en DMF (6 ml) se añadieron HOAt (463 mg, 3,40 mmol) y DIC (0,530 ml, 3,40 mmol) a TA respectivamente, que se agitó durante 5 min a TA. A la mezcla anterior se añadieron 1-(2-aminoetil)-1H-pirrol-2,5-diona (518 mg, 2,040 mmol) y DIPEA (diisopropiletilamina, 0,594 ml, 3,40 mmol) a TA, que se agitó durante 1 h a TA. La mezcla de reacción se diluyó con agua y EtOAc (acetato de etilo). La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró al vacío. El compuesto deseado estaba principalmente en la capa acuosa basándose en CLEM. Después de liofilización de la capa acuosa, el crudo se purificó mediante RP-HPLC eluyendo con MeCN/agua al 15-70 % con TFA al 0,1 %, que dio (23-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2,11,20-trioxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12,21-triazatricosil)oxicarbamato de terc-butilo (600 mg, 0,994 mmol, 58,5 % de rendimiento). IEN-EM m/z: 604[M+1]<sup>+</sup>, tiempo de retención: 1,14 min (método B). <sup>1</sup>H-RMN ( $\text{CDCl}_3$ -d, 400 MHz); 1,48 (s, 7,5H), 1,55 (s, 1,5H), 3,47-3,71 (m, 20H), 3,97 (s, 2H), 4,04 (s, 2H), 4,37 (s, 1,65 H), 4,47 (s, 0,35H), 6,72 (s, 2H).



A una solución de (23-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2,11,20-trioxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12,21-triazatricosil)oxicarbamato de terc-butilo (8,4 mg, 0,014 mmol) en DCM (100  $\mu\text{l}$ ) se añadió TFA (100  $\mu\text{l}$ ) a TA, que se agitó durante 1 h a TA. La retirada del disolvente produjo 2-(aminooxi)-N-(1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-4,13-dioxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12-diazaicosan-20-il)acetamida. Esta se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional. IEN-EM m/z: 504[M+1]<sup>+</sup>, tiempo de retención: 0,69 min (método A).



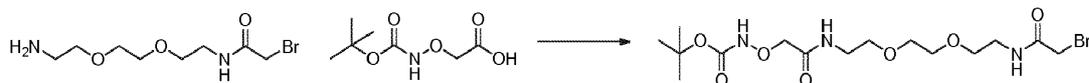
Síntesis de PL3: A una solución de 2-(aminooxi)-N-(1-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-4,13-dioxo-6,9,15,18-tetraoxa-3,12-diazaicosan-20-il)acetamida (22,79 mg, 0,031 mmol) en DMA (0,6 ml) se añadió DM-1 (23 mg, 0,031 mmol) y fosfato de Na 100 mM pH 7,4 (0,600 ml) a 5 °C. Se añadió DIPEA (10,88  $\mu$ l, 0,062 mmol) a la misma temperatura. Esta mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA y se agitó durante 1,5 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y bicarbonato de sodio ac. sat. La capa orgánica se lavó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sat. (ac.) y salmuera. La capa orgánica combinada se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró y se concentró al vacío. La cromatografía en gel de sílice eluyendo con MeOH/DCM al 0-15 % dio el compuesto deseado (21 mg, 0,017 mmol, 54,3 % de rendimiento). IEN-EM m/z: 1242[M+1]<sup>+</sup>, tiempo de retención: 1,00 min (método A). <sup>1</sup>H-RMN ( $\text{CDCl}_3$ -d, 400 MHz); 0,80 (s, 3H), 1,21-1,33 (m, 9H), 1,41-1,51 (m, 1H), 1,56-1,59 (m, 1H), 2,31-2,39 (m, 1H), 2,57-2,65 (m, 2H), 2,79-2,88 (m, 1H), 2,86 (s, 3H), 2,91-3,13 (m, 5H), 3,16-3,24 (m, 1H), 3,20 (s, 3H), 3,36 (s, 3H), 3,43-3,76 (m, 25H), 3,90 (d, J = 3,6Hz, 2H), 3,98 (s, 3H), 4,02 (s, 2H), 4,17 (s, 2H), 4,25-4,32 (m, 1H), 4,77-4,80 (m, 1H), 5,30-5,37 (m, 1H), 5,62-5,69 (m, 1H), 6,26 (s, 1H), 6,38-6,45 (m, 1H), 6,63-6,68 (m, 2H), 6,82-6,84 (m, 1H), 6,92 (s a, 1H), 7,14-7,24 (2H).



A una solución de (2-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamato de terc-butilo (320 mg, 1,289 mmol) en DCM (3 ml) se añadieron bromuro de 2-bromoacetilo (0,225 ml, 2,58 mmol) y DIPEA (0,563 ml, 3,22 mmol) a 5 °C, que se agitó durante 15 min dejando calentar hasta TA. Después de la eliminación del disolvente, la purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice eluyendo con EtOAc/heptano al 0-40-100 % dio (2-(2-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)etoxi)etil)carbamato de terc-butilo (317 mg, 0,858 mmol, 66,6 % de rendimiento). IEN-EM m/z: 269 [M+1 -Boc]<sup>+</sup>, tiempo de retención: 1,41 min (método A). H-RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz); 1,45 (s, 9H), 3,34 (s a, 2H), 3,48-3,52 (m, 2H), 3,53-3,60 (m, 4H), 3,63 (s, 4H), 3,88 (s, 2H).

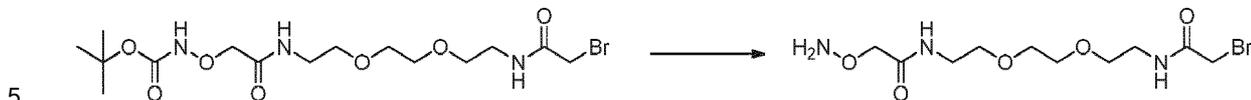


A una solución de (2-(2-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)etoxi)etil)carbamato de terc-butilo (317 mg, 0,858 mmol) en DCM (1 ml) se añadió TFA (1 ml), que se agitó durante 30 min a TA. Después de la eliminación de los disolventes, el crudo resultante se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional.

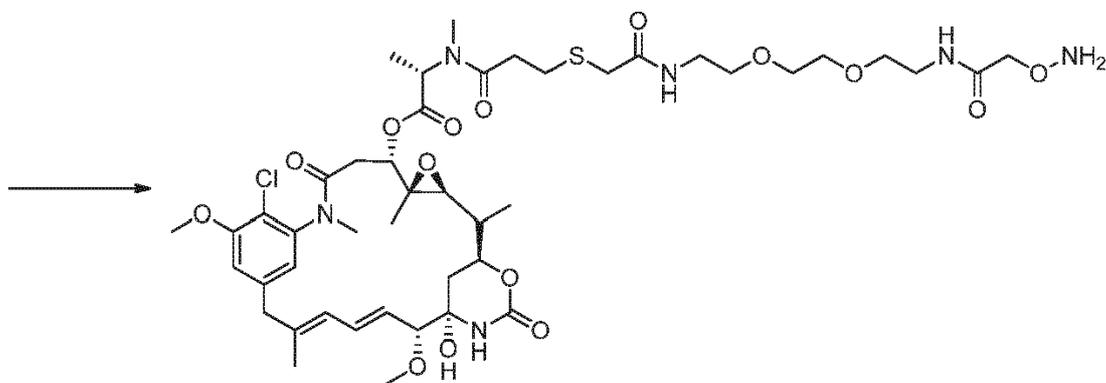
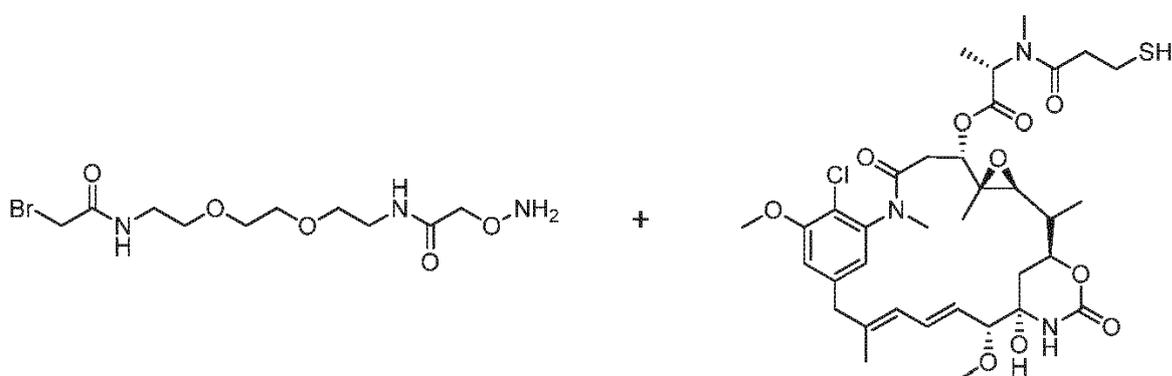


A una solución de N-(2-(2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)-2-bromoacetamida (329 mg, 0,858 mmol) en DCM (1,5 ml) se añadieron éster preactivado (preparado a partir de ácido 2-((tert-butoxicarbonil)amino)oxi)acético (328 mg, 1,716 mmol), HOAt (175 mg, 1,287 mmol) y DIC (0,267 ml, 1,716 mmol) en DMF (1,5 ml) que se agitó durante 5 min a TA) y DIPEA (0,749 ml, 4,29 mmol) a 5 °C, que se agitó durante 20 min dejando calentar hasta TA. Se añadió EtOAc y agua. La capa orgánica se separó. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. La capa orgánica combinada se secó sobre

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. La purificación por cromatografía en gel de sílice eluyendo con MeOH/DCM al 0-5 % dio (14-bromo-2,13-dioxo-6,9-dioxa-3,12-diazatetradecil)oxicarbamato de terc-butilo (150 mg, 0,339 mmol, 39,5 % de rendimiento). IEN-EM m/z: 343 [M+1 -Boc]<sup>+</sup>, tiempo de retención: 1,30 min (método A). H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz); 1,49 (s, 9H), 3,47-3,55 (m, 4H), 3,59-3,63 (m, 4H), 3,65 (s, 4H), 3,88 (s, 2H), 4,34 (s, 2H).



Se disolvió (14-bromo-2,13-dioxo-6,9-dioxa-3,12-diazatetradecil)oxicarbamato de terc-butilo (150 mg, 0,339 mmol) en DCM (volumen: 1 ml, relación: 1,000), en que se añadió TFA (volumen: 1, relación: 1,000) a TA. Esta mezcla de reacción se agitó durante 30 min a TA. Después de la eliminación del disolvente, la RP-HPLC eluyendo con MeCN/agua al 10-25 % que contenía TFA al 0,1 % dio 2-(aminoxil)-N-(2-(2-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)etoxi)etil)acetamida (110 mg, 0,241 mmol, 71,1 % de rendimiento). IEN-EM m/z: 344 [M+2]<sup>+</sup>, tiempo de retención: 0,44 min (método A).

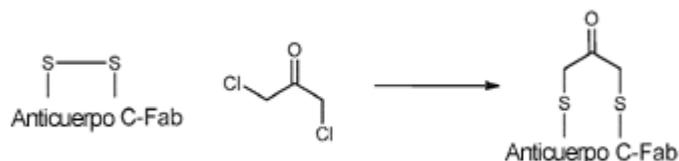


PL3

A una solución de 2-(aminoxil)-N-(2-(2-(2-(2-bromoacetamido)etoxi)etoxi)etil)acetamida (42,9 mg, 0,075 mmol) en DMA (1 ml) se añadió DM-1 (37 mg, 0,050 mmol) y fosfato de Na 75 mM pH 8,5 (1 ml) a 5 °C. Se añadió DIPEA (0,026 ml, 0,150 mmol) a la misma temperatura. Esta mezcla de reacción se dejó calentar hasta TA y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y bicarbonato de sodio ac. sat. y la capa orgánica se lavó con NH<sub>4</sub>Cl ac. sat. y salmuera. La capa orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró al vacío. La cromatografía en gel de sílice eluyendo con MeOH/DCM al 0-15 % dio el compuesto deseado (31 mg, 0,031 mmol, 61,9 % de rendimiento). IEN-EM m/z: 1000[M+1]<sup>+</sup>, tiempo de retención: 1,61 min (método A). <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-d, 400 MHz); 0,79 (s, 3H), 1,20-1,33 (m, 9H), 1,41-1,50 (m, 2H), 2,17-2,22 (m, 1H), 2,50-2,63 (m, 2H), 2,70-2,81 (m, 2H), 2,86-2,94 (m, 3H), 2,99-3,01 (m, 1H), 3,10-3,13 (m, 1H), 3,18-3,20 (m, 4H), 3,36 (s, 3H), 3,45-3,62 (m, 14H), 3,98 (s, 3H), 4,17 (s, 2H), 4,25-4,31 (m, 1H), 4,78-4,82 (m, 1H), 5,30-5,35 (m, 1H), 5,63-5,69 (m, 1H), 6,27 (s, 1H), 6,39-6,45 (m, 1H), 6,61-6,64 (m, 2H), 6,83 (s, 1H), 6,87 (s, 1H).

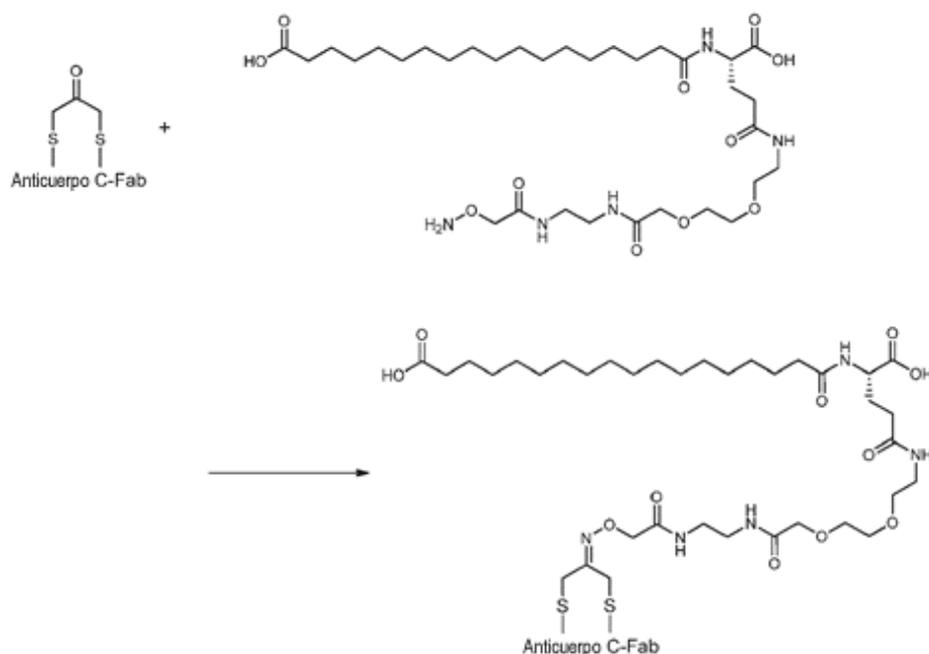
Referencia - Ejemplo 8: Conjugado de anticuerpo C Fab:

## Etapa 1:



5 A una solución de anticuerpo C Fab (el anticuerpo C se une a diferente antígeno diana de Her2 y anticuerpo B: 1668  $\mu\text{g}$ , 0,035  $\mu\text{mol}$ , 120  $\mu\text{l}$ ) en fosfato de Na 100 mM con EDTA, pH 7,4 se añadió TCEP HCl (35,2  $\mu\text{g}$ , 0,123  $\mu\text{mol}$ , 11,73  $\mu\text{l}$ ) a TA, que se agitó durante 1,5 h a 23  $^{\circ}\text{C}$ . Se añadió 1,3-dicloropropan-2-ona (117  $\mu\text{g}$ , 0,878  $\mu\text{mol}$ , 5,85  $\mu\text{l}$ ) a la mezcla de reacción, que se agitó durante 40 min a 23  $^{\circ}\text{C}$ . Se observó 1 modificación de puente de acetona por CLEM. La mezcla de reacción se pasó a través de columna de desalación 0,5 eluyendo con tampón de NaOAc 100 mM pH 5,2. CLEM (método B); 47554.

## Etapa 2:



10 A una solución de anticuerpo C Fab modificado (1668  $\mu\text{g}$ , 0,035  $\mu\text{mol}$ , 148  $\mu\text{l}$ ) en tampón de NaOAc 100 mM pH 5,2 y el ácido graso aminooxisustituido mostrado (1852  $\mu\text{g}$ , 2,63  $\mu\text{mol}$ ) se añadió ácido 3,5-diaminobenzoico (694  $\mu\text{g}$ , 4,56  $\mu\text{mol}$ , 5,34  $\mu\text{l}$ ) a TA, que se agitó durante 20 h a 23  $^{\circ}\text{C}$ . Se añadió ácido aminooxigraso adicional (1852  $\mu\text{g}$ , 2,63  $\mu\text{mol}$ ) a la mezcla, que se agitó durante 24 h a TA. La mezcla de reacción se pasó a través de columna de desalación de 5 ml eluyendo con PBS pH 7,4 para dar el conjugado esperado de anticuerpo C Fab-ácido graso (30 % de rendimiento). CLEM (método B); 48238.

La imagen de SDS PAGE y el espectro de masas para el conjugado se proporcionan en la figura 9.

## Ejemplo 9: Efecto del orden de adición de dicloroacetona y TCEP.

20 Todas las reacciones se ejecutaron a 25  $^{\circ}\text{C}$ , usando tampón 50 mM (TRIS salvo que se indique otra cosa) a pH 8,0. Las reacciones se ejecutaron con (58,8 microlitros) y tampón (20 microlitros de tampón 1 M) en un pocillo, después añadiendo IgG1 (6,6 microlitros de una solución que contenía 170,5 mg/ml) y TCEP (8,6 microlitros de una solución acuosa con 3 mg/ml de TCEP). Después de esperar durante el periodo de tiempo indicado, se añadió 1,3-dicloroacetona (6 microlitros de una solución con 20 mg/ml en DMSO).

25 En una primera serie de experimentos, las reacciones se ejecutaron añadiendo el agente reductor (TCEP-HCl) en primer lugar, y añadiendo 1,3-dicloroacetona una hora después. La distribución del producto se analizó por método de electroforesis-SDS en microchip después de reducción de la mezcla de producto por DTT o TCEP (*Electrophoresis* 2012, vol. 33, 765-72). Los resultados se muestran en la siguiente tabla: LC = cadena ligera, HC = cadena pesada, HL = cadena pesada + ligera, HH = cadena pesada + cadena pesada; HHL = HC + HC + LC; y LHHL = LC + HC + HC + LC. Los datos muestran que el producto principal es un aducto de HC-LC (cadena pesada-cadena ligera), después  
30 de la reducción para escindir cualquier disulfuro restante. Esto demuestra que se producía únicamente reacción parcial

en estas condiciones. Los datos también demuestran que la reacción se hacía esencialmente dentro de la primera media hora.

Nombre de la muestra	Área rel.					
	% de LC	% de HC	% de HL	% de HH	% de HHL	% de LHHL
TCEP en primer lugar t = 0,5 h	3,3	5,4	50,9	0,6	6,5	33,3
TCEP en primer lugar t = 1 h	3,2	4,7	51,9	0,8	5,9	33,6
TCEP en primer lugar t = 1,5 h	2,9	4,6	50,1	0,6	6,4	35,5
TCEP en primer lugar t = 2 h	3,0	4,5	51,8	0,7	6,0	33,9
TCEP en primer lugar t = 3 h	2,9	4,0	52,2	0,6	6,1	34,2
TCEP en primer lugar t = 17 h	2,7	4,5	50,6	0,8	6,4	35,0

- 5 Se ejecutó un segundo conjunto de experimentos en las mismas condiciones, excepto que se añadió 1,3-dicloroacetona a la mezcla de reacción de polipéptido/tampón antes de la adición del agente reductor. Los resultados de estos experimentos se muestran en la siguiente tabla, que muestra un aumento significativo en LHHL, correspondiente a la conversión de al menos tres de los cuatro disulfuros del anticuerpo en enlaces covalentes formados por reacción de 1,3-dicloroacetona con ambos átomos de azufre del disulfuro. De nuevo, parece que la reacción está esencialmente completa en 30 minutos.

Nombre de la muestra	Área rel.					
	% de LC	% de HC	% de HL	% de HH	% de HHL	% de LHHL
Dicloroacetona en primer lugar t = 0,5 h	2,83	0,82	7,13	0,98	13,01	75,23
Dicloroacetona en primer lugar t = 1 h	2,95	0,72	6,94	1,17	13,42	74,81
Dicloroacetona en primer lugar t = 1,5 h	2,64	0,61	6,42	1,09	13,61	75,63
Dicloroacetona en primer lugar t = 2 h	2,63	0,61	6,43	1,08	13,49	75,77
Dicloroacetona en primer lugar t = 3 h	2,38	0,51	6,4	1,07	13,41	76,23
Dicloroacetona en primer lugar t = 17 h	2,47	0,56	5,94	1,04	13,39	76,59

- 10 Estos experimentos demuestran que la adición de dicloroacetona antes de iniciar la reducción de los disulfuros proporciona un aumento sorprendentemente grande en la eficacia de la reacción de reticulación de sulfhidrilo con sulfhidrilo. Los rendimientos de producto fueron inferiores con PBS como tampón.

En experimentos separados, se demostró que aumentar la cantidad de dicloroacetona usada en diez veces impedía la reacción, y que reducir el pH hasta 7,40, 7,10, 6,80 y 6,60 provocaba rendimientos similares o ligeramente mejorados del producto de LHHL.

- 15 Ejemplo 10: Cribado de tampones.

- 20 Las reacciones se ejecutaron mediante la adición del agente reductor (TCEP-HCl) a una solución premezclada de 1,3-dicloroacetona e IgG en tampón (100 mM) a temperatura ambiente. La distribución del producto se analizó por método de electroforesis-SDS en microchip después de reducción de la mezcla de producto por DTT o TCEP después de 7 h. Los resultados se muestran en la siguiente tabla: LC = cadena ligera, HC = cadena pesada, HL = cadena pesada + ligera, HH = cadena pesada + cadena pesada; HHL = HC + HC + LC; e "intacto" = (HC)<sub>2</sub>(LC)<sub>2</sub>; LHHL = LC + HC + HC + LC. El rendimiento se derivó del porcentaje de LHHL.

ES 2 729 643 T3

<b>pH medido</b>	<b>tampón</b>	<b>Rendimiento de la reacción [%]</b>
7	Bis-TRIS	87,7
6,9	Bis-TRIS-propano	87,4
6,5	Succinato	75,8
6,8	ADA	86,2
6,8	Imidazol	85,5
7,4	TRIS	86,5
6,6	MES	85,0
6,6	Citrato	79,6
6,6	PIPES	83,3
6,6	MOPS	86,9
7,2	Tricina	86,8
6,3	TES	85,9
6,3	HEPES	82,7
7,1	EPPS	84,3
7,1	Bicina	86,5
7	PBS50/TRIS50	86,5
7,1	TAPS	85,1
6,8	Glicilglicina	86,6
6,5	PBS75/TRIS25	86,1
6,1	PBS90/TRIS10	84,7
8,7	Carbonato	67,8

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para convertir un polipéptido modificado con cetona en un polipéptido modificado con oxima, en el que el método comprende poner en contacto el polipéptido modificado con cetona con un grupo de fórmula R-O-NH<sub>2</sub> en presencia de un promotor de amina y a una concentración de polipéptido de al menos 1 mg/ml, en el que el grupo de fórmula R-O-NH<sub>2</sub> es un compuesto de fórmula H<sub>2</sub>N-O-L-PL, donde L representa un conector y PL representa un grupo de carga y

5 en el que el polipéptido modificado con cetona se prepara convirtiendo un polipéptido que comprende un enlace disulfuro reducible en un polipéptido modificado con cetona que comprende un grupo de fórmula [PP]-S-CH<sub>2</sub>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-S-[PP], donde cada S es un azufre del enlace disulfuro, y [PP] indica el lugar donde los extremos del grupo conector están adheridos al polipéptido,

10 en el que el método comprende formar una mezcla de un polipéptido que contiene un enlace disulfuro reducible, un tampón acuoso y 1,3-dihaloacetona, añadir después un agente reductor que puede reducir el enlace disulfuro.

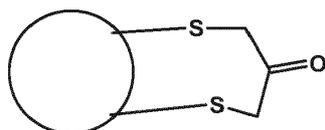
2. El método de la reivindicación 1, en el que la 1,3-dihaloacetona es 1,3-dicloroacetona.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el agente reductor es una fosfina soluble en agua o sal de fosfina.

15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

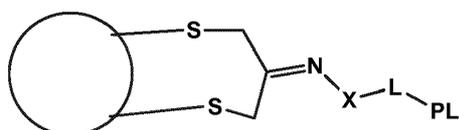
5. El método de la reivindicación 1, en el que el promotor de amina es una anilina carboxisustituída o una acilhidrazina.

6. El método de la reivindicación 1, en el que el polipéptido modificado con cetona es de fórmula

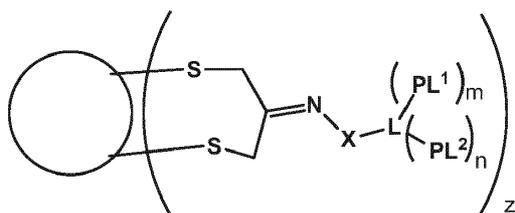


20 donde el círculo representa el polipéptido, y cada átomo de azufre es el sulfhidrilo de un resto de cisteína del polipéptido.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polipéptido modificado con oxima es un conjugado de proteína-carga de fórmula:



o



25 en la que el círculo representa la proteína, X es O, L representa un conector, m y n son cada uno independientemente de 1 a 10, z es un número entero de 1 a 10, y PL, PL<sup>1</sup> y PL<sup>2</sup> independientemente cada vez que aparecen representan un grupo de carga.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polipéptido es un anticuerpo.

30 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el polipéptido es un vehículo de vacuna.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la carga comprende un agente terapéutico.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la carga comprende un marcador detectable o un grupo de unión.

12. El método de la reivindicación 11, en el que L comprende un resto conector escindible.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que L comprende al menos un espaciador seleccionado de:

- (a) un enlace, -O-, -S-, -NH-, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))H-, -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-;
- 5 (b) alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -Z-alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-, -Z-alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -Z-alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>)-Z-alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)-Z-alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>)-Z-alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), donde Z es -NH-, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- , -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), fenileno, heteroarileno o heterociclono y donde dicho alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), dicho alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), y dichos restos alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>) cada uno independientemente contiene opcionalmente 1-10 átomos de oxígeno intercalados dentro de dichos restos;
- 10 (c) cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)-Y-cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), -Y-cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), fenileno, -Y-fenileno, fenileno-Y-fenileno, heteroarileno, Y-heteroarileno, heteroarileno-Y-heteroarileno, heterociclono, -Y-heterociclono, o heterociclono-Y-heterociclono, donde Y es alquilenilo(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>), alquenilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), alquinilenilo(C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>), -O-, -C(O)-, -S-, -NH-, -N(alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- , -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, o -NH-C(O)- y donde dicho cicloalquilenilo(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>), dicho fenileno, dicho heteroarileno y dichos restos heterociclono cada uno individualmente está opcionalmente sustituido con 1 a 3
- 15 sustituyentes seleccionados de halo, alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o alquilo(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) halosustituido;
- (d) -[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>- o -J-[CH<sub>2</sub>[OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>]<sub>v</sub>]- donde v es 1-2000, w es 1-4 y J es CH<sub>2</sub> o NH;
- (e) un péptido que comprende de 1 a 100 aminoácidos; y
- (f) macromoléculas dendríticas, incluyendo dendrímeros, dendrones y polímeros hiperramificados.

Figura 1

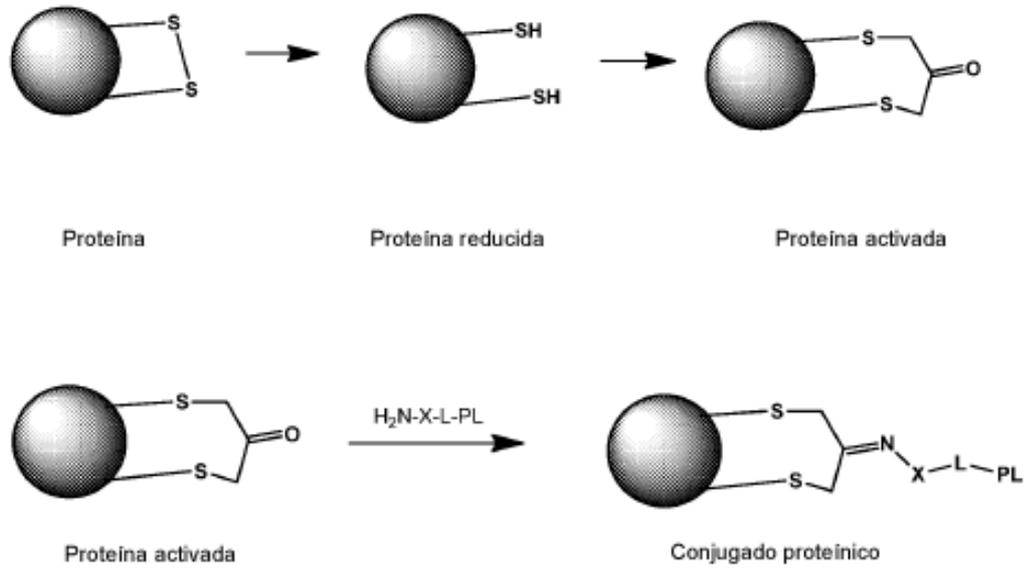
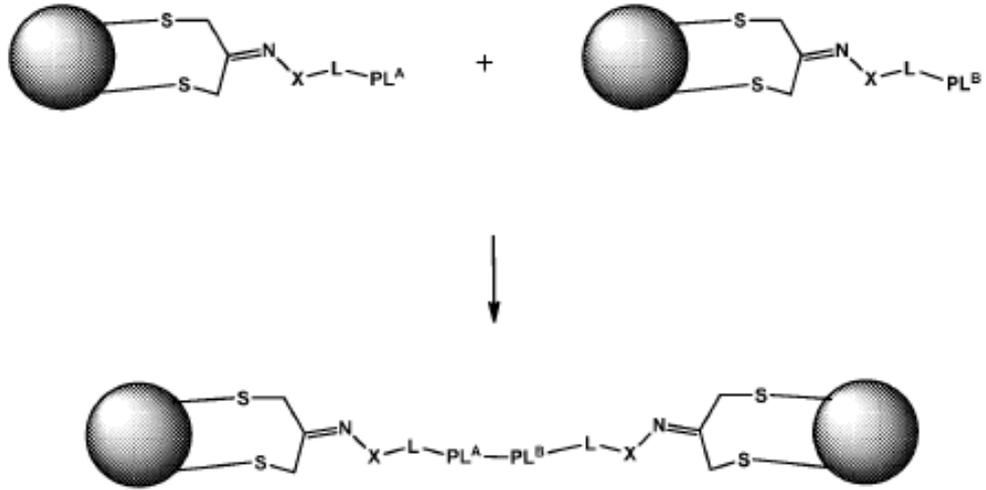


Figura 2. Acoplamiento de dos conjugados que tienen grupos de acoplamiento complementarios



PL<sup>A</sup> y PL<sup>B</sup> son grupos de acoplamiento complementarios

Figura 3

Figura 3A

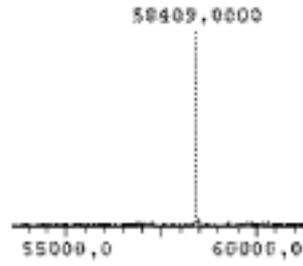


Figura 3B

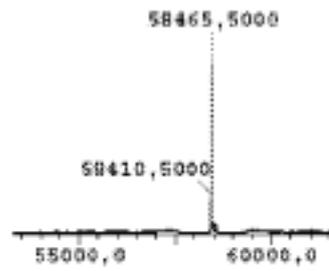


Figura 3C

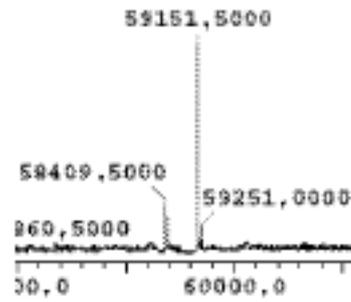
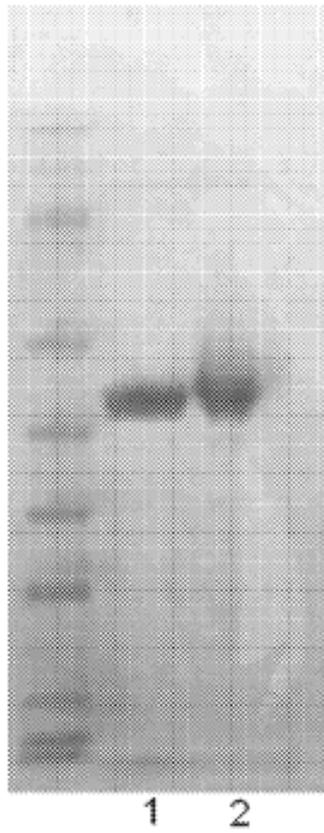


Figura 4

**Análisis en gel de SDS Page del compuesto azido de sitio definido que alberga CRM-197**



1 - CRM-197 modificado con cetona  
1 - CRM-197 modificado con oxima

Figura 5

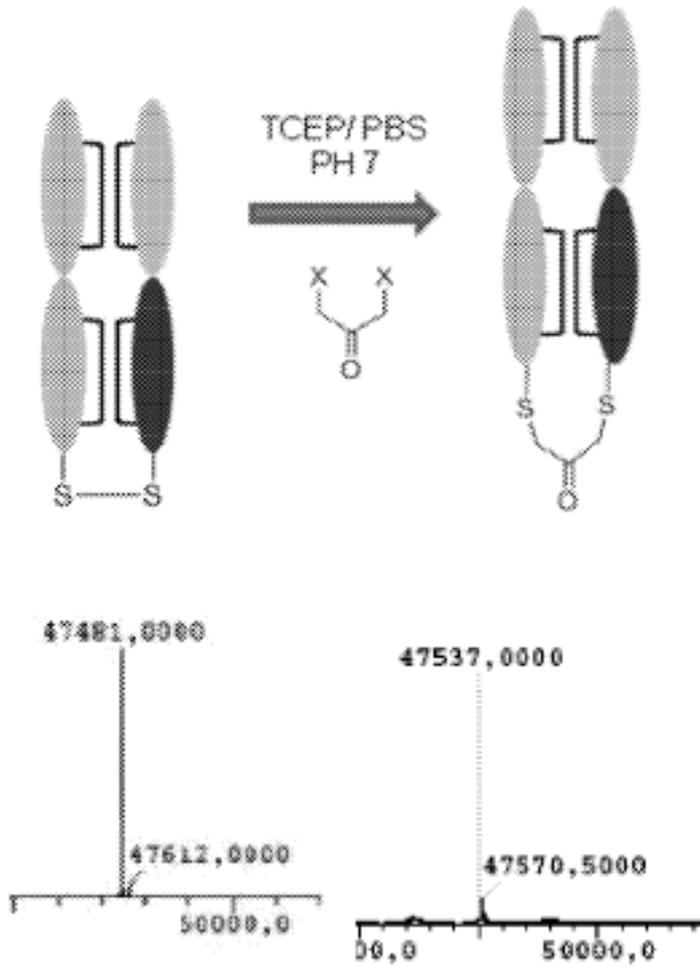


Figura 6

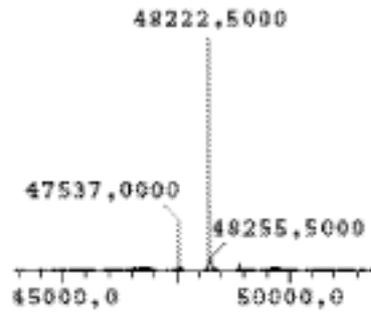
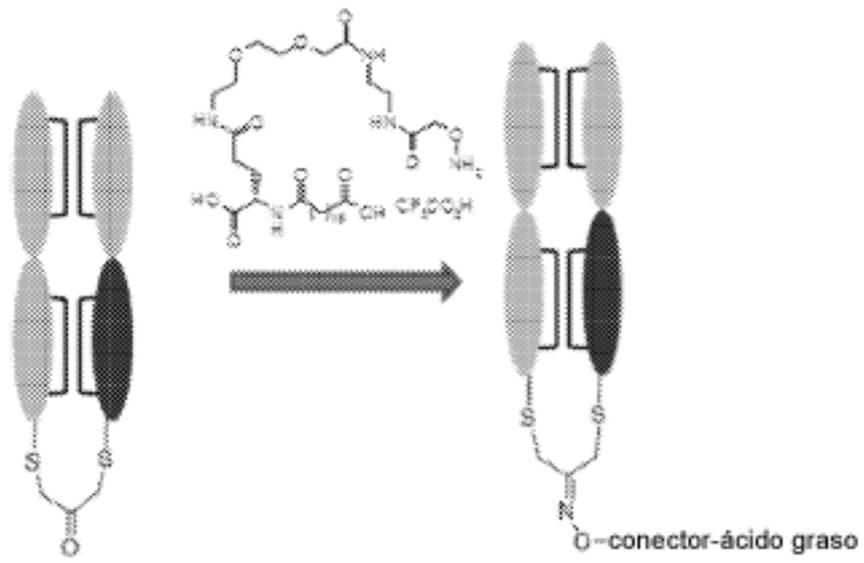
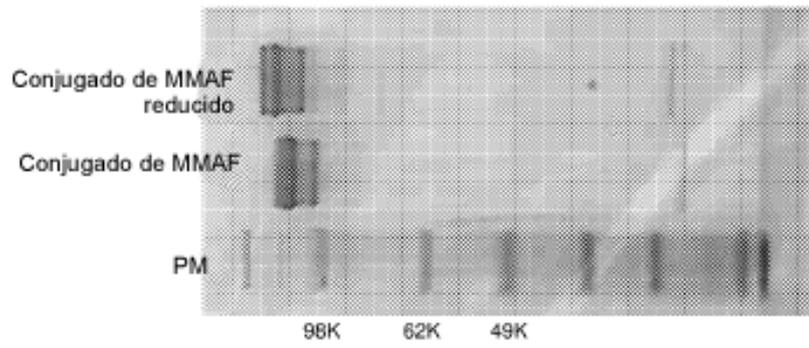


Figura 7.



CL-EM del producto del método B en el ejemplo 6.

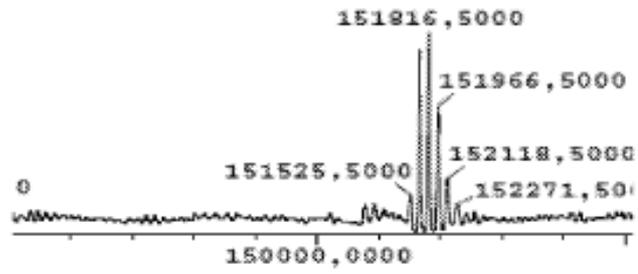
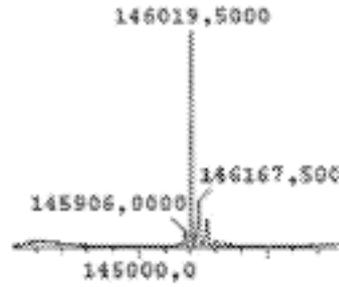
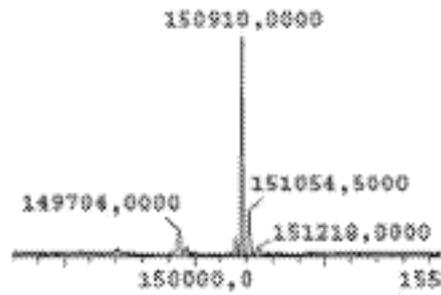


Figura 8.

Ejemplo 7, etapa 1:



Ejemplo 7, etapa 2: PL1, método A:



Ejemplo 7, etapa 2: PL2, método B:

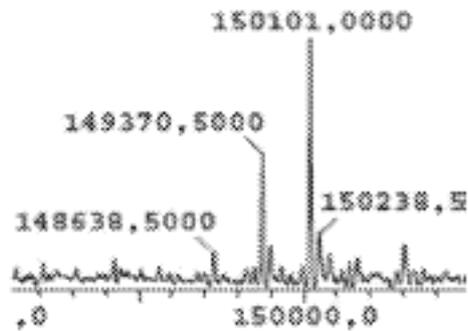


Figura 9

