

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 259**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/68** (2007.01)  
**A61K 39/44** (2006.01)  
**A61K 38/01** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 38/07** (2006.01)  
**C07D 403/12** (2006.01)  
**C07D 401/12** (2006.01)  
**C07D 207/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2013 PCT/US2013/041026**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173391**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2013 E 13790623 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2849790**

54 Título: **Conjugados de fármacos, métodos de conjugación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**15.05.2012 US 201261647300 P**  
**17.05.2012 US 201261648406 P**  
**17.05.2012 US 201261648532 P**  
**29.05.2012 US 201261652512 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.12.2019**

73 Titular/es:

**CONCORTIS BIOSYSTEMS, CORP (100.0%)**  
**11760 Sorrento Valley Road Suite N**  
**San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**MIAO, ZHENWEI;**  
**HONG, YUFENG;**  
**ZHU, TONG y**  
**CHUCHOLOWSKI, ALEXANDER WILHELM**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 734 259 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Conjugados de fármacos, métodos de conjugación y usos de los mismos

**Antecedentes**

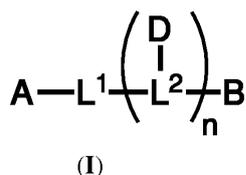
5 Recientemente, se ha descubierto que un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo, como un fragmento variable de cadena simple) se puede unir a un fármaco de carga para formar un inmunoconjugado que se ha denominado conjugado anticuerpo-fármaco, o ADC. El anticuerpo hace que el ADC se una a las células objetivo. A menudo, el ADC es interiorizado por la célula y el fármaco se libera para tratar la célula. Debido a la selección del objetivo, los efectos secundarios pueden ser menores que los efectos secundarios de la administración sistémica del fármaco. El documento US2011/268751 describe regímenes de dosificación semanales para conjugados fármaco-anticuerpo anti-CD30 VC-PAB-MMAE.

**Resumen**

Algunas realizaciones proporcionan conjugados de agente activo, métodos de preparación de conjugados de agente activo y usos de los mismos.

15 El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para el uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia o para diagnóstico.

La presente descripción proporciona un conjugado de agente activo que tiene la estructura de Fórmula I:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,

20 donde:

A puede ser un grupo de selección del objetivo;

B puede ser un resto auxiliar que opcionalmente es un segundo resto de selección del objetivo, o B puede ser nulo;

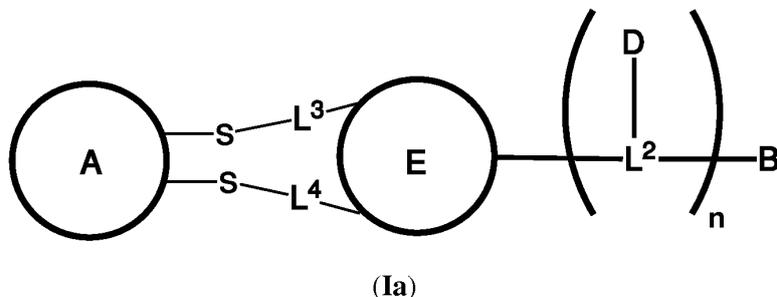
L<sup>1</sup> incluye un puente de 2 a 5 carbonos y al menos un átomo de azufre;

25 cada D puede seleccionarse independientemente, donde cada D incluye un agente activo;

cada L<sup>2</sup> puede ser independientemente un ligador, en donde al menos un L<sup>2</sup> está unido a L<sup>1</sup>; y

n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

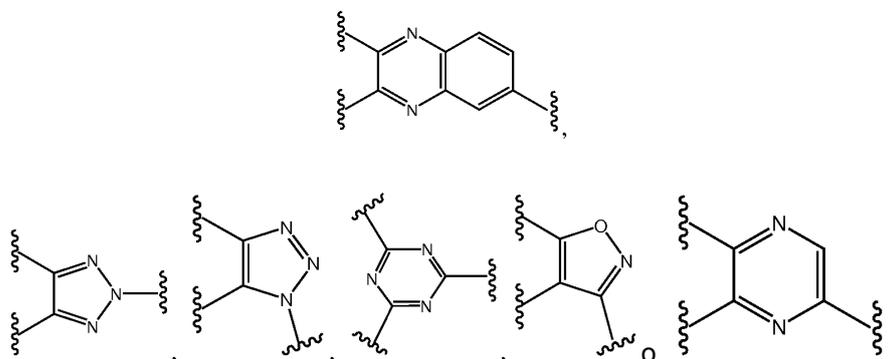
Así, en un aspecto, se proporciona un conjugado de agente activo que tiene la estructura de Fórmula Ia:



30 donde:

el componente A es un resto de selección del objetivo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal (mAB), un fragmento de anticuerpo, un ligando proteico, un armazón proteico y un péptido;

el componente E se selecciona del grupo que consiste en



5 B es un resto auxiliar que opcionalmente es un segundo resto de selección del objetivo seleccionado del grupo que consiste en: un polímero hidrófilo como PEG, un polímero biodegradable tal como proteínas no estructuradas, poliaminoácidos, polipéptidos, polisacáridos y combinaciones de los mismos, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un ligando proteico, un almacén proteico, un péptido, un ARN / ADN o un fragmento del mismo, o B es nulo;

10 cada D puede seleccionarse independientemente, donde cada D incluye un agente activo seleccionado del grupo que consiste en: un medicamento de quimioterapia, una molécula de unión a tubulina, un agente alquilante de ADN, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de ADN topoisomerasa, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de proteasoma, un péptido, un siARN, un ADN antisentido, epotilona A, epotilona B y paclitaxel;

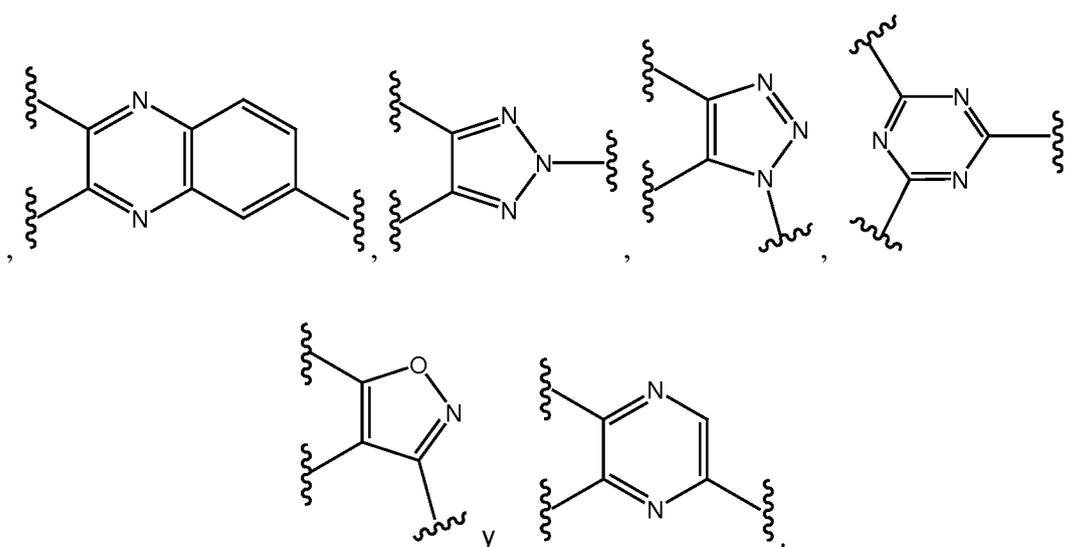
cada  $L^2$  es independientemente un ligador, en el que al menos un  $L^2$  está unido a E; y

n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

15  $L^3$  puede ser un alquilo  $C_1-C_6$  opcionalmente sustituido, o  $L^3$  es nulo, cuando  $L^3$  es nulo, el azufre está directamente conectado al componente E; y

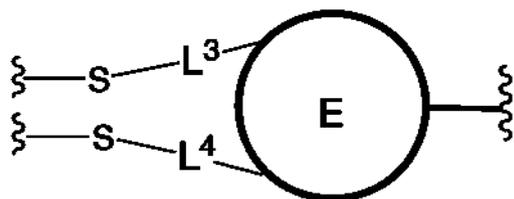
$L^4$  es un alquilo  $C_1-C_6$  opcionalmente sustituido, o  $L^4$  es nulo, cuando  $L^4$  es nulo, el azufre está directamente conectado al componente E.

El componente E incluye un fragmento seleccionado del grupo que consiste en:

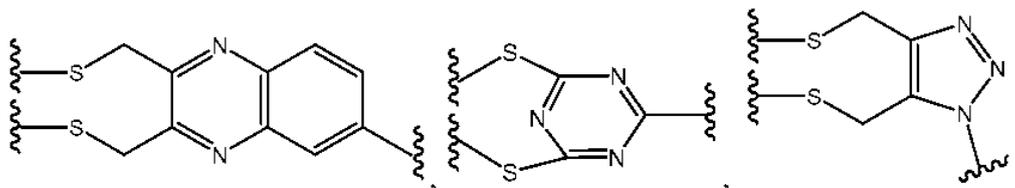


20 En algunas realizaciones,  $L^3$  puede ser  $-(CH_2)-$ ; y  $L^4$  puede ser  $-(CH_2)-$ . En algunas realizaciones,  $L^3$  puede ser nulo; y  $L^4$  puede ser nulo.

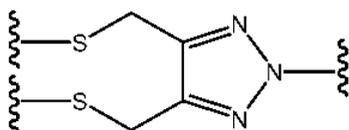
En algunas realizaciones,



puede ser:



o



- 5 En algunas realizaciones,  $L^2$  incluye  $-(CH_2)_n$  donde  $n$  puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones,  $L^2$  incluye  $-(CH_2CH_2O)_n$  donde  $n$  puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones,  $L^2$  incluye Val-CIT PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB o PAB. En algunas realizaciones,  $L^2$  incluye un péptido, oligosacárido,  $-(CH_2)_n$ ,  $-(CH_2CH_2O)_n$ , Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB, PAB, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones,  $L^2$  incluye una unidad no escindible. En algunas realizaciones, la unidad no escindible incluye  $-(CH_2)_n$  donde  $n$  puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, la unidad no escindible incluye  $-(CH_2CH_2O)_n$  donde  $n$  puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones,  $L^2$  incluye una unidad escindible. En algunas realizaciones, la unidad escindible comprende un péptido.

- 15 En algunas realizaciones, el componente A comprende un anticuerpo monoclonal (mAB). En algunas realizaciones, el componente A comprende un fragmento de anticuerpo, sustituto o variante. En algunas realizaciones, el componente A comprende un ligando proteico. En algunas realizaciones, el componente A comprende un armazón proteico. En algunas realizaciones, el componente A comprende un péptido. En algunos ejemplos, el componente A comprende un ligando de molécula pequeña. En algunas realizaciones, el componente A comprende al menos un residuo de L-alanina modificado. En algunas realizaciones, el componente A comprende al menos dos residuos de L-alanina modificados. En algunas realizaciones, al menos un  $L^2$  incluye  $-(CH_2)_n$  donde  $n$  puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, al menos un  $L^2$  incluye  $-(CH_2CH_2O)_n$  donde  $n$  puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, al menos un  $L^2$  incluye Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB o PAB. En algunas realizaciones, al menos un  $L^2$  incluye un péptido, un oligosacárido,  $-(CH_2)_n$ ,  $-(CH_2CH_2O)_n$ , Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB, PAB o combinaciones de los mismos.

### Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra el producto del cromatograma de HIC-HPLC del fármaco reactivo y el anticuerpo en una proporción fármaco / anticuerpo de 5,5: 1.
- 30 La Figura 2 muestra el producto del cromatograma de HIC-HPLC del fármaco reactivo y el anticuerpo en una proporción fármaco / anticuerpo de 6: 1.
- La Figura 3 muestra el producto del cromatograma de HIC-HPLC del fármaco reactivo y el anticuerpo en una proporción fármaco / anticuerpo de 1: 6,5.
- La Figura 4 muestra el producto del cromatograma de HIC-HPLC del fármaco reactivo y el anticuerpo en una proporción fármaco / anticuerpo de 1: 4.
- 35

La Figura 5 muestra los cromatogramas de HIC-HPLC para cada fracción de FPLC y, en un recuadro, una superposición de los picos para demostrar la pureza relativa de cada pico.

La Figura 6 muestra un análisis mediante SDS-PAGE reductora para las fracciones de FPLC representadas en las Figuras 4 y 5.

5 La Figura 7 muestra la viabilidad de las células SK-BR-3 para siete muestras de conjugado de anticuerpo y fármaco.

La Figura 8 muestra la viabilidad de las células HCC1954 para siete muestras de conjugado de anticuerpo y fármaco.

La Figura 9 muestra un análisis mediante SDS-PAGE reductora para el compuesto 40 conjugado con trastuzumab.

La Figura 10 muestra la viabilidad de las células SK-BR-3 para cuatro muestras de conjugado de anticuerpo y fármaco.

La Figura 11 muestra la viabilidad de las células HCC1954 para cuatro muestras de conjugado de anticuerpo y fármaco.

10 La Figura 12 muestra la viabilidad de las células SK-BR-3 para cuatro muestras de conjugado de anticuerpo y fármaco.

### Descripción detallada

15 Algunas realizaciones proporcionan un conjugado de agente activo. En algunas realizaciones, el conjugado de agente activo es un conjugado de fármaco. En algunas realizaciones, el conjugado de fármaco incluye una molécula de selección del objetivo. En algunas realizaciones, la molécula de selección del objetivo incluye un anticuerpo monoclonal (mAB). En algunas realizaciones, el conjugado de fármaco incluye un espaciador o un ligador multifuncional. En algunas realizaciones, el espaciador se conecta al mAB por un enlace sulfuro. En algunas realizaciones, el ligador multifuncional se conecta al mAB mediante un enlace sulfuro. En algunas realizaciones, el espaciador o ligador multifuncional puede estar conectado opcionalmente a un resto auxiliar. En algunas realizaciones, el resto auxiliar puede ser una segunda molécula de selección del objetivo tal como un mAB y péptido. En algunas realizaciones, el resto auxiliar puede ser un polímero hidrófilo tal como polietilenglicol (PEG), y similares. En algunas realizaciones, el espaciador o ligador multifuncional puede incluir un puente de 2 a 5 átomos. En algunas realizaciones, el espaciador o ligador multifuncional puede incluir un puente 4C (cuatro carbonos).

20 Los métodos de conjugación para derivatizar un polipéptido con una carga se pueden lograr usando un resto maleimido o vinilo que puede reaccionar con un grupo sulfhidrilo individual de un anticuerpo a través de la reacción de adición de Michael. El grupo sulfhidrilo libre se puede formar reduciendo un enlace disulfuro de un anticuerpo. Sin embargo, la integridad estructural de un anticuerpo puede verse comprometida después de abrir enlaces disulfuro y unir cargas a los tioles libres expuestos. Las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria proporcionan la conjugación a través de cisteína sin una estabilidad estructural disminuida.

### Definiciones

30 Como se usan en la presente memoria, las abreviaturas orgánicas comunes se definen de la siguiente manera:

Ac	Acetilo
ac.	Acuoso
BOC o Boc	terc-Butoxicarbonilo
BrOP	hexafluorofosfato de bromo tris (dimetilamino) fosfonio
35 Bu	n-Butilo
° C	Temperatura en grados centígrados
DCM	cloruro de metileno
DEPC	Cianofosfonato de dietilo
DIC	diisopropilcarbodiimida
40 DIEA	Diisopropiletilamina
DMA	N,N'-Dimetilacetamida
DMF	N,N'-Dimetilformamida
TDT	Ditiotreitól
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

	Et	Etilo
	EtOAc	Acetato de etilo
	Eq	Equivalentes
	Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
5	g	Gramo(s)
	h	Hora (horas)
	HATU	Hexafluorofosfato de 2-(1 <i>H</i> -7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio
	HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
	HOBT	N-Hidroxibenzotriazol
10	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	LC / MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
	Me	Metilo
	MeOH	Metanol
	MeCN	Acetonitrilo
15	mL	Mililitro(s)
	MS	espectrometría de masas
	PAB	p-aminobencilo
	RP-HPLC	HPLC de fase inversa
	t-Bu	terc-Butilo
20	TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
	TEA	Trietilamina
	Terc, t	terciario
	TFA	Ácido trifluoracético
	THF	Tetrahidrofurano
25	THP	Tetrahidropiranilo
	TLC	Cromatografía de capa fina
	μL	Microlitro(s)

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que retienen la eficacia y propiedades biológicas de un compuesto y que no son indeseables biológicamente o de otra manera para su uso en un producto farmacéutico.

30 En muchos casos, los compuestos descritos en la presente memoria son capaces de formar sales de ácidos y / o bases en virtud de la presencia de grupos amino y / o carboxilo o grupos similares a los mismos. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos. Los ácidos inorgánicos de los que se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Los ácidos orgánicos de los cuales se pueden derivar las sales

35 incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas. Las bases inorgánicas de las que se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, las de sodio, potasio, litio, amonio, calcio,

40 magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares; se prefieren particularmente las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las bases orgánicas de las que se pueden derivar las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas presentes en la naturaleza, aminas cíclicas, resinas de intercambio iónico básicas y similares, específicamente tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Muchas de estas sales son

conocidas en la técnica, como se describe en el documento WO 87/05297, Johnston et al., Publicado el 11 de septiembre de 1987.

Tal como se usa en la presente memoria, "C<sub>a</sub> a C<sub>b</sub>" o "C<sub>a-b</sub>" en el que "a" y "b" son números enteros, se refiere al número de átomos de carbono en el grupo especificado. Es decir, el grupo puede contener desde "a" hasta "b", inclusive, átomos de carbono. Así, por ejemplo, un grupo "alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>" o "alquilo C<sub>1-4</sub>" se refiere a todos los grupos alquilo que tienen de 1 a 4 carbonos, es decir, CH<sub>3</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)- y (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-.

El término "halógeno" o "halo", como se usa en la presente memoria, significa cualquiera de los átomos radioestables de la columna 7 de la Tabla Periódica de los Elementos, por ejemplo, flúor, cloro, bromo o yodo, y se prefieren flúor y cloro.

Como se usa en la presente memoria, "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que está completamente saturada (es decir, no contiene enlaces dobles o triples). El grupo alquilo puede tener de 1 a 20 átomos de carbono (cuando aparece en la presente memoria, un rango numérico tal como "1 a 20" se refiere a cada número entero en el rango dado; por ejemplo, "1 a 20 átomos de carbono" significa que el grupo alquilo puede consistir en 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquilo" donde no se designa un rango numérico). El grupo alquilo también puede ser un alquilo de tamaño medio que tiene de 1 a 9 átomos de carbono. El grupo alquilo también podría ser un alquilo inferior que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. El grupo alquilo puede designarse como "alquilo C<sub>1-4</sub>" o designaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquilo C<sub>1-4</sub>" indica que hay de uno a cuatro átomos de carbono en la cadena alquilo, es decir, la cadena alquilo se selecciona del grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo y t-butilo. Los grupos alquilo típicos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo y similares.

Como se usa en la presente memoria, "alcoxi" se refiere a la fórmula -OR en la que R es un alquilo como se definió anteriormente, como "alcoxi C<sub>1-9</sub>", que incluye, pero sin limitación, metoxi, etoxi, n-propoxi, 1-metiletoxí (isopropoxi), n-butoxi, iso-butoxi, sec-butoxi y terc-butoxi, y similares.

Como se usa en la presente memoria, "alquiltio" se refiere a la fórmula -SR en la que R es un alquilo como se definió anteriormente, como "alquiltio C<sub>1-9</sub>" y similares, que incluye, pero sin limitación, metilmercapto, etilmercapto, n-propilmercapto, 1-metiletilmercapto (isopropilmercapto), n-butilmercapto, iso-butilmercapto, sec-butilmercapto, terc-butilmercapto y similares.

Como se usa en la presente memoria, "alquenilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene uno o más enlaces dobles. El grupo alquenilo puede tener de 2 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquenilo" en la que no se designa un rango numérico. El grupo alquenilo también puede ser un alquenilo de tamaño medio que tiene de 2 a 9 átomos de carbono. El grupo alquenilo también podría ser un alquenilo inferior que tiene 2 a 4 átomos de carbono. El grupo alquenilo puede designarse como "alquenilo C<sub>2-4</sub>" o denominaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquenilo C<sub>2-4</sub>" indica que hay de dos a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquenilo, es decir, la cadena de alquenilo se selecciona del grupo que consiste en etenilo, propen-1-ilo, propen-2-ilo, propen-3-ilo, buten-1-ilo, buten-2-ilo, buten-3-ilo, buten-4-ilo, 1-metil-propen-1-ilo, 2-metil-propen-1-ilo, 1-etil-eten-1-ilo, 2-metil-propen-3-ilo, buta-1,3-dienilo, buta-1,2-dienilo y buta-1,2-dien-4-ilo. Los grupos alquenilo típicos incluyen, pero sin limitación en absoluto, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo y hexenilo, y similares.

Como se usa en la presente memoria, "alquinilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada que contiene uno o más enlaces triples. El grupo alquinilo puede tener de 2 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "alquinilo" en la que no se designa un rango numérico. El grupo alquinilo también puede ser un alquinilo inferior que tiene 2 a 4 átomos de carbono. El grupo alquinilo puede designarse como "alquinilo C<sub>2-4</sub>" o denominaciones similares. Solo a modo de ejemplo, "alquinilo C<sub>2-4</sub>" indica que hay de dos a cuatro átomos de carbono en la cadena de alquinilo, es decir, la cadena de alquinilo se selecciona del grupo que consiste en etinilo, propin-1-ilo, propin-2-ilo, butin-1-ilo, butin-3-ilo, butin-4-ilo y 2-butinilo. Los grupos alquinilo típicos incluyen, pero sin limitación en absoluto, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo y hexinilo, y similares.

El término "aromático" se refiere a un anillo o sistema de anillos que tiene un sistema de electrones pi conjugados, e incluye grupos aromáticos carbocíclicos (por ejemplo, fenilo) y aromáticos heterocíclicos (por ejemplo, piridina). El término incluye grupos monocíclicos o policíclicos de anillos condensados (es decir, anillos que comparten pares de átomos adyacentes) siempre que todo el sistema de anillos sea aromático.

Como se usa en la presente memoria, "ariloxi" y "ariltio" se refiere a RO- y RS-, en el que R es un arilo como se define anteriormente, tal como "ariloxi C<sub>6-10</sub>" o "ariltio C<sub>6-10</sub>" y similares, que incluye, pero sin limitación, feniloxi.

Un "aralquilo" o "arilalquilo" es un grupo arilo conectado, como sustituyente, a través de un grupo alquilenilo, tal como "aralquilo C<sub>7-14</sub>" y similares, incluidos, entre otros, bencilo, 2-feniletilo, 3-fenilpropilo, y naftilalquilo. En algunos casos, el grupo alquilenilo es un grupo alquilenilo inferior (es decir, un grupo alquilenilo C<sub>1-4</sub>).

Como se usa en la presente memoria, "heteroarilo" se refiere a un anillo aromático o sistema de anillos (es decir, dos o más anillos condensados que comparten dos átomos adyacentes) que contienen uno o más heteroátomos, es decir, un elemento distinto del carbono, que incluyen, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno y azufre, en el esqueleto del anillo. Cuando el heteroarilo es un sistema de anillos, cada anillo del sistema es aromático. El grupo heteroarilo puede tener 5-18 miembros en el anillo (es decir, el número de átomos que forman el esqueleto del anillo, incluidos los átomos de carbono y los heteroátomos), aunque la presente definición también cubre la aparición del término "heteroarilo" donde no se designa un rango numérico. En algunas realizaciones, el grupo heteroarilo tiene 5 a 10 miembros en el anillo o 5 a 7 miembros en el anillo. El grupo heteroarilo puede designarse como "heteroarilo de 5 a 7 miembros", "heteroarilo de 5 a 10 miembros" o designaciones similares. Los ejemplos de anillos heteroarilo incluyen, pero sin limitación, furilo, tienilo, ftalazinilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, quinolinilo, isoquinililo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, indolilo, isoindolilo y benzotienilo.

Un "heteroaralquilo" o "heteroarilalquilo" es un grupo heteroarilo conectado, como sustituyente, a través de un grupo alquileo. Los ejemplos incluyen, entre otros, 2-tienilmetilo, 3-tienilmetilo, furilmetilo, tieniletilo, pirrolilalquilo, piridilalquilo, isoxazolilalquilo e imidazolilalquilo. En algunos casos, el grupo alquileo es un grupo alquileo inferior (es decir, un grupo alquileo C<sub>1-4</sub>).

Tal como se usa en la presente memoria, "carbociclilo" significa un anillo cíclico o sistema de anillos no aromático que contiene solo átomos de carbono en el esqueleto del sistema de anillos. Cuando el carbociclilo es un sistema de anillos, dos o más anillos pueden estar unidos entre sí de manera condensada, por un puente o conectados de forma espiro. Los carbociclilos pueden tener cualquier grado de saturación siempre que al menos un anillo de un sistema de anillos no sea aromático. Así, los carbociclilos incluyen cicloalquilos, cicloalquenilos y cicloalquinilos. El grupo carbociclilo puede tener de 3 a 20 átomos de carbono, aunque la presente definición también cubre la aparición del término "carbociclilo" en la que no se designa un rango numérico. El grupo carbociclilo también puede ser un carbociclilo de tamaño medio que tiene de 3 a 10 átomos de carbono. El grupo carbociclilo también podría ser un carbociclilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono. El grupo carbociclilo puede designarse como "carbociclilo C<sub>3-6</sub>" o designaciones similares. Los ejemplos de anillos de carbociclilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 2,3-dihidro-indeno, biciclo [2.2.2] octanilo, adamantilo y espiro [4.4] nonanilo.

Un "(carbocicliil) alquilo" es un grupo carbociclilo conectado, como sustituyente, a través de un grupo alquileo, tal como "(carbocicliil) alquilo C<sub>4-10</sub>" y similares, incluyendo, entre otros, ciclopropilmetilo, ciclobutilmetilo, ciclopropiletilo, ciclopropilbutilo, ciclobutilletilo, ciclopropilisopropilo, ciclopentilmetilo, ciclopentiletilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo, cicloheptilmetilo y similares. En algunos casos, el grupo alquileo es un grupo alquileo inferior.

Como se usa en la presente memoria, "cicloalquilo" significa un anillo o un sistema de anillos de carbociclilo completamente saturado. Los ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

Como se usa en la presente memoria, "cicloalquenilo" significa un anillo de carbociclilo o sistema de anillos que tiene al menos un doble enlace, en el que ningún anillo del sistema de anillos es aromático. Un ejemplo es ciclohexenilo.

Como se usa en la presente memoria, "heterociclilo" significa un anillo cíclico o un sistema de anillos no aromático que contiene al menos un heteroátomo en el esqueleto del anillo. Los heterociclilos pueden estar unidos entre sí de manera condensada, por un puente o conectados de forma espiro. Los heterociclilos pueden tener cualquier grado de saturación siempre que al menos un anillo del sistema de anillos no sea aromático. El/los heteroátomo(s) puede(n) estar presente(s) en un anillo no aromático o aromático del sistema de anillos. El grupo heterociclilo puede tener de 3 a 20 miembros en el anillo (es decir, el número de átomos que forman el esqueleto del anillo, incluidos los átomos de carbono y los heteroátomos), aunque la presente definición también cubre la aparición del término "heterociclilo", donde no se designa ningún rango numérico. El grupo heterociclilo también puede ser un heterociclilo de tamaño medio que tiene de 3 a 6 miembros en el anillo. El grupo heterociclilo puede designarse como heterociclilo de 3-6 miembros o designaciones similares. En los heterociclilos monocíclicos preferidos de seis miembros, los heteroátomos se seleccionan de uno a tres de O (oxígeno), N (nitrógeno) o S (azufre), y en los heterociclilos monocíclicos preferidos de cinco miembros, el/los heteroátomo(s) se selecciona(n) de uno o dos heteroátomos seleccionados de O (oxígeno), N (nitrógeno) o S (azufre). Los ejemplos de anillos de heterociclilo incluyen, pero sin limitación, azepinilo, acridinilo, carbazolilo, cinolinilo, dioxolanilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, morfolinilo, oxiranilo, oxepanilo, tiepanilo, piperidinilo, piperazinilo, dioxopiperazinilo, pirrolidinilo, pirrolidionilo, pirrolidionilo, 4-piperidonilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, 1,3-dioxinilo, 1,3-dioxanilo, 1,4-dioxinilo, 1,4-dioxanilo, 1,3-oxatianilo, 1,4-oxatianilo, 1,4-oxatianilo, 2H-1,2-oxazinilo, trioxanilo, hexahidro-1,3,5- triazinilo, 1,3-dioxolilo, 1,3-dioxolanilo, 1,3-ditiolilo, 1,3-ditiolanilo, isoxazolinilo, isoxazolidinilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, oxazolidinonilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, 1,3-oxatiolanilo, indolinilo, isoindolinilo, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopirano, tetrahidro-1,4-tiazinilo, tiamorfolinilo, dihidrobenzofuranilo, benzimidazolidinilo, y tetrahidroquinolina.

Un "(heterocicliil) alquilo" es un grupo heterociclilo conectado, como sustituyente, a través de un grupo alquileo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, imidazolinilmetilo e indoliniletilo.

Como se usa en la presente memoria, "acilo" se refiere a -C(=O)R, donde R es hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>,

alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes incluyen formilo, acetilo, propanoilo, benzoilo y acrilo.

5 Un grupo "O-carboxilo" se refiere a un grupo "-OC(=O)R" en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "C-carboxilo" se refiere a un grupo "-C(=O)OR" en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, tal como se define en la presente memoria. Un ejemplo no limitante incluye carboxilo (es decir, -C(=O)OH).

Un grupo "ciano" se refiere a un grupo "-CN".

10 Un grupo "cianato" se refiere a un grupo "-OCN".

Un grupo "isocianato" se refiere a un grupo "-NCO".

Un grupo "tiocianato" se refiere a un grupo "-SCN".

Un grupo "isotiocianato" se refiere a un grupo "-NCS".

15 Un grupo "sulfino" se refiere a un grupo "-S(=O)R" en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "sulfonilo" se refiere a un grupo "-SO<sub>2</sub>-R" en el que R se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

20 Un grupo "S-sulfonamido" se refiere a un grupo "-SO<sub>2</sub>NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

25 Un grupo "N-sulfonamido" se refiere a un grupo "-N(R<sub>A</sub>)SO<sub>2</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "O-carbamilo" se refiere a un grupo "-OC(=O)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

30 Un grupo "N-carbamilo" se refiere a un grupo "-N(R<sub>A</sub>)C(=O)OR<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "O-tiocarbamilo" se refiere a un grupo "-OC(=S)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

35 Un grupo "urea" se refiere a un grupo "-N(R<sub>A</sub>)C(=O)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

40 Un grupo "N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo "-N(R<sub>A</sub>)C(=S)OR<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

Un grupo "C-amido" se refiere a un grupo "-C(=O)NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente memoria.

45 Un grupo "N-amido" se refiere a un grupo "-N(R<sub>A</sub>)C(=O)R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, tal como se define en la presente memoria.

50 Un grupo "amino" se refiere a un grupo "-NR<sub>A</sub>R<sub>B</sub>" en el que R<sub>A</sub> y R<sub>B</sub> se seleccionan cada uno independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1-6</sub>, alquenilo C<sub>2-6</sub>, alquinilo C<sub>2-6</sub>, carbociclilo C<sub>3-7</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, tal como se define en la presente memoria. Un ejemplo no limitante incluye amino libre (es decir, -NH<sub>2</sub>).

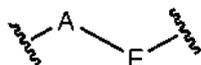
Un grupo "aminoalquilo" se refiere a un grupo amino conectado a través de un grupo alquilenos.

Un grupo "alcoxialquilo" se refiere a un grupo alcoxi conectado a través de un grupo alquilenos, tal como un "alcoxialquilo C<sub>2-8</sub>" y similares.

5 Como se usa en la presente memoria, un grupo sustituido deriva del grupo original no sustituido en el que ha habido un intercambio de uno o más átomos de hidrógeno por otro átomo o grupo. A menos que se indique lo contrario, cuando se considera que un grupo está "sustituido", se entiende que el grupo está sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados independientemente entre alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alquenilo C<sub>2-C<sub>6</sub></sub>, alquinilo C<sub>2-C<sub>6</sub></sub>, carbocicli C<sub>3-C<sub>7</sub></sub> (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, haloalquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, y haloalcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>), carbocicli C<sub>3-C<sub>7</sub></sub>-alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub> (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, haloalquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, y haloalcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>), heterocicli de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, haloalquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, y haloalcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>), heterocicli de 5-10 miembros-alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub> (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, haloalquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, y haloalcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>), arilo (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, haloalquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, y haloalcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>), arilo (alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, haloalquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, y haloalcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>), heteroarilo de 5-10 miembros (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, haloalquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, y haloalcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>), heteroarilo de 5-10 miembros-alquilo (C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>) (opcionalmente sustituido con halo, alquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, haloalquilo C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, y haloalcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>), halo, ciano, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>, alcoxi C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>-alquilo (C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>) (es decir, éter), ariloxi, sulfhidrilo (mercapto), halo alquilo (C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>) (por ejemplo, -CF<sub>3</sub>), halo alcoxi (C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>) (por ejemplo, -OCF<sub>3</sub>), alquil C<sub>1-C<sub>6</sub></sub> tio, ariltio, amino, amino alquilo (C<sub>1-C<sub>6</sub></sub>), nitro, O-carbamilo, N-carbamilo, O-tiocarbamilo, N-tiocarbamilo, C-amido, N-amido, S-sulfonamido, N-sulfonamido, C-carboxi, O-carboxi, acilo, cianato, isocianato, tiocianato, isotiocianato, sulfinilo, sulfonilo y oxo (=O). Cuando un grupo se describe como "opcionalmente sustituido", ese grupo puede estar sustituido con los sustituyentes anteriores.

Debe entenderse que ciertas convenciones de denominación de radicales pueden incluir un mono-radical o un di-radical, dependiendo del contexto. Por ejemplo, cuando un sustituyente requiere dos puntos de unión al resto de la molécula, se entiende que el sustituyente es un di-radical. Por ejemplo, un sustituyente identificado como alquilo que requiere dos puntos de unión incluye di-radicales tales como -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>-, y similares. Otras convenciones de denominación de radicales indican claramente que el radical es un di-radical tal como "alquilenos" o "alquenilos".

30 Cuando un sustituyente se representa como un di-radical (es decir, tiene dos puntos de unión al resto de la molécula), debe entenderse que el sustituyente puede unirse en cualquier configuración direccional, a menos que se indique lo contrario. Así, por ejemplo, un sustituyente representado como -AE- o



incluye el sustituyente que está orientado de tal manera que A está unido en el punto de unión más a la izquierda de la molécula, así como el caso en el que A está unido en el punto de unión de la molécula más a la derecha.

35 "Sujeto", como se usa en la presente memoria, significa un ser humano o un mamífero no humano, por ejemplo, un perro, un gato, un ratón, una rata, una vaca, una oveja, un cerdo, una cabra, un primate no humano o un ave, por ejemplo, un pollo, así como cualquier otro vertebrado o invertebrado.

Métodos de conjugación, espaciadores y ligadores implicados

40 Algunas realizaciones proporcionan un método de conjugación de una molécula de selección del objetivo a través de un espaciador o un ligador multifuncional. En algunas realizaciones, el espaciador o ligador multifuncional puede incluir un puente de 2 a 5 átomos. En algunas realizaciones, el método incluye un enfoque de conjugación de una sola etapa o secuencial. En algunas realizaciones, los conjugados de fármaco incluyen un espaciador o un ligador multifuncional. En algunas realizaciones, el espaciador o ligador multifuncional puede incluir una unidad no escindible o escindible tal como péptidos.

Utilidades y aplicaciones

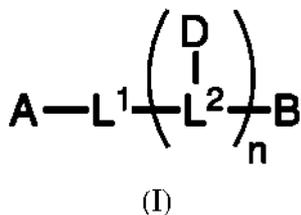
45 Algunas realizaciones proporcionan un método para tratar a un paciente que lo necesita, que comprende administrar un conjugado de agente activo como se revela y describe en la presente memoria a dicho paciente. En algunas realizaciones, el paciente puede tener cáncer, enfermedades inmunitarias o diabetes.

Algunas realizaciones proporcionan un método de diagnóstico o de imagenología que comprende administrar un conjugado de agente activo como se revela y describe en la presente memoria a un individuo.

50

Ciertas estructuras

La presente descripción proporciona un conjugado de agente activo que tiene la estructura de Fórmula I



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,

5 donde:

A puede ser una molécula de selección del objetivo;

B es un resto auxiliar que opcionalmente es una segunda molécula de selección del objetivo, o B es nulo;

L<sup>1</sup> incluye un puente de 2 a 5 carbonos y al menos un átomo de azufre;

cada D se selecciona independientemente, donde cada D incluye un agente activo;

10 cada L<sup>2</sup> es independientemente un ligador, en donde al menos un L<sup>2</sup> se enlaza está unido a L<sup>1</sup>; y

n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

En algunas realizaciones, A puede ser un anticuerpo monoclonal (mAB).

En algunas realizaciones, A puede ser un fragmento de anticuerpo, un sustituto o una variante.

En algunas realizaciones, A puede ser un ligando proteico.

15 En algunas realizaciones, A puede ser un armazón proteico.

En algunas realizaciones, A puede ser un péptido.

En algunos ejemplos, A puede ser un ligando de molécula pequeña.

20 En algunas realizaciones, B puede ser un polímero hidrófilo. En algunas realizaciones, el polímero hidrófilo puede ser polietilenglicol (PEG), y similares. En algunas realizaciones, B puede ser un polímero biodegradable. En algunas realizaciones, el polímero biodegradable puede ser proteínas no estructuradas, poliaminoácidos, polipéptidos, polisacáridos y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, B puede ser un anticuerpo monoclonal (mAB).

En algunas realizaciones, B puede ser un fragmento de anticuerpo, un sustituto o una variante.

En algunas realizaciones, B puede ser un ligando proteico.

25 En algunas realizaciones, B puede ser un armazón proteico.

En algunas realizaciones, B puede ser un péptido.

En algunas realizaciones, B puede ser ARN o ADN.

En algunas realizaciones, B puede ser un fragmento de ARN o ADN.

En algunos ejemplos, B puede ser un ligando de molécula pequeña.

30 En algunos ejemplos, D puede ser un compuesto biológicamente activo.

En algunos ejemplos, D puede ser un fármaco.

En algunas realizaciones, D puede ser un fármaco de quimioterapia.

En algunos ejemplos, D puede ser un producto natural.

En algunos ejemplos, D puede ser un modulador inmunitario.

- En algunas realizaciones, D puede ser una molécula de unión a tubulina.
- En algunas realizaciones, D puede ser un agente alquilante de ADN.
- En algunas realizaciones, D puede ser un inhibidor de HSP90.
- En algunas realizaciones, D puede ser un inhibidor de la ADN topoisomerasa.
- 5 En algunos ejemplos, D puede ser un agente anti-epigenético.
- En algunas realizaciones, D puede ser un inhibidor de HDAC.
- En algunos ejemplos, D puede ser un agente anti-metabolismo.
- En algunas realizaciones, D puede ser un inhibidor de proteasoma.
- En algunas realizaciones, D puede ser un péptido.
- 10 En algunos ejemplos, D puede ser una molécula peptidomimética.
- En algunas realizaciones, D puede ser un siARN.
- En algunas realizaciones, D puede ser un ADN antisentido.
- En algunas realizaciones, D puede ser epotilona A, epotilona B o paclitaxel.
- 15 En algunas realizaciones, L<sup>2</sup> puede incluir un espaciador o un ligador multifuncional. En algunas realizaciones, L<sup>2</sup> puede incluir un espaciador y un ligador multifuncional. En algunas realizaciones, L<sup>2</sup> puede incluir un ligador multifuncional. En algunas realizaciones, cada L<sup>2</sup> puede ser un ligador, en el que el ligador puede ser escindible o no escindible en condiciones biológicas. En algunas realizaciones, el ligador puede ser escindible por una enzima. En algunas realizaciones, L<sup>2</sup> puede incluir un Ligador.
- 20 En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> incluye un puente de 2 a 5 carbonos y al menos un átomo de azufre. En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> incluye un puente de 2 a 5 carbonos y al menos dos átomos de azufre. En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> incluye un puente de 2 a 5 carbonos y un espaciador. En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> incluye un puente de 2 a 5 carbonos, al menos dos átomos de azufre y un espaciador. En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> puede incluir uno o más azufres. En algunos ejemplos, el L<sup>1</sup> puede incluir dos o más azufres. En algunos ejemplos, el L<sup>1</sup> puede incluir exactamente dos azufres. En algunos ejemplos, puede incluir un puente de 4 carbonos y / o un espaciador. En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> incluye un puente de 4 carbonos o un espaciador. En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> puede incluir un puente de 4 carbonos y un espaciador. En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> incluye un puente de 4 carbonos y al menos dos átomos de azufre. En algunos ejemplos, el espaciador se conecta al mAB por un enlace de sulfuro. En algunos ejemplos, el espaciador se conecta al mAB a través de un tioéter.
- 25 En algunas realizaciones, A comprende al menos un residuo de L-alanina modificado. En algunas realizaciones, A comprende al menos dos residuos de L-alanina modificados. En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> comprende al menos un azufre. En algunos ejemplos, L<sup>1</sup> comprende al menos dos azufres. En algunos ejemplos, A comprende al menos un residuo de L-alanina modificado que está conectado a al menos un azufre de L<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, al menos un residuo de L-alanina modificado es de un residuo de L-cisteína de un péptido antes de la conjugación. En algunos ejemplos, al menos un azufre de L<sup>1</sup> proviene de una L-cisteína de un péptido antes de la conjugación. En algunos ejemplos, A y L<sup>1</sup> juntos comprenden al menos un tioéter.
- 30 En algunas realizaciones, el Ligador puede ser un péptido.
- 35 En algunas realizaciones, el Ligador puede incluir un oligosacárido. Por ejemplo, el Ligador puede incluir quitosano. En algunas realizaciones, L<sup>2</sup> puede incluir el Ligador y  $-(CH_2)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, L<sup>2</sup> puede incluir el Ligador y  $-(CH_2CH_2O)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.
- En algunas realizaciones, el Ligador puede incluir  $-(CH_2)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.
- 40 En algunas realizaciones, el Ligador puede incluir  $-(CH_2CH_2O)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10.
- En algunas realizaciones, el Ligador puede incluir Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB, PAB, o similares.
- 45 En algunas realizaciones, el Ligador puede incluir cualquier combinación de péptido, oligosacárido,  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_n-$ , Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB, PAB, y similares.
- En algunas realizaciones, el espaciador puede incluir un péptido.
- En algunas realizaciones, el espaciador puede incluir un oligosacárido. Por ejemplo, el espaciador puede incluir

quitosano.

En algunas realizaciones, el espaciador puede incluir  $-(CH_2)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunos ejemplos,  $L^1$  puede incluir un componente que incluye un puente de 4 carbonos y  $-(CH_2)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

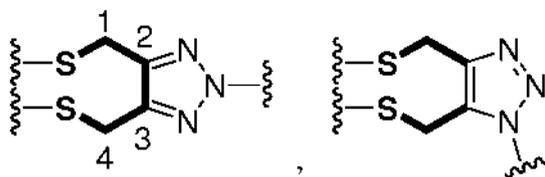
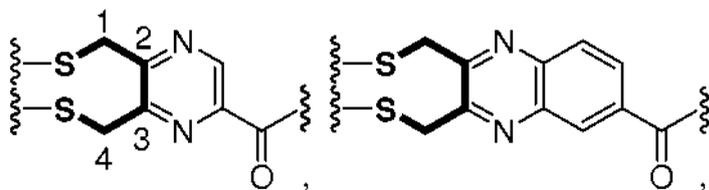
- 5 En algunas realizaciones, el espaciador puede incluir  $-(CH_2CH_2O)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. En algunos ejemplos,  $L^1$  puede incluir un componente que incluye un puente de 4 carbonos y  $-(CH_2CH_2O)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

En algunas realizaciones, el espaciador puede incluir Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB, PAB, o similares.

- 10 En algunas realizaciones, el espaciador puede ser cualquier combinación de péptido, oligosacárido,  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_n-$ , Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB, PAB, y similares.

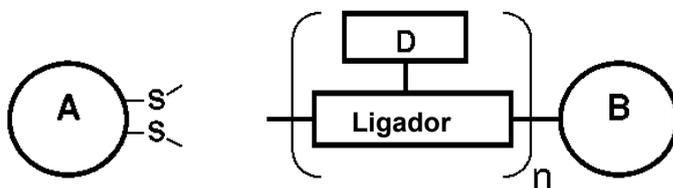
En algunos ejemplos,  $L^1$  puede incluir un puente de 4 carbonos. En algunos ejemplos,  $L^1$  puede incluir un puente de 4 carbonos a través de un anillo aromático condensado. En algunos ejemplos,  $L^1$  puede incluir un espaciador y un componente que incluye un puente de 4 carbonos a través de un anillo aromático condensado. En algunos ejemplos,  $L^1$  puede incluir, pero sin limitación,

15



y similares.

- 20 En algunos ejemplos, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de Fórmula Ia:



(Ia)

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,

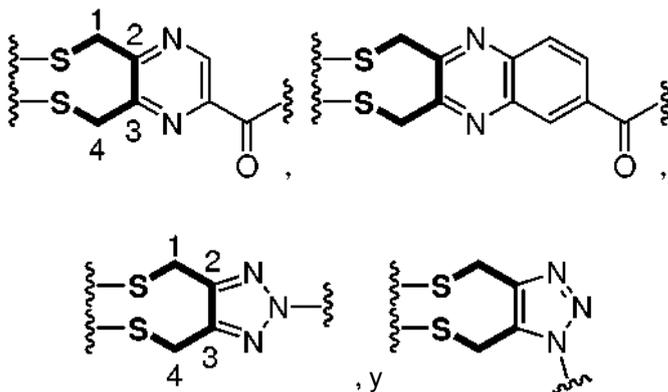
en la que la porción unida a S de A comprende un residuo de L-alanina modificado, en donde



puede conectarse a un azufre de un enlace disulfuro reducido a través de un puente que contiene de 2 a 5 átomos. Por ejemplo, la estructura indicada por



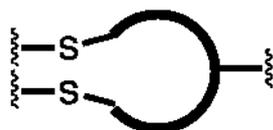
puede incluir un fragmento seleccionado del grupo que consiste en:



5

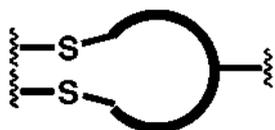
En algunas realizaciones, la porción unida a S (unida a azufre) de A comprende un residuo de L-alanina modificado. En algunos ejemplos, la porción unida a S (unida a azufre) de A comprende un residuo de L-alanina modificado que está conectado al azufre de L<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, la porción unida a S (unida a azufre) de A comprende un resto de L-alanina modificado en el que el componente de L-alanina modificado de A es de un resto de L-cisteína de un péptido antes de la conjugación. En algunos ejemplos, el azufre de L<sup>1</sup> proviene de una L-cisteína de un péptido antes de la conjugación. En algunos ejemplos, A y L<sup>1</sup> comprenden un tioéter. En algunos ejemplos, el compuesto que tiene la estructura de Fórmula la puede formarse a partir de un péptido que incluye al menos una L-cisteína donde la L-Cisteína proporciona una L-alanina modificada de A y un azufre de

10

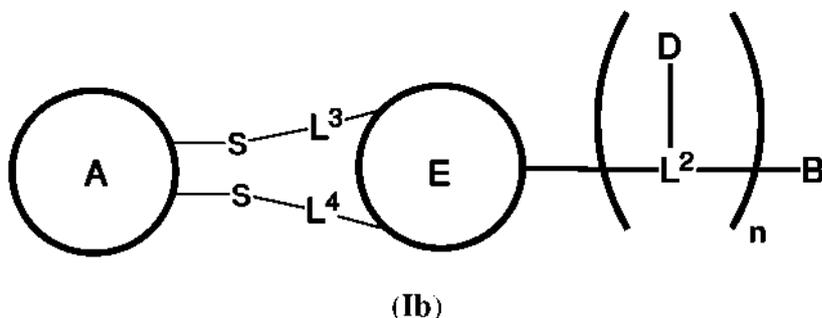


En algunos ejemplos, el compuesto que tiene la estructura de Fórmula la puede formarse a partir de un péptido que incluye al menos dos L-cisteínas, donde las dos L-cisteínas proporcionan dos L-alaninas modificadas de A y dos azufres de

15

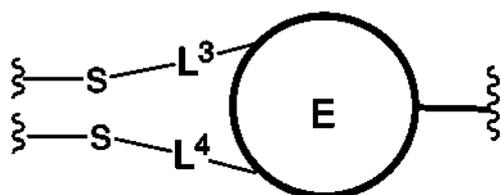


En algunos ejemplos, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de Fórmula Ib:



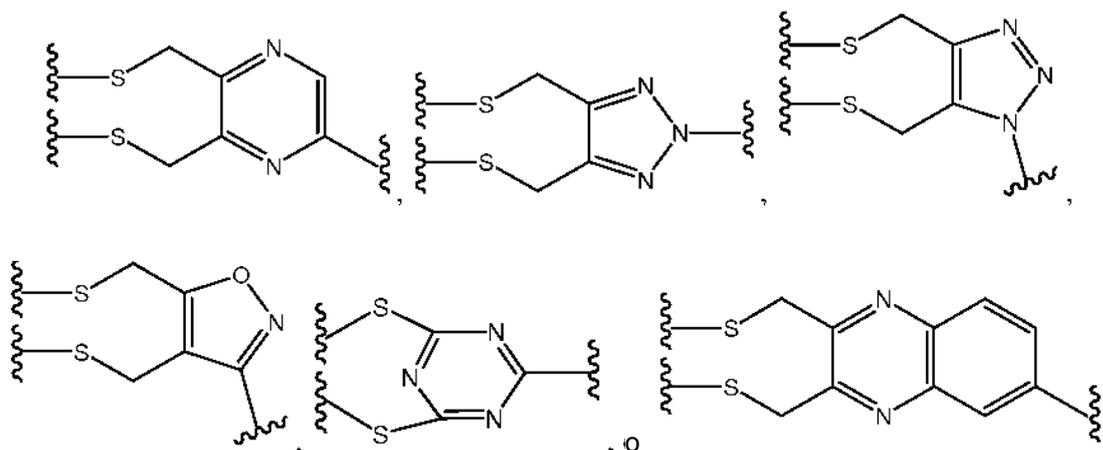
5 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en donde el componente A puede ser un resto de selección del objetivo, el componente E puede ser un heteroarilo o heterociclilo, L<sup>3</sup> puede ser un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, o L<sup>3</sup> puede ser nulo, cuando L<sup>3</sup> es nulo, el azufre se conecta directamente al componente E; y L<sup>4</sup> puede ser un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, o L<sup>4</sup> puede ser nulo, cuando L<sup>4</sup> es nulo, el azufre está directamente conectado al componente E. En algunos ejemplos, L<sup>3</sup> puede ser -(CH<sub>2</sub>)-; y L<sup>4</sup> puede ser -(CH<sub>2</sub>)-. En algunos ejemplos, L<sup>3</sup> puede ser nulo; y L<sup>4</sup> puede ser nulo.

En algunos ejemplos de la estructura de Fórmula Ib, el componente estructural

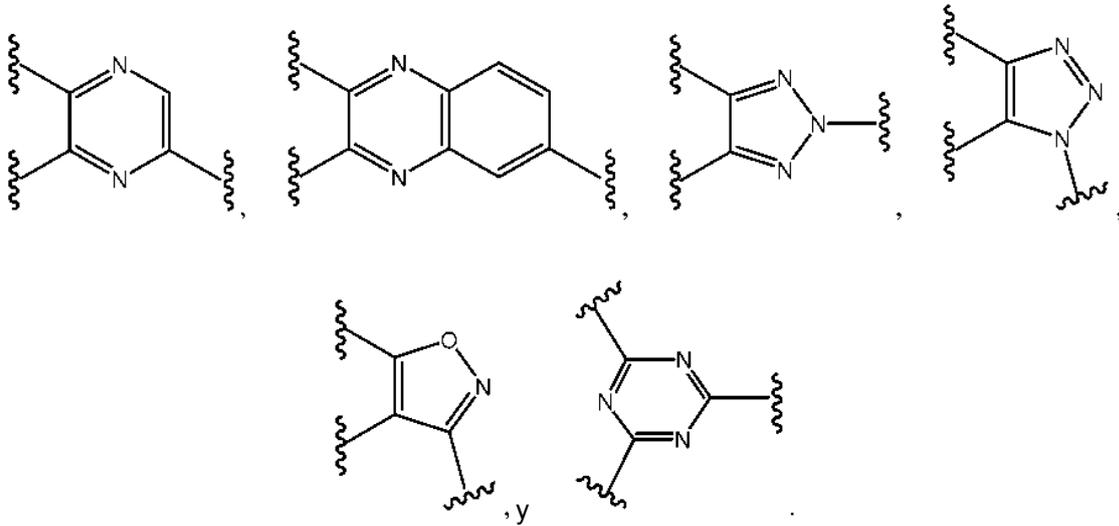


10

puede ser:

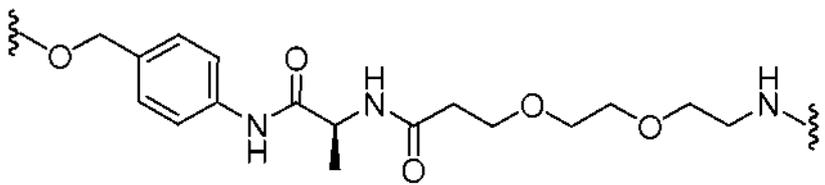
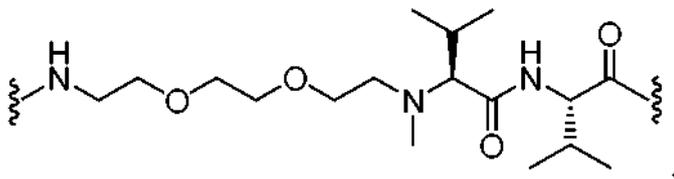
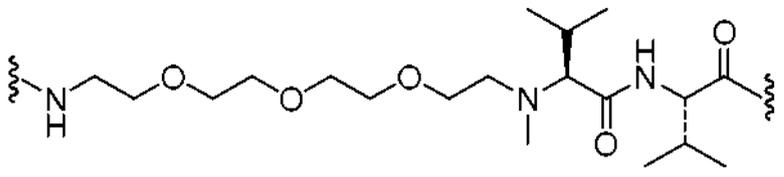


En algunos ejemplos, el componente E incluye un fragmento seleccionado del grupo que consiste en:

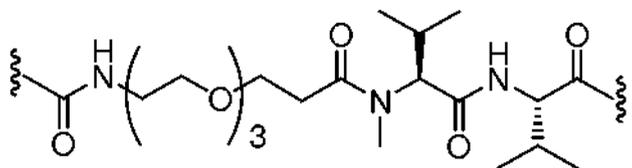
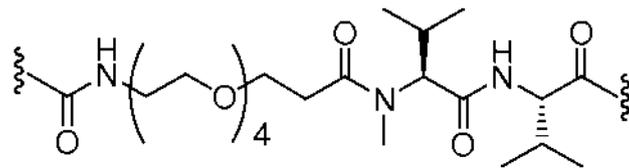
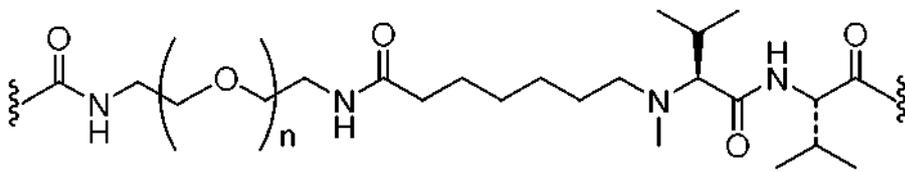
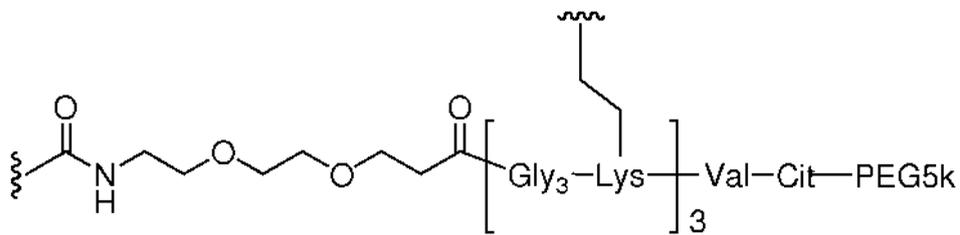
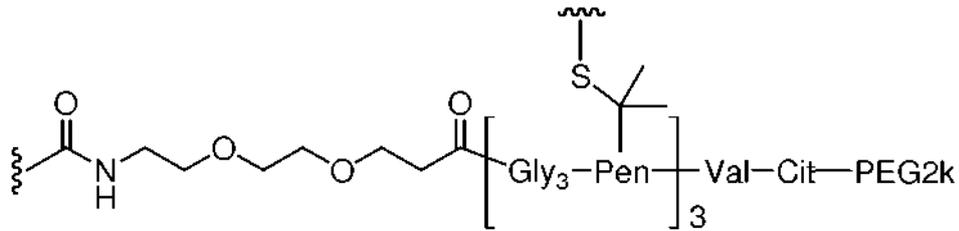
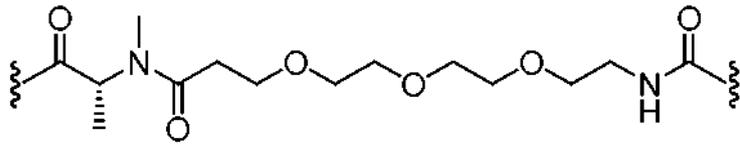


En algunos ejemplos, el agente activo puede seleccionarse del grupo que consiste en moléculas de unión a tubulina, agentes alquilantes de ADN, intercaladores de ADN, inhibidores de enzimas, moduladores inmunitarios, péptidos y nucleótidos.

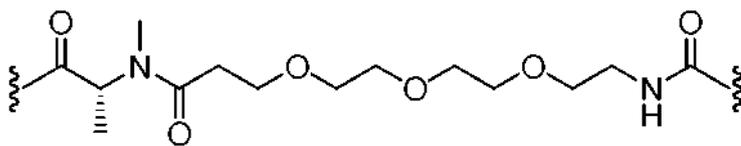
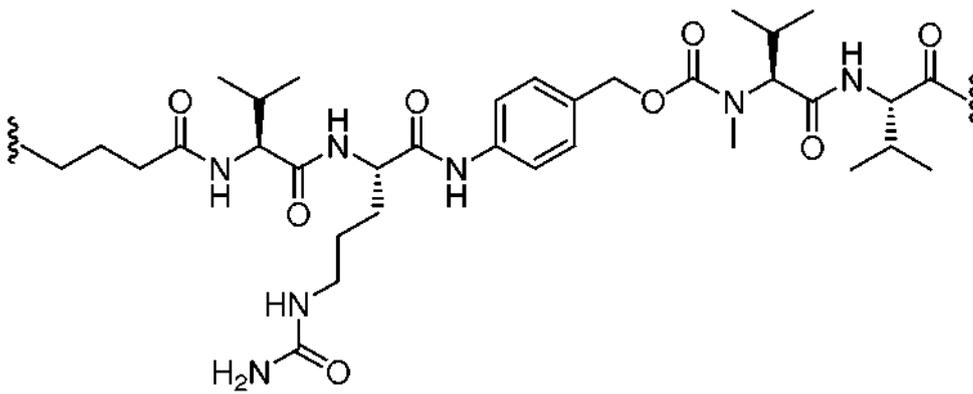
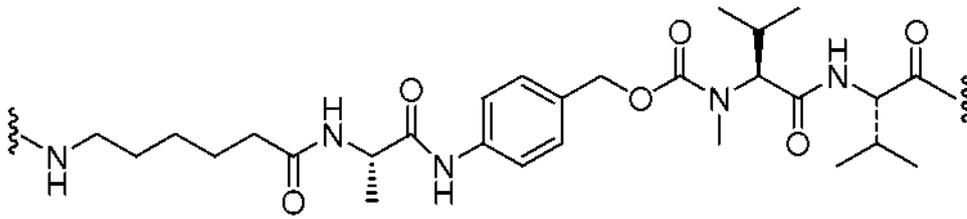
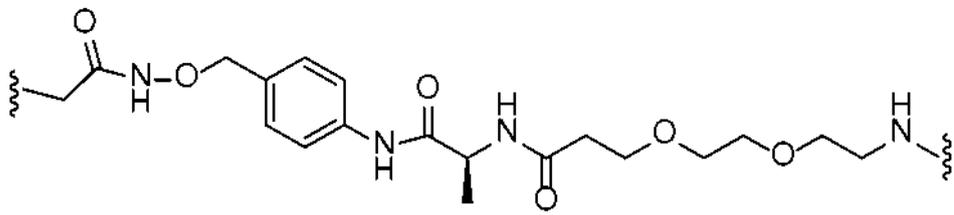
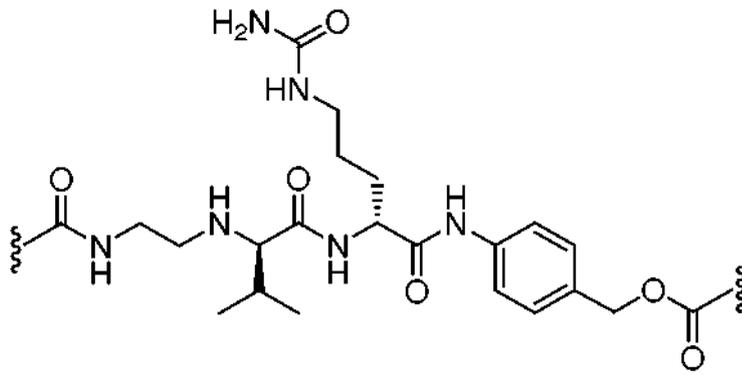
5 En algunas realizaciones, al menos un  $L^2$  incluye  $-(CH_2)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, al menos un  $L^2$  incluye  $-(CH_2CH_2O)_n-$  donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas realizaciones, al menos un  $L^2$  incluye Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB o PAB. En algunas realizaciones, al menos un  $L^2$  incluye un péptido, un oligosacárido,  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_n-$ , Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB, o PAB. En algunas realizaciones, al menos un  $L^2$  puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en:

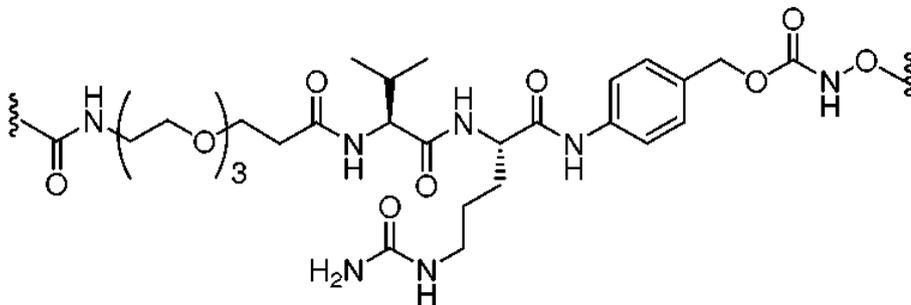
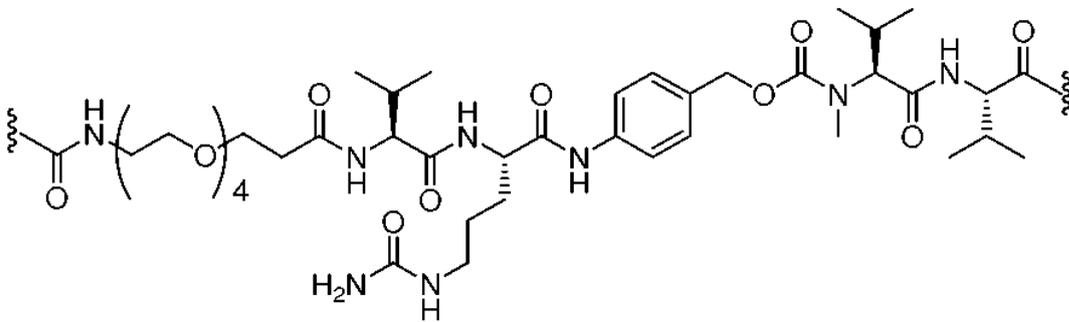
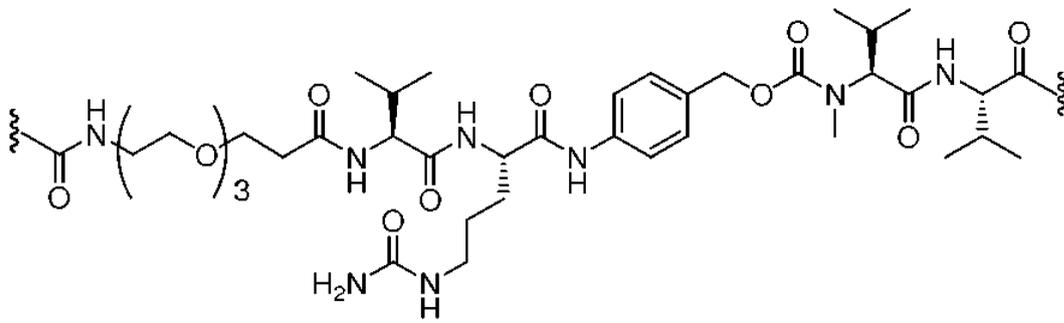
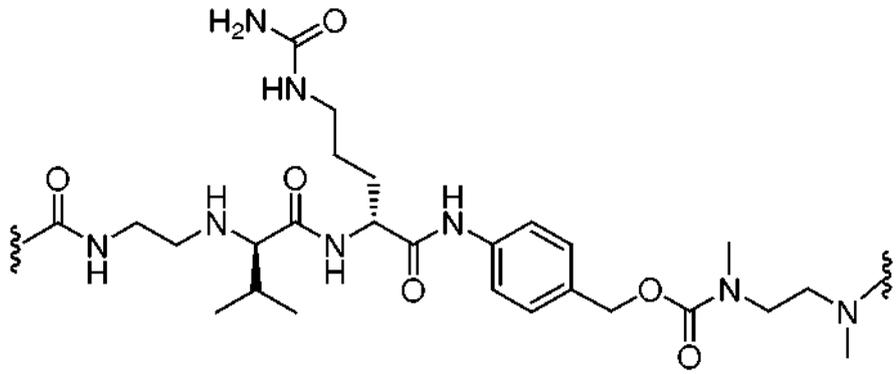


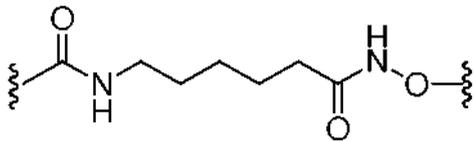
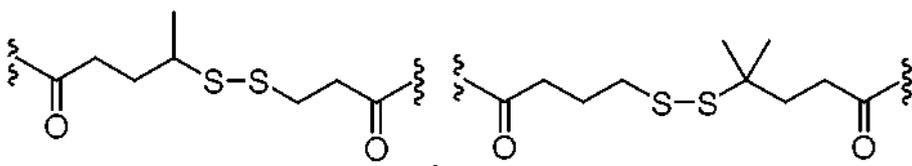
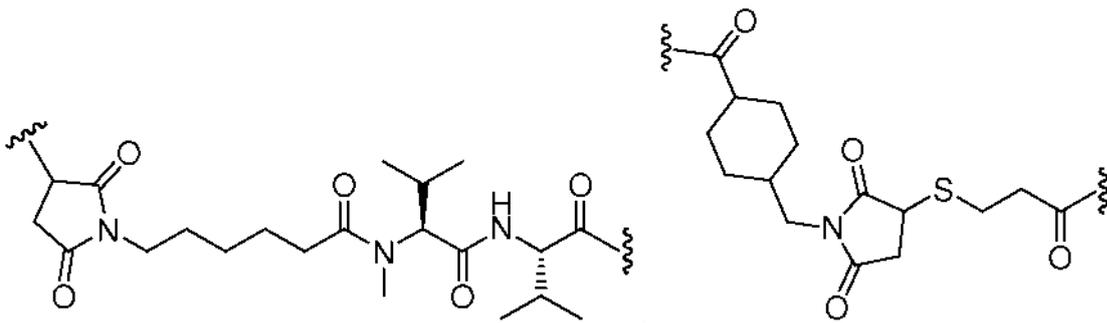
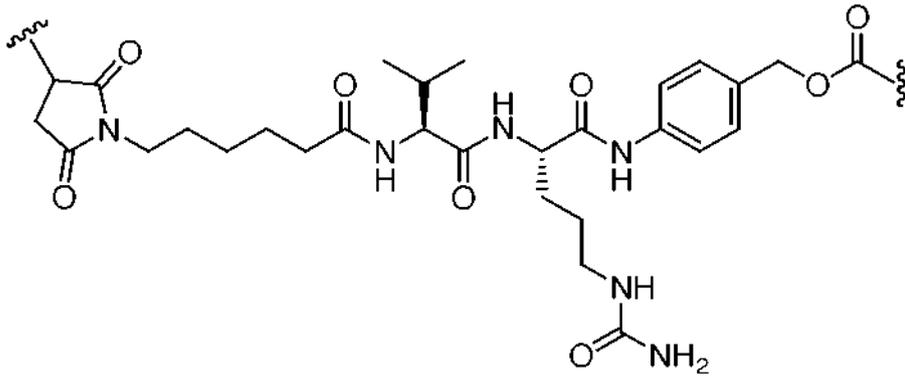
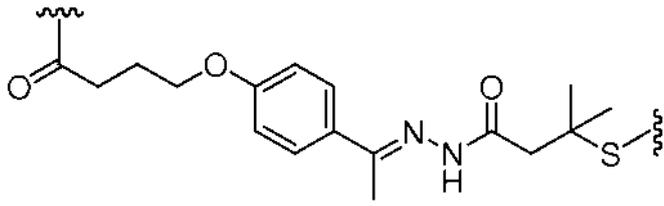
15

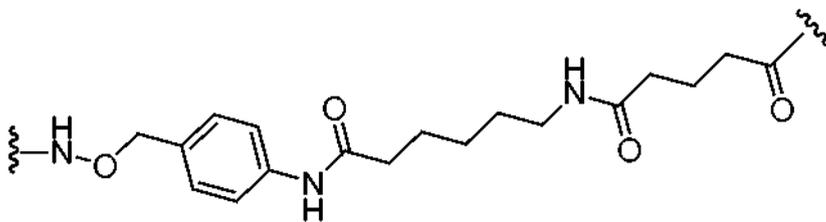
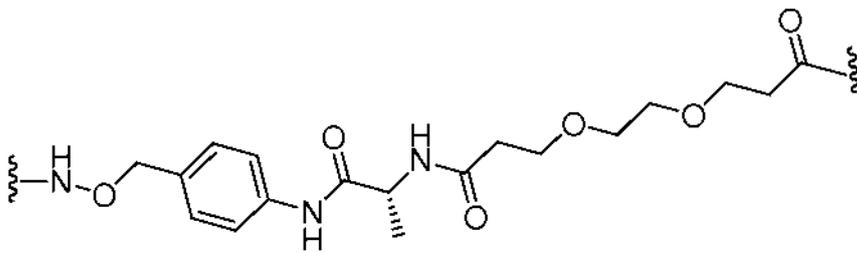
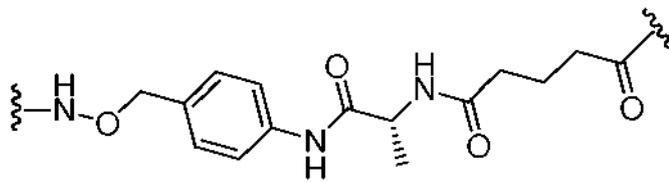
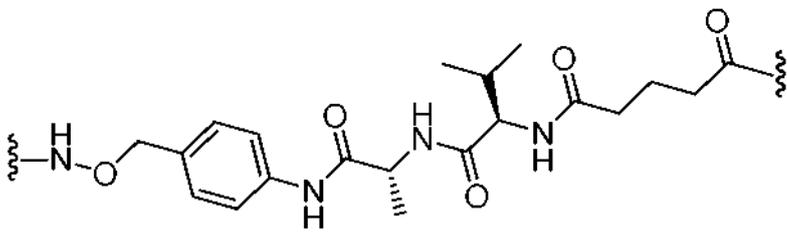
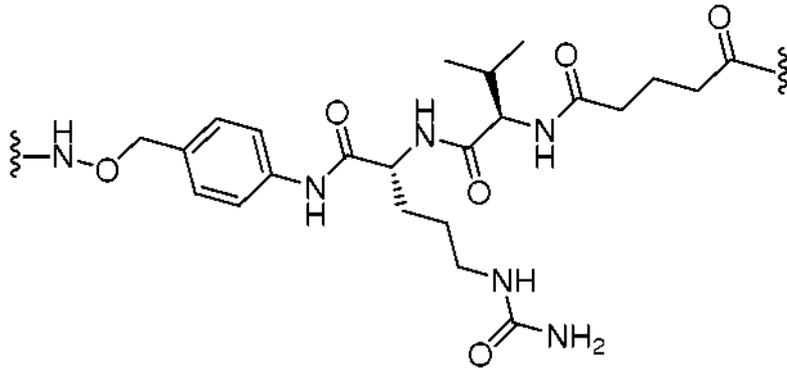


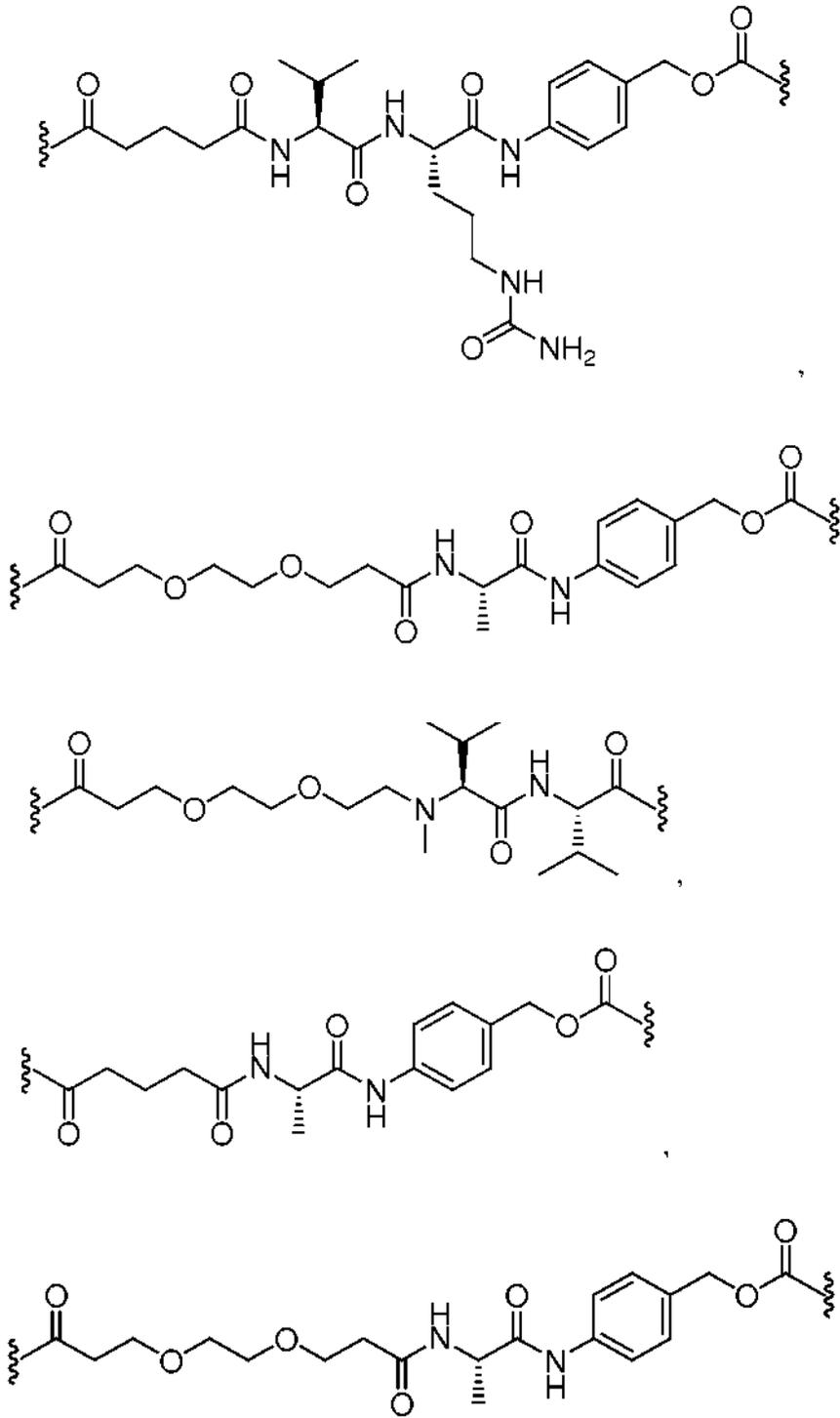


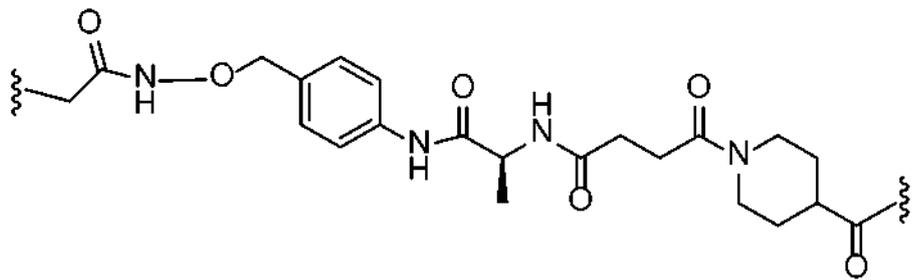
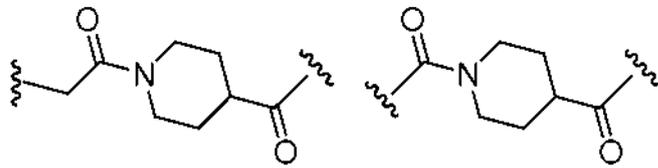
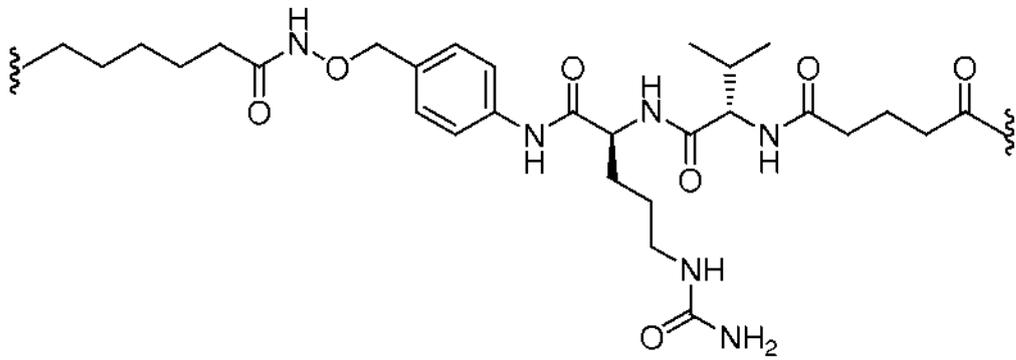
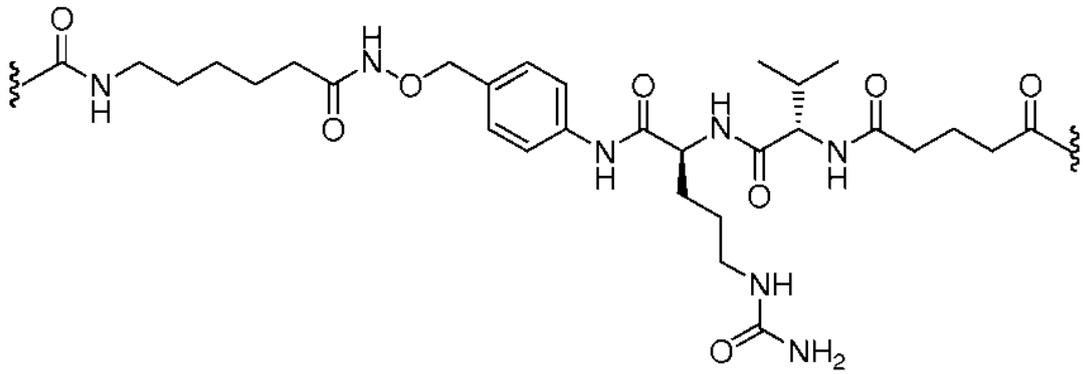




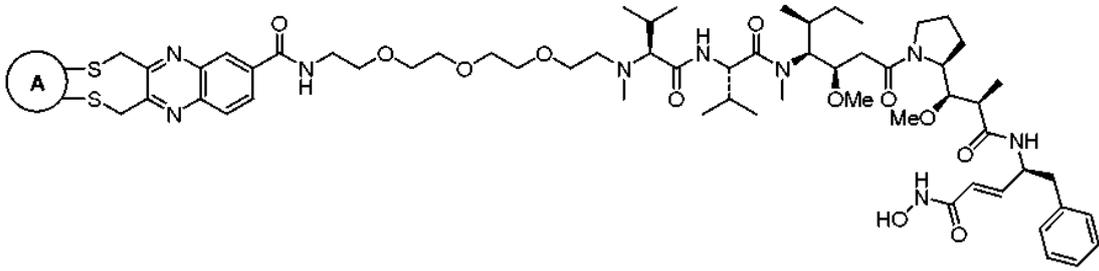




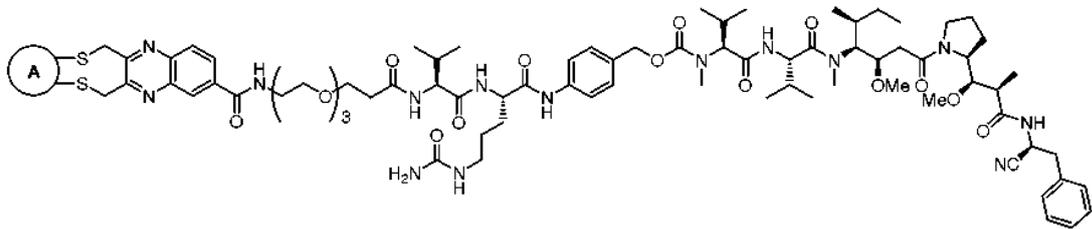




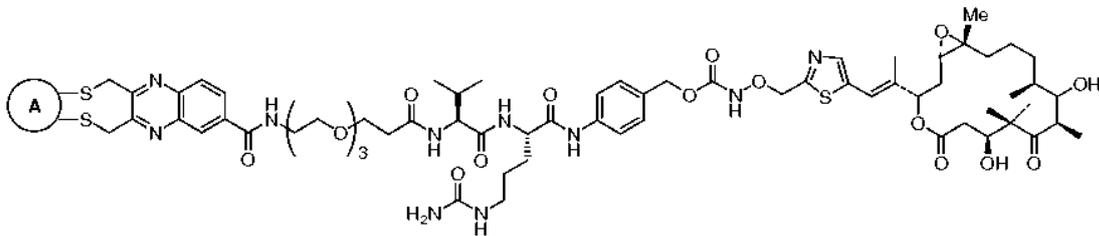
En algunas realizaciones, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de



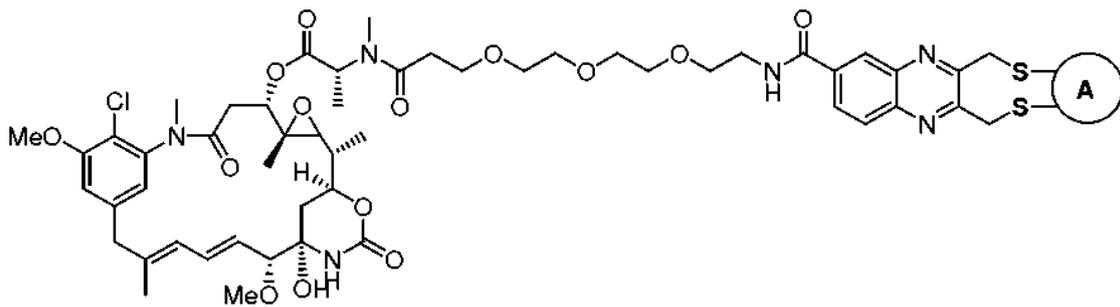
En algunas realizaciones, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de



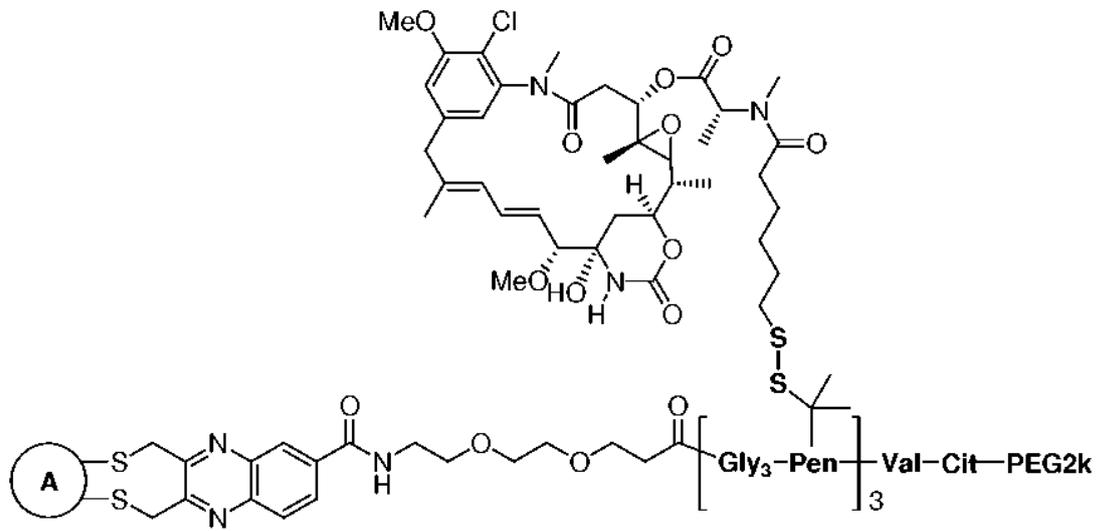
5 En algunas realizaciones, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de



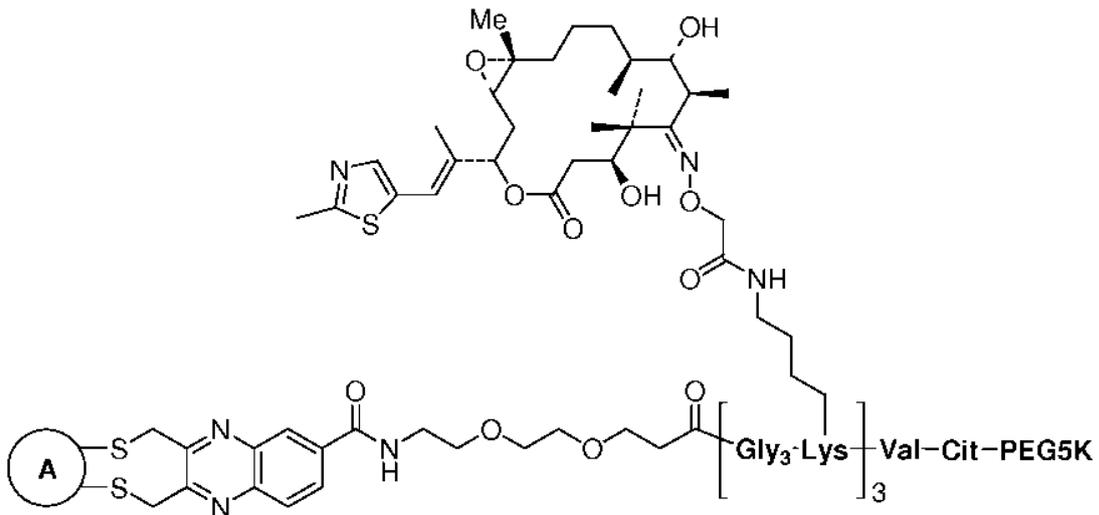
En algunas realizaciones, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de



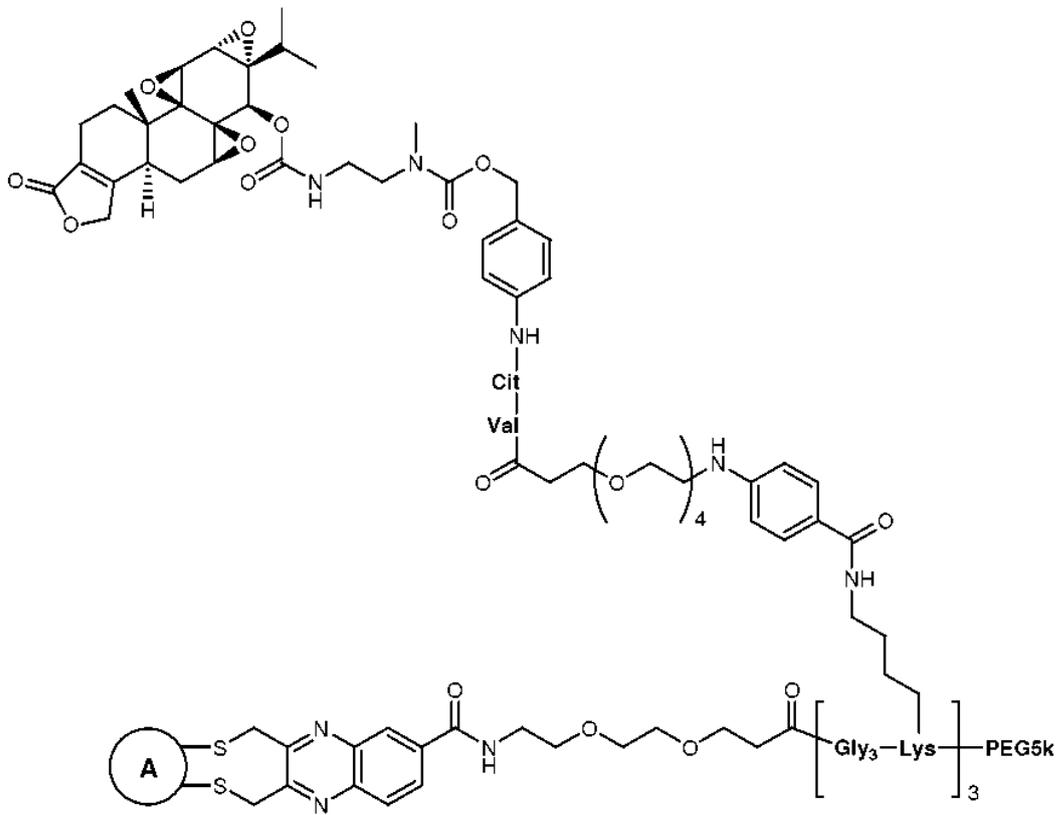
En algunas realizaciones, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de



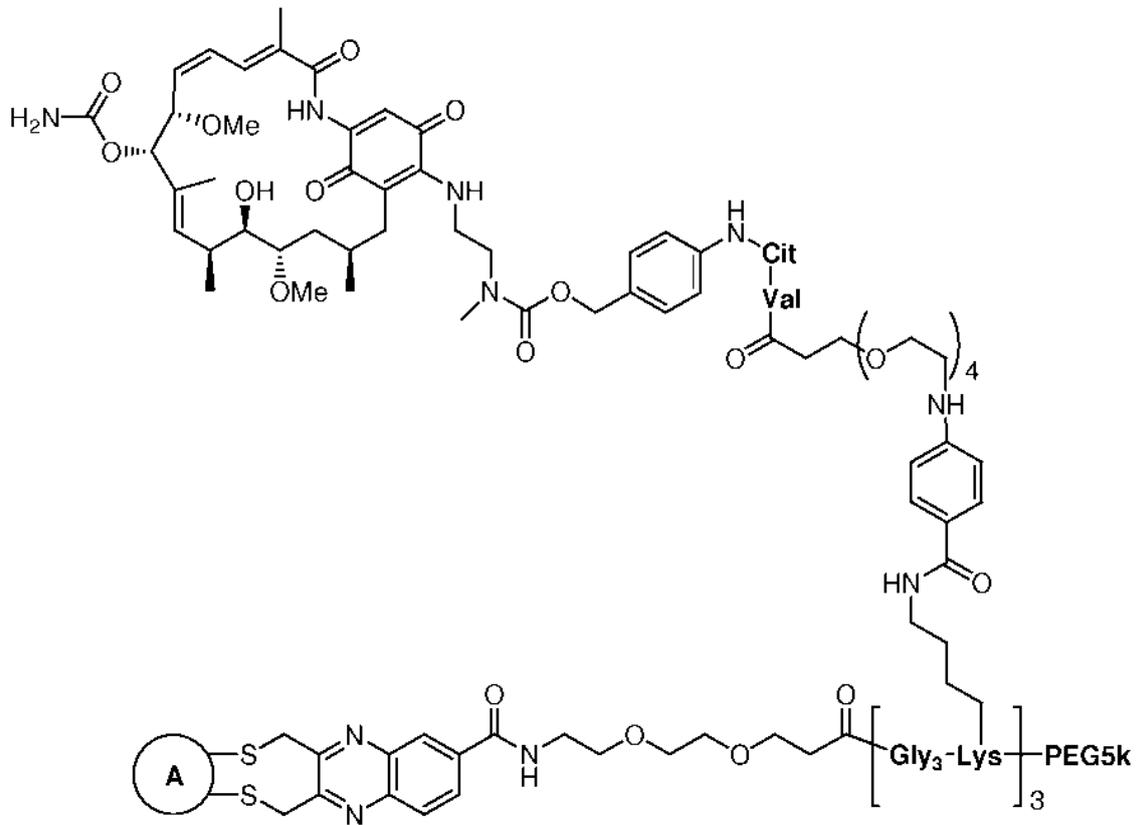
En algunas realizaciones, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de



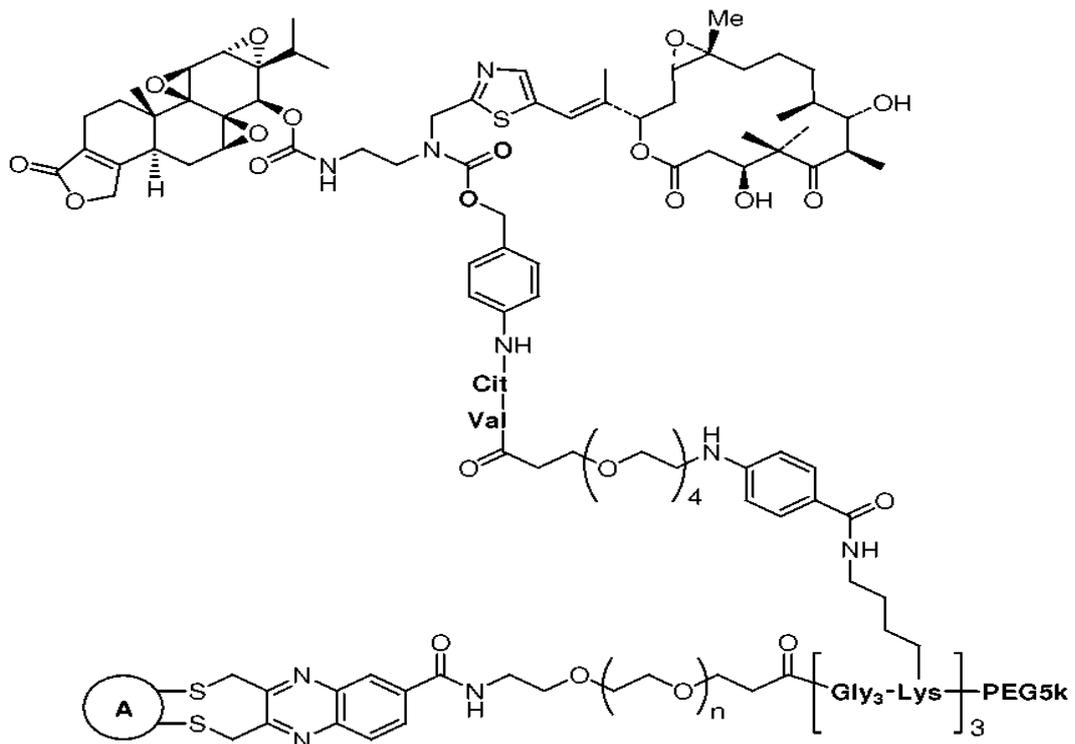
En algunas realizaciones, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de



En algunas realizaciones, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de



En algunas realizaciones, el agente conjugado que tiene la estructura de Fórmula I tiene la estructura de



5 En algunas realizaciones, los agentes conjugados pueden incluir uno o más componentes seleccionados del grupo

que consiste en un aminoácido, un residuo de aminoácido, un análogo de aminoácido y un aminoácido modificado.

Como se usa en la presente memoria, el término "resto de selección del objetivo" se refiere a una estructura que se une o se asocia con un resto biológico o fragmento del mismo.

5 En algunos ejemplos, el resto de selección del objetivo puede ser un anticuerpo. En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede ser un anticuerpo monoclonal (mAB). En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede ser un fragmento de anticuerpo, un sustituto o una variante. En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede ser un ligando proteico. En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede ser un armazón proteico. En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede ser un péptido. En algunos ejemplos, el resto de selección del objetivo puede ser ARN o ADN. En algunos ejemplos, el resto de selección del objetivo puede ser un fragmento de ARN o ADN. En algunos ejemplos, el resto de selección del objetivo puede ser un ligando de molécula pequeña.

10 En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede ser un fragmento de anticuerpo descrito en Janthur et al., "Drug Conjugates Such as Antibody Drug Conjugates (ADCs), Immunotoxins and Immunoliposomes Challenge Daily Clinical Practice," *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 16020-16045. En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede ser un fragmento de anticuerpo descrito en Trail, PA, "Antibody Drug Conjugates as Cancer Therapeutics," *Antibodies* 2013, 2, 113-129.

15 En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede ser HuM195-Ac-225, HuM195-Bi-213, Anyara (naptumomab estafenatox; ABR-217620), AS1409, Zevalin (ibritumomab tiuxetan), BII015, BT-062, Neuradiab, CDX-1307, CR011-vcMMAE, Trastuzumab-DMI (R3502), Bexxar (tositumomab), IMG242, IMG388, IMG901, <sup>131</sup>I-labetuzumab, IMMU-102 (<sup>90</sup>Y-epratuzumab), IMMU-107 (<sup>90</sup>Y-clivatuzumab tetraxetan), MDX-1203, CAT-8015, EMD 273063 (hul4.18-IL2), Tucotuzumab Celmoleukin (EMD 273066; huKS-IL2), <sup>188</sup>Re-PTI-6D2, Cotara, L19-IL2, Teleukin (F16-IL2), Tenarad (F16-<sup>131</sup>I), L19-<sup>131</sup>I, L19-TNF, PSMA-ADC, DI-Leul6-IL2, SAR3419, SGN-35, o CMC544. En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en la porción de anticuerpo de HuM195-Ac-225, HuM195-Bi-213, Anyara (naptumomab estafenatox; ABR-217620), AS 1409, Zevalin (ibritumomab tiuxetan), BII015, BT-062, Neuradiab, CDX-1307, CR011-vcMMAE, Trastuzumab-DM1 (R3502), Bexxar (tositumomab), IMG242, IMG388, IMG901, <sup>131</sup>I-labetuzumab, IMMU-102 (<sup>90</sup>Y-epratuzumab), IMMU-107 (<sup>90</sup>Y-clivatuzumab tetraxetan), MDX-1203, CAT-8015, EMD 273063 (hul4.18-IL2), Tucotuzumab celmoleukin (EMD 273066; huKS-IL2), <sup>188</sup>Re-PTI-6D2, Cotara, L19-IL2, Teleukin (F16-IL2), Tenarad (F16-<sup>131</sup>I), L19-<sup>131</sup>I, L19-TNF, PSMA-ADC, DI-Leul6-IL2, SAR3419, SGN-35, o CMC544.

20 En algunas realizaciones, el grupo de selección del objetivo puede ser Brentuximab vedotin, Trastuzumab emtansine, Inotuzumab ozogamicin, Lorvotuzumab mertansine, Glematumumab vedotin, SAR3419, Moxetumomab pasudotox, Moxetumomab pasudotox, AGS-16M8F, AGS-16M8F, BII015, BT-062, IMG242, IMG388, o IMG388.

25 En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en la porción de anticuerpo de Brentuximab vedotin, Trastuzumab emtansine, Inotuzumab ozogamicin, Lorvotuzumab mertansine, Glematumumab vedotin, SAR3419, Moxetumomab pasudotox, Moxetumomab pasudotox, AGS-16M8F, AGS-16M8F, BII015, BT-062, IMG242, IMG388, o IMG388.

30 En algunas realizaciones, el resto de selección del objetivo puede comprender, consistir en, o consistir esencialmente en Brentuximab, Inotuzumab, Gemtuzumab, Milatuzumab, Trastuzumab, Glematumumab, Lorvotuzumab, o Labestuzumab.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "péptido" se refiere a una estructura que incluye uno o más componentes, cada uno seleccionado individualmente del grupo que consiste en un aminoácido, un residuo de aminoácido, un análogo de aminoácido y un aminoácido modificado. Los componentes se unen típicamente entre sí a través de un enlace amida.

40 En algunas realizaciones, el péptido, tal como el anticuerpo, está PEGilado. La PEGilación puede proporcionar, por ejemplo, una mayor estabilidad y / o eficacia del polipéptido. Los métodos para la PEGilación conocidos en la técnica se pueden usar en los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria. Tales métodos incluyen, pero sin limitación, aquellos proporcionados en "Comparative Binding of Disulfide-Bridged PEG-Fabs" Khalili et al., *Bioconjugate Chemistry* (2012), 23(11), 2262-2277; "Site-Specific PEGylation at Histidine Tags" Cong et al., *Bioconjugate Chemistry* (2012), 23(2), 248-263; "Disulfide bridge based PEGylation of proteins" Brocchini et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* (2008), 60(1), 3-12; "Site-Specific PEGylation of Protein Disulfide Bonds Using a Three-Carbon Bridge" Balan et al., *Bioconjugate Chemistry* (2007), 18(1), 61-76; "Site-specific PEGylation of native disulfide bonds in therapeutic proteins" Shaunak et al., *Nature Chemical Biology* (2006), 2(6), 312-313; "PEG derivative conjugated proteins and peptides for use in pharmaceuticals" Godwin et al., documento WO 2010/100430.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido" incluye aminoácidos naturales, una molécula que tiene un nitrógeno disponible para formar un enlace amida y un ácido carboxílico, una molécula de fórmula general NH<sub>2</sub>-CHR-COOH o el residuo dentro de un péptido que alberga el aminoácido original, donde "R" es una de varias cadenas laterales diferentes. "R" puede ser un sustituyente que se encuentra en los aminoácidos naturales. "R" también puede ser un sustituyente que se refiere a uno que no es de los aminoácidos naturales.

Como se usa en la presente memoria, el término "residuo de aminoácido" se refiere a la porción del aminoácido que permanece después de perder una molécula de agua cuando se une a otro aminoácido.

Como se usa en la presente memoria, el término "análogo de aminoácido" se refiere a un derivado estructural de un compuesto original de aminoácido que a menudo difiere de él por un único elemento.

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido modificado" se refiere a un aminoácido que alberga un sustituyente "R" que no corresponde a uno de los veinte aminoácidos codificados genéticamente.

Como se usa en la presente memoria, las abreviaturas de los aminoácidos enantioméricos L codificados genéticamente son convencionales y son las siguientes: Los D-aminoácidos se designan en minúsculas, por ejemplo, D-prolina = p, etc.

10 TABLA 1

Aminoácidos	Símbolo de una letra	Abreviatura común
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Ácido glutámico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

- 15 Ciertos residuos de aminoácidos en el conjugado de agente activo pueden reemplazarse con otros residuos de aminoácidos sin afectar significativamente de manera perjudicial y, en muchos casos, incluso aumentar, la actividad de los péptidos. Por lo tanto, también se contemplan en las realizaciones preferidas las formas alteradas o mutadas del conjugado de agente activo en las que al menos un residuo de aminoácido definido de la estructura está sustituido con otro residuo de aminoácido o derivado y / o análogo del mismo. Se reconocerá que en las realizaciones preferidas, las sustituciones de aminoácidos son conservativas, es decir, el residuo de aminoácido de sustitución tiene propiedades físicas y químicas que son similares al residuo de aminoácido que se reemplaza.

- 20 Con el fin de determinar las sustituciones de aminoácidos conservativas, los aminoácidos pueden clasificarse convenientemente en dos categorías principales: hidrófilos e hidrófobos, dependiendo principalmente de las características físico-químicas de la cadena lateral de los aminoácidos. Estas dos categorías principales se pueden clasificar en subcategorías que definen más claramente las características de las cadenas laterales de los aminoácidos. Por ejemplo, la clase de aminoácidos hidrófilos se puede subdividir en aminoácidos ácidos, básicos y polares. La clase de aminoácidos hidrófobos se puede subdividir en aminoácidos apolares y aromáticos. Las
- 25 definiciones de las diversas categorías de aminoácidos son las siguientes:

El término "aminoácido hidrófilo" se refiere a un aminoácido que presenta una hidrofobicidad menor de cero de acuerdo con la escala de hidrofobicidad consenso normalizada de Eisenberg et al., 1984, J. Mol. Biol. 179: 125-142. Los aminoácidos hidrófilos codificados genéticamente incluyen Thr (T), Ser (S), His (H), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), Asp (D), Lys (K) y Arg (R).

- 30 El término "aminoácido hidrófobo" se refiere a un aminoácido que presenta una hidrofobicidad mayor de cero de acuerdo con la escala de hidrofobicidad consenso normalizada de Eisenberg, 1984, J. Mol. Biol. 179: 1.25-142. Los aminoácidos hidrófobos codificados genéticamente incluyen Pro (P), Ile (I), Phe (F), Val (V), Leu (L), Trp (W), Met (M),

Ala (A), Gly (G) y Tyr (Y).

El término "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de la cadena lateral menor de 7. Los aminoácidos ácidos típicamente tienen cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ion de hidrógeno. Los aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen Glu (E) y Asp (D).

- 5 El término "aminoácido básico" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de la cadena lateral mayor de 7. Los aminoácidos básicos típicamente tienen cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación con el ion hidronio. Los aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen His (H), Arg (R) y Lys (K).

10 El término "aminoácido polar" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene al menos un enlace en el que el par de electrones compartido por dos átomos se mantiene más cerca de uno de los átomos. Los aminoácidos polares codificados genéticamente incluyen Asn (N), Gln (Q) Ser (S) y Thr (T).

15 El término "aminoácido apolar" se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico y que tiene enlaces en los que el par de electrones compartido en común por dos átomos generalmente se mantiene igualmente en cada uno de los dos átomos (es decir, la cadena lateral no es polar). Los aminoácidos apolares codificados genéticamente incluyen Leu (L), Val (V), Ile (I), Met (M), Gly (G) y Ala (A).

20 El término "aminoácido aromático" se refiere a un aminoácido hidrófobo con una cadena lateral que tiene al menos un anillo aromático o heteroaromático. En algunas realizaciones, el anillo aromático o heteroaromático puede contener uno o más sustituyentes tales como -OH, -SH, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -NO<sub>2</sub>, -NO, -NH<sub>2</sub>, -NHR, -NRR, -C(O)R, -C(O)OH, -C(O)OR, -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR, -C(O)NRR y similares, donde cada R es independientemente alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido, alqueno (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alqueno (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido, alquino (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquino (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) sustituido, arilo (C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>), arilo (C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>) sustituido, alcarilo (C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>), alcarilo (C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>) sustituido, heteroarilo de 5 a 20 miembros, heteroarilo de 5 a 20 miembros sustituido, alc-heteroarilo de 6 a 26 miembros o alc-heteroarilo de 6 a 26 miembros sustituido. Los aminoácidos aromáticos codificados genéticamente incluyen Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W).

25 El término "aminoácido alifático" se refiere a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral de hidrocarburo alifático. Los aminoácidos alifáticos codificados genéticamente incluyen Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I).

30 El residuo de aminoácido Cys (C) es inusual porque puede formar puentes disulfuro con otros residuos de Cys (C) u otros aminoácidos que contienen sulfanilo. La capacidad de los residuos de Cys (C) (y otros aminoácidos con cadenas laterales que contienen -SH) de existir en un péptido en forma libre reducida -SH o puente disulfuro oxidado afecta si los residuos Cys (C) contribuyen al carácter neto hidrófobo o hidrófilo de un péptido. Si bien Cys (C) presenta una hidrofobicidad de 0,29 según la escala consenso normalizada de Eisenberg (Eisenberg, 1984, anteriormente mencionado), debe entenderse que para los fines de las realizaciones preferidas, Cys (C) se clasifica como un aminoácido hidrófilo polar, sin perjuicio de las clasificaciones generales definidas anteriormente.

35 Como apreciarán los expertos en la técnica, las categorías definidas anteriormente no se excluyen mutuamente. Por lo tanto, los aminoácidos que tienen cadenas laterales que exhiben dos o más propiedades físico-químicas pueden incluirse en múltiples categorías. Por ejemplo, las cadenas laterales de aminoácidos que tienen restos aromáticos que están además sustituidos con sustituyentes polares, como Tyr (Y), pueden exhibir tanto propiedades hidrófobas aromáticas como propiedades polares o hidrófilas, y por lo tanto pueden incluirse en las categorías aromáticas y polares. La categorización apropiada de cualquier aminoácido será evidente para los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

40 Aunque las categorías definidas anteriormente se han ejemplificado en términos de los aminoácidos codificados genéticamente, las sustituciones de aminoácidos no tienen por qué estar restringidas a los aminoácidos codificados genéticamente, y preferiblemente en ciertas realizaciones no están restringidas a ellos. En algunas realizaciones, el conjugado de agente activo puede contener aminoácidos no codificados genéticamente. Por lo tanto, además de los aminoácidos codificados genéticamente que se dan de manera natural, los residuos de aminoácidos del conjugado de agente activo se pueden sustituir con aminoácidos no codificados que se dan de manera natural y aminoácidos sintéticos.

50 Ciertos aminoácidos hallados comúnmente que proporcionan sustituciones útiles para los conjugados de agente activo incluyen, pero sin limitación, β-alanina (β-Ala) y otros omega-aminoácidos como el ácido 3-aminopropiónico, ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ácido 4-aminobutírico, etc; ácido α-aminoisobutírico (Aib); ácido ε-aminohexanoico (Aha); ácido δ-aminovalérico (Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); naftilalanina (Nal); 4-fenilfenilalanina, 4-clorofenilalanina (Phe (4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe (2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe (3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe (4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); β-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (hArg); N-acetil lisina (AcLys); Ácido 2,4-diaminobutírico (Dbu); Ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); p-aminofenilalanina (Phe (pNH<sub>2</sub>)); N-metil valina (MeVal); homocisteína (hCys), homofenilalanina (hPhe) y homoserina (hSer); hidroxiprolina (Hyp), homoprolina (hPro), aminoácidos N-metilados y peptoides (glicinas N-sustituidas).

Otros residuos de aminoácidos que no se mencionan específicamente en la presente memoria pueden clasificarse fácilmente en función de sus propiedades físicas y químicas observadas a la luz de las definiciones proporcionadas en la presente memoria.

- 5 Las clasificaciones de los aminoácidos codificados genéticamente y los no codificados comunes de acuerdo con las categorías definidas anteriormente se resumen en la Tabla 2, a continuación. Debe entenderse que la Tabla 2 es solo para fines ilustrativos y no pretende ser una lista exhaustiva de residuos de aminoácidos y derivados que pueden usarse para sustituir el conjugado de agente activo descrito en la presente memoria.

TABLA 2. CLASIFICACIONES DE LOS AMINOÁCIDOS HALLADOS HABITUALMENTE

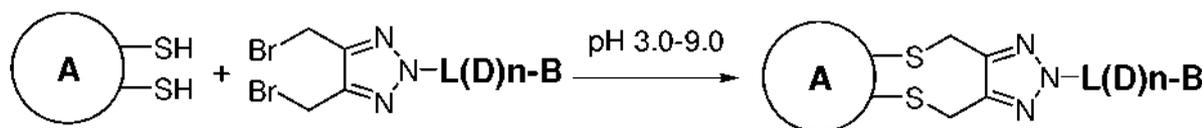
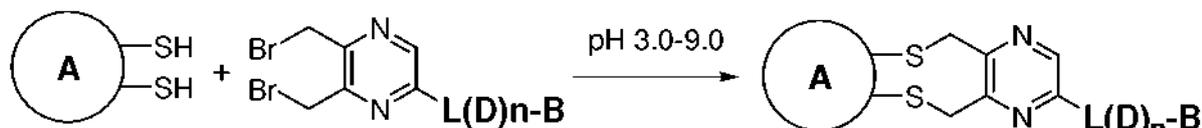
Clasificación	Genéticamente Codificado	No codificado genéticamente
<u>Hidrófobo</u>		
Aromático	F, Y, W	Phg, Nal, Thi, Tic, Phe (4-Cl), Phe (2-F), Phe (3-F), Phe (4-F), hPhe
Apolar	L, V, I, M, G, A, P	t-BuA, t-BuG, Melle, Nle, MeVal, Cha, McGly, Aib
Alifático	A, V, L, I	b-Ala, Dpr, Aib, Aha, MeGly, t-BuA, t-BuG, Melle, Cha, Nle, MeVal
<u>Hidrófilo</u>		
Ácido	D, E	
Básico	H, K, R	Dpr, Orn, hArg, Phe (p-NH <sub>2</sub> ), Dbu, Dab
Polar	C, Q, N, S, T	Cit, AcLys, MSO, bAla, hSer
Ruptura de hélice	P, G	D-Pro y otros D-aminoácidos (en L-péptidos)

- 10 Otros residuos de aminoácidos que no se mencionan específicamente en la presente memoria pueden clasificarse fácilmente en función de sus propiedades físicas y químicas observadas a la luz de las definiciones proporcionadas en la presente memoria.

- 15 Mientras que en la mayoría de los casos, los aminoácidos del conjugado de agente activo estarán sustituidos con aminoácidos enantioméricos L, las sustituciones no se limitan a los aminoácidos enantioméricos L. En algunas realizaciones, los péptidos pueden estar compuestos ventajosamente de al menos un aminoácido enantiomérico D. Se piensa que los péptidos que contienen tales D-aminoácidos son más estables a la degradación en la cavidad oral, el intestino o el suero que los péptidos compuestos exclusivamente de L-aminoácidos.

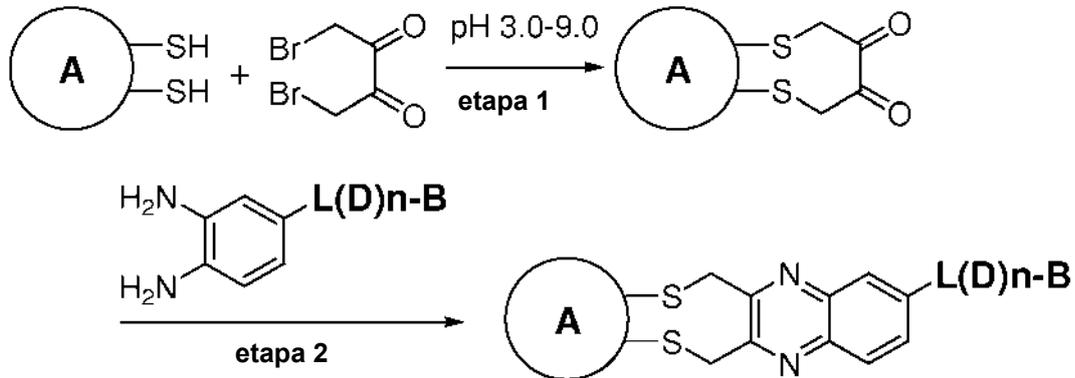
Métodos de conjugación

Conjugación de una etapa

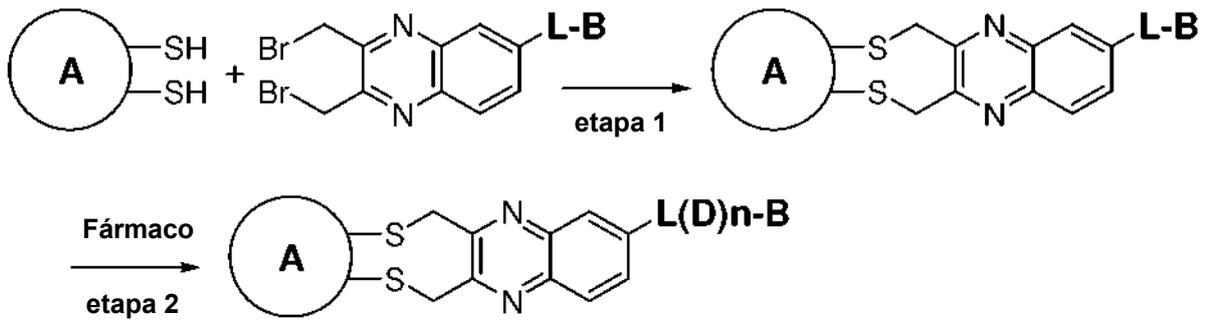


20

Conjugación de dos etapas, precarga de fármaco

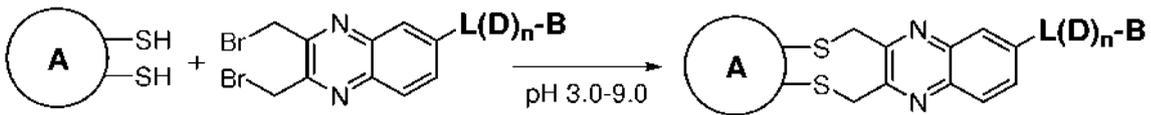


Conjugación de dos etapas, fármaco añadido en la última etapa

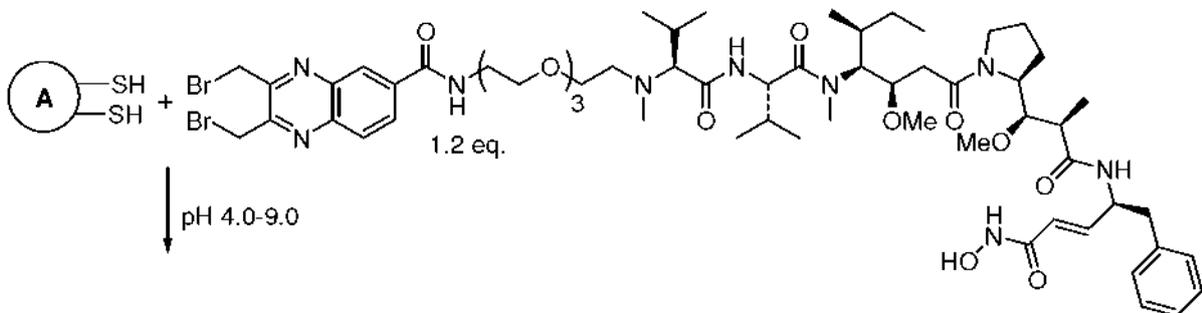


5 Ejemplos de conjugación de una etapa

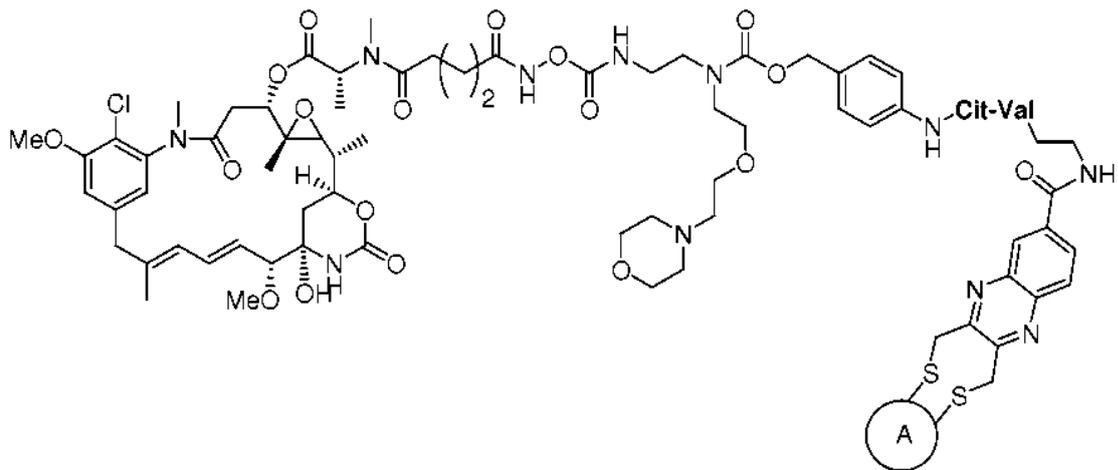
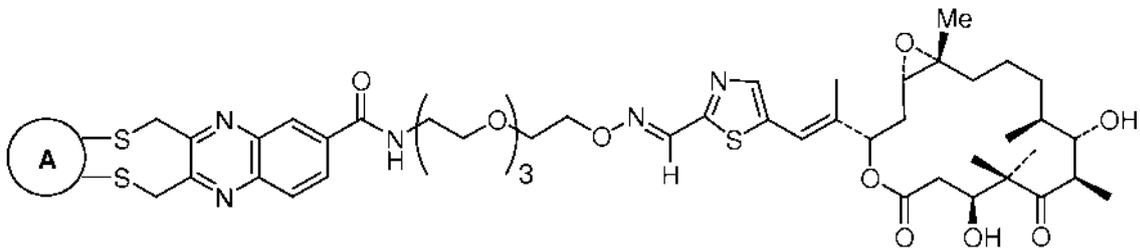
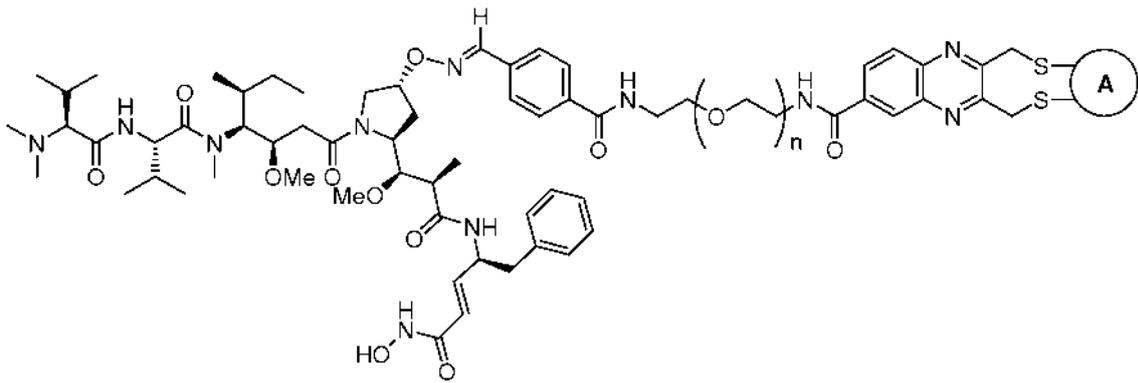
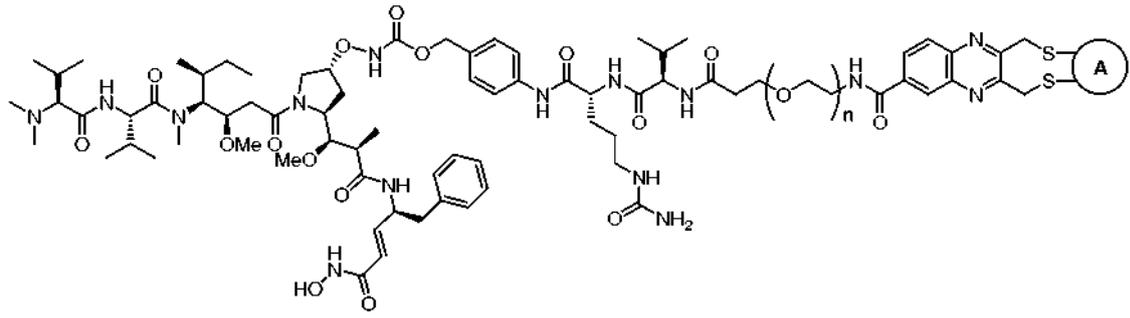
Procedimiento general I



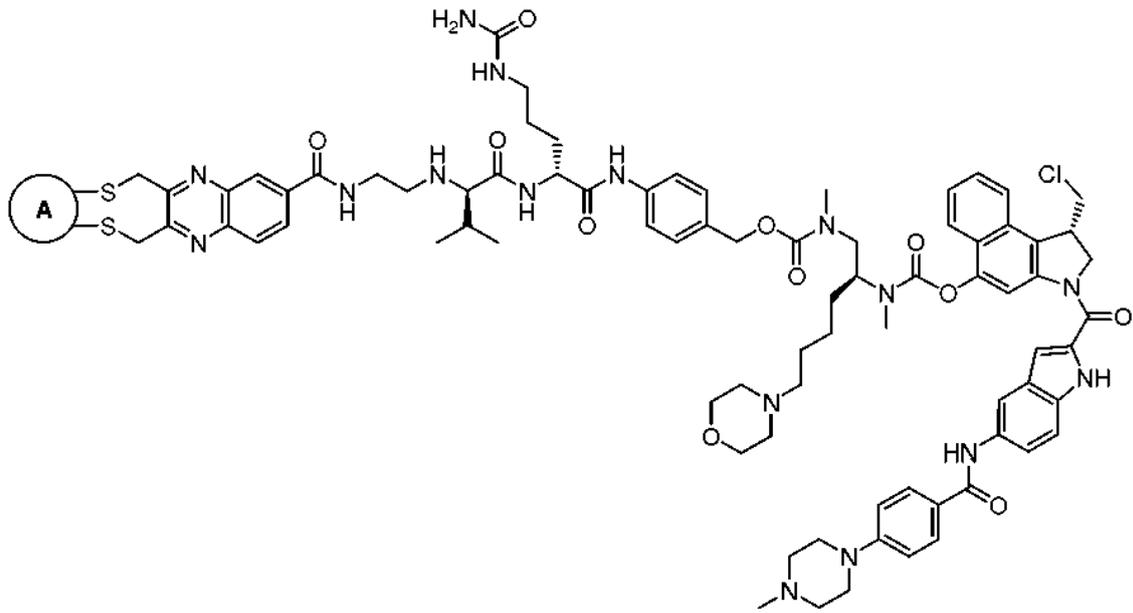
Los ejemplos incluyen, pero sin limitación:



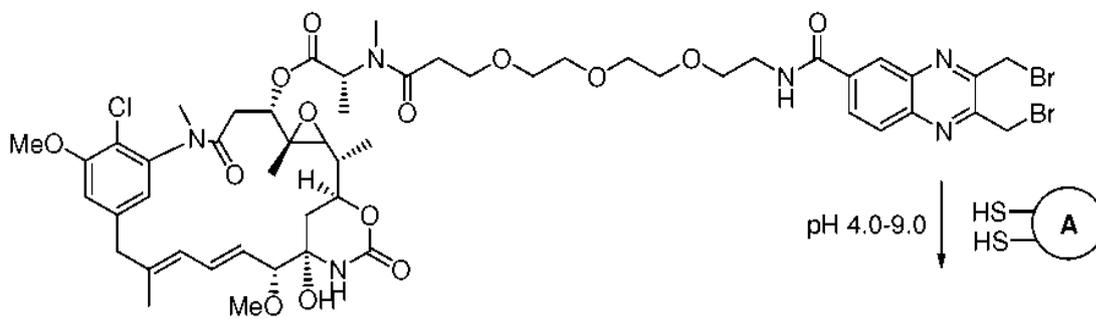
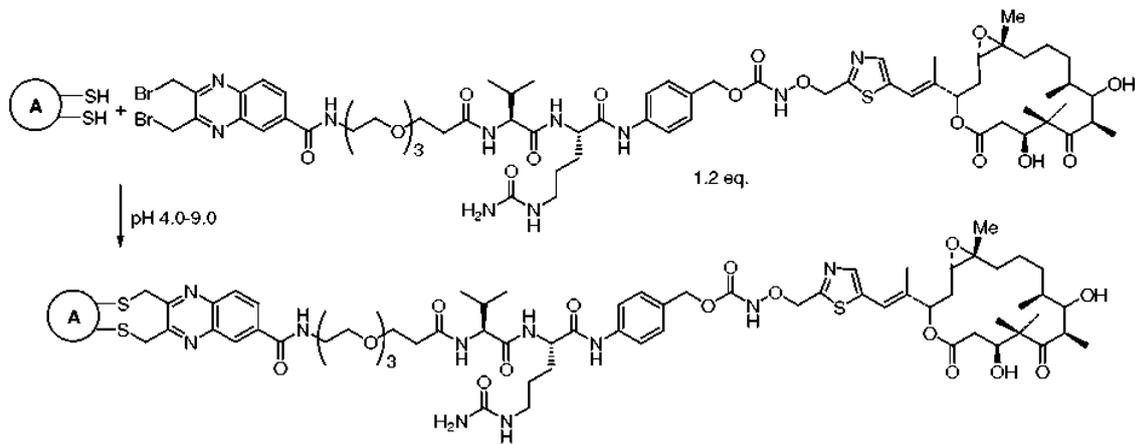


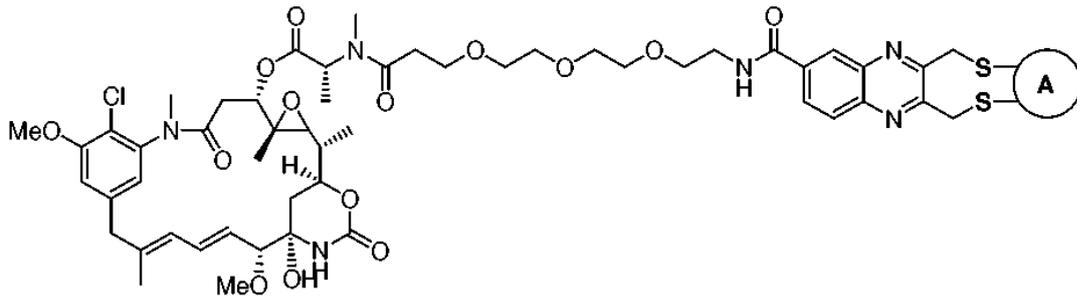






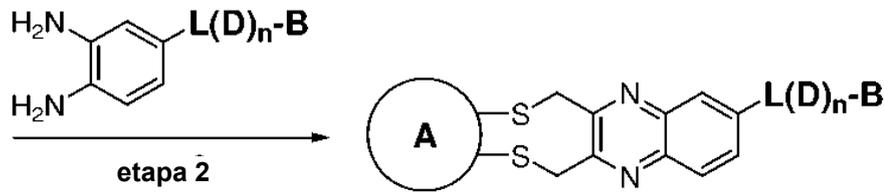
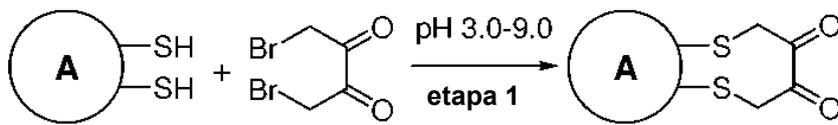
Los ejemplos incluyen lo siguiente:



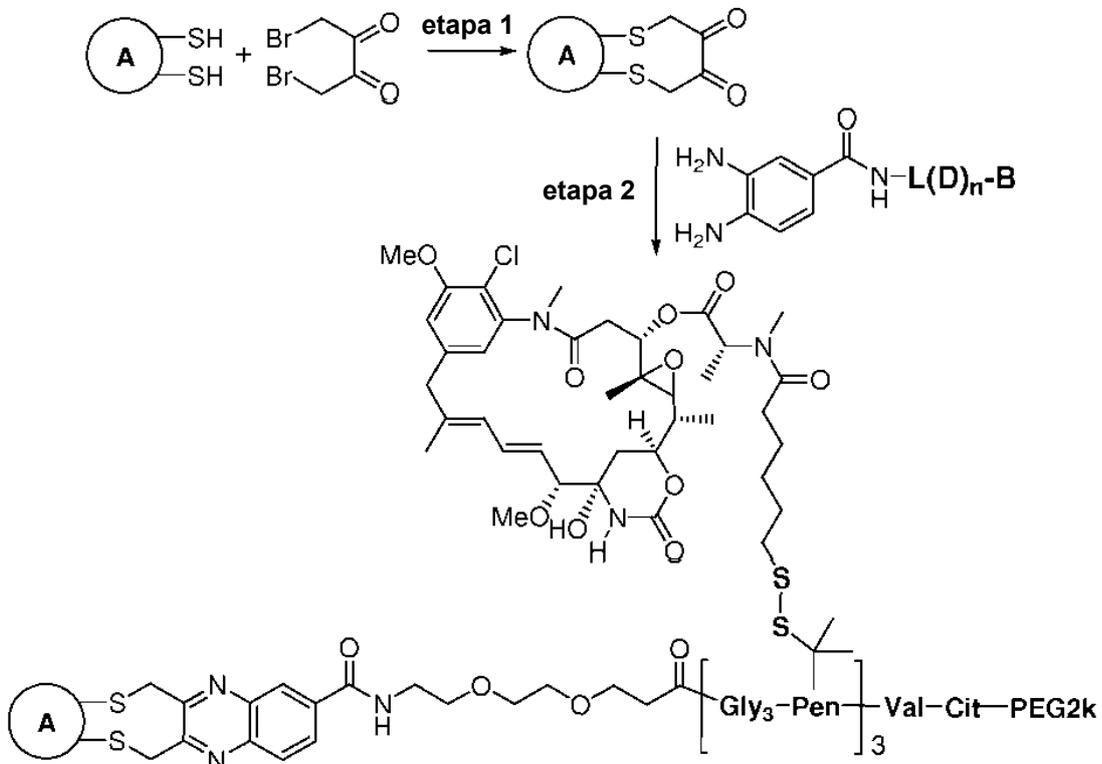


Conjugación de dos etapas, fármacos precargados

Enfoque:

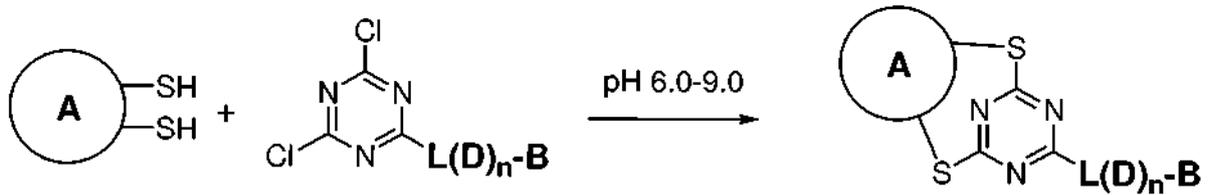


5 Los ejemplos incluyen lo siguiente:

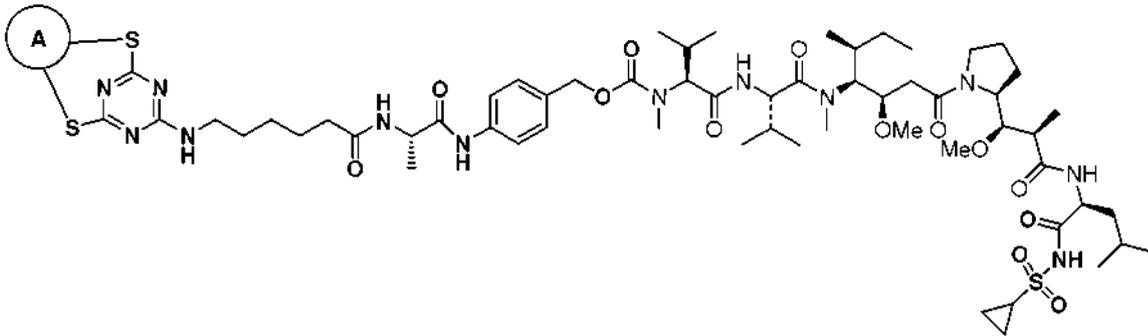


Método de conjugación

Esquema general II

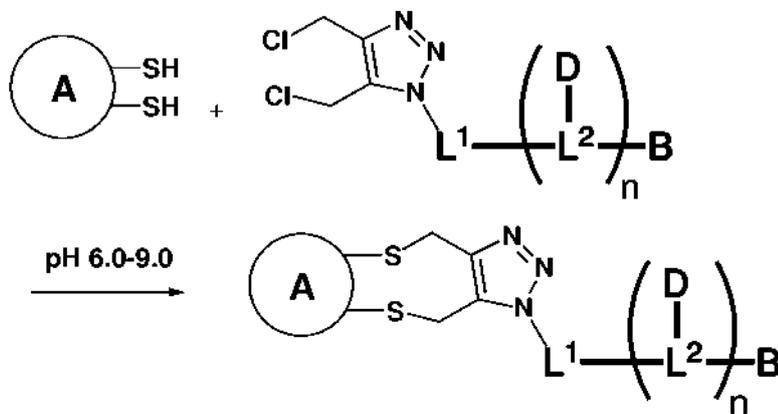


Los ejemplos incluyen lo siguiente:

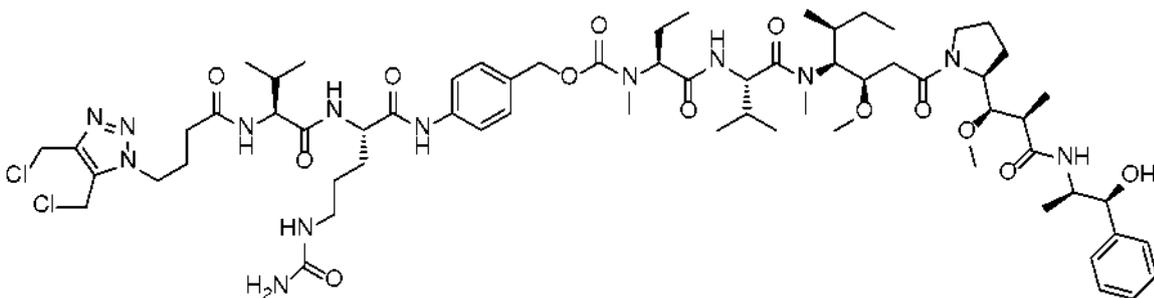


5 Método de conjugación

Esquema general III



Los ejemplos incluyen lo siguiente:



**Ejemplos**

## Conjugación anticuerpo-fármaco

- 5 Procedimiento de conjugación general: a un anticuerpo objetivo, 0,5-50 mg / ml, en un determinado tampón a pH 5,0-9,0, como PBS, se le añadieron 0,5-100 eq de agente reductor como TCEP y DTT. La reducción se realizó a 0-40 ° C durante 0,5-40 horas con agitación suave, y luego se eliminó el agente reductor mediante columna o ultrafiltración. Al anticuerpo parcialmente reducido, 0,5-50 mg / ml, en un determinado tampón a pH 5,0-9,0, como PBS, con 0-30% de cosolvente orgánico tal como DMA, se le añadieron 0,5-10 eq del fármaco activado-ligador que albergaba una funcionalidad dibromo o dicloro. La reacción se llevó a cabo a 0-40 ° C durante 0,5-40 horas con agitación suave, controlada por HIC-HPLC. El producto de ADC crudo resultante se sometió a etapas posteriores de desalinización, cambios / formulación de tampón y, opcionalmente, purificación, utilizando los procedimientos más modernos. El producto final de ADC se caracterizó mediante HIC-HPLC, SEC, RP-HPLC y opcionalmente LC-MS. El DAR promedio se calculó por absorción UV y / o espectroscopia MS.

## Procedimientos sintéticos generales

## Procedimiento general A - Formación de enlaces amida mediada por HATU

- 15 A un ácido (1,1 eq con respecto a la amina) en DMF anhidro se le añadió HATU (1 eq con respecto al ácido) y DIEA (2 eq con respecto al ácido) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 minuto. La mezcla se añadió luego a una solución de amina en DMF y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se completó la reacción (controlada por LC / MS). El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó opcionalmente por HPLC de fase inversa para dar el producto final puro.

- 20 Procedimiento general B - Formación de enlaces amida mediada por DIC / HO

A una solución agitada de ácido carboxílico (1,1 eq), amina y HOAt (1,1 eq) en DMF anhidra se le añadió DIC (1,1 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Una vez completado (controlado por LC / MS), el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó opcionalmente mediante HPLC de fase inversa para dar el producto final puro.

- 25 Procedimiento general C - Eliminación de grupos protectores sensibles al ácido (Boc, THP, t-Bu) usando HCl / dioxano

Los compuestos protectores sensibles al ácido que contenían el compuesto se disolvieron en HCl 4 N / dioxano y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La solución se concentró luego a presión reducida y el residuo se lavó dos veces con éter frío. La purificación se llevó a cabo en HPLC de fase inversa si fue necesario.

## Procedimiento general D - Eliminación del grupo Fmoc

- 30 El compuesto que contenía Fmoc se disolvió en piperidina al 2-5% en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Los disolventes se eliminaron a presión reducida. La purificación se llevó a cabo en HPLC de fase inversa si fue necesario.

## Procedimiento general E - Alquilación reductora

- 35 Se disolvió una amina en DMF y se añadió aldehído (5 eq), seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio (5 eq). Se añadió HOAc para ajustar el pH de la mezcla de reacción a 4-5. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se completó (1-4 h, controlado mediante HPLC). La purificación se llevó a cabo en HPLC de fase inversa si fue necesario.

## Procedimiento general F - Saponificación - eliminación de Me / Et de los ésteres

- 40 A una solución agitada de un éster en MeOH se le añadió una solución ac. 1 M de LiOH hasta que el pH de la mezcla fue de aproximadamente 13-14 y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se completó (~ 16 h, controlada por HPLC). Se añadió ácido cítrico (~ 10% ac.) para neutralizar la reacción y los disolventes se eliminaron a presión reducida. El producto crudo se purificó opcionalmente por RP-HPLC o se usó directamente en la siguiente etapa.

## Procedimiento general G - Activación de un grupo hidroxilo / fenol con carbonato de bis (p-nitrofenilo)

- 45 A una solución agitada de un alcohol / fenol en THF / DMF (2/1) se le añadió carbonato de bis (p-nitrofenilo) (3-5 eq), seguido de DIEA (2-4 eq) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se consumió la mayor parte del material de partida. El progreso de la reacción se controló por LC / MS. El producto bruto se purificó opcionalmente mediante cromatografía en columna ultrarrápida o mediante precipitación y lavado.

## Procedimiento general H - Reacción de una amina con un anhídrido cíclico (anhídrido glutárico o anhídrido succínico)

- 50 Un compuesto que contenía amina se disolvió en DMF. Se añadió anhídrido glutárico (3 eq), seguido de la adición de

DIEA (4 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se consumió la mayor parte del material de partida. El progreso de la reacción se controló por LC / MS. El producto bruto se purificó por RP-HPLC para producir el ácido carboxílico puro.

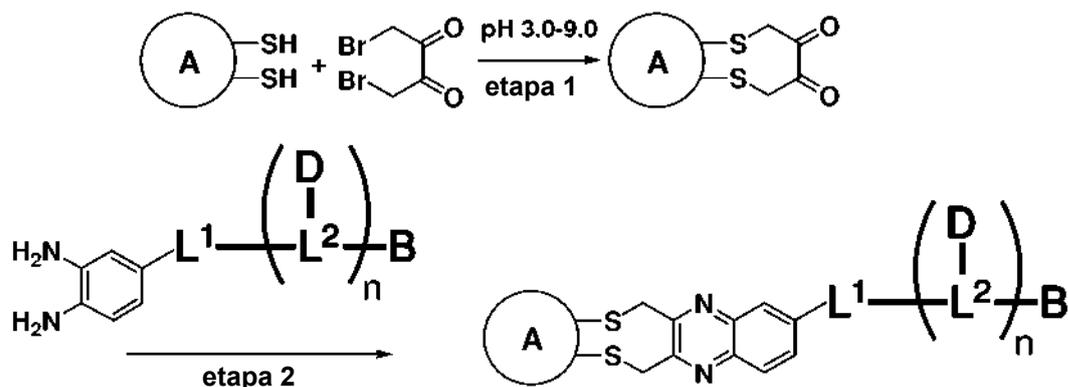
Procedimiento general I - Formación de carbamato con carbonato de p-nitrofenilo (por ejemplo, FmocVC-PAB-PNP)

- 5 Se disolvió un compuesto que contenía amina en DMF y se añadió carbonato de alquil / aril p-nitrofenilo (1,5 eq), seguido de la adición de DIEA (2 eq) y HOBT (cat., 5%). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que se consumió la mayor parte de la amina. El progreso de la reacción se controló por LC / MS. El producto bruto se purificó opcionalmente por RP-HPLC para producir el carbamato puro.

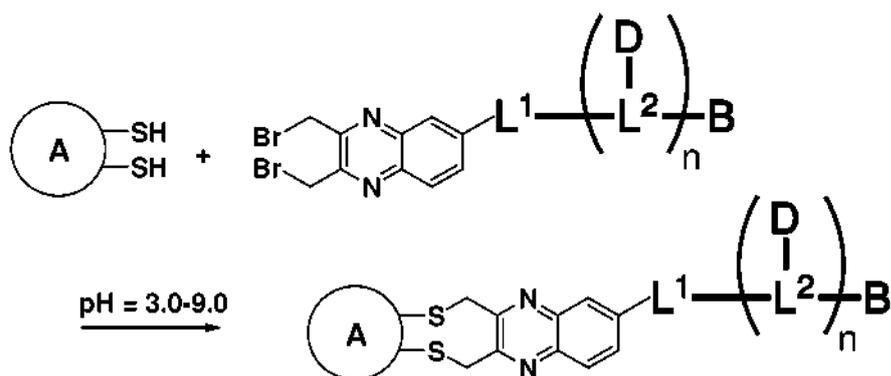
Procedimiento general J - Formación de un éster activado (por ejemplo, NHS) a partir de un ácido

- 10 Se disolvió un ácido en DCM y se añadió DMF para ayudar a la disolución, si fuera necesario. Se añadió N-hidroxisuccinimida (1,5 eq), seguido de EDC \* HCl (1,5 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h hasta que se consumió la mayor parte del ácido. El progreso de la reacción se controló por RP-HPLC. La mezcla se diluyó luego con DCM y se lavó sucesivamente con ácido cítrico (ac. 10%) y salmuera. La capa orgánica se secó y se concentró hasta sequedad. El producto bruto se purificó opcionalmente por RP-HPLC o cromatografía en columna de gel de sílice.
- 15

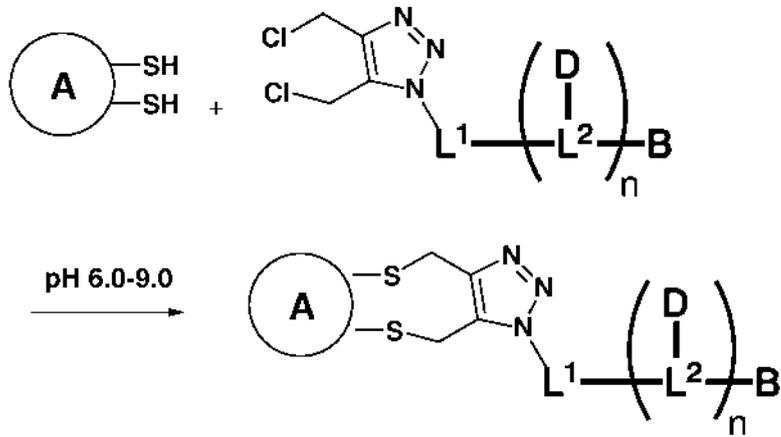
Método de conjugación. Conjugación en dos residuos de Cys formando una estructura cíclica Método de dos etapas



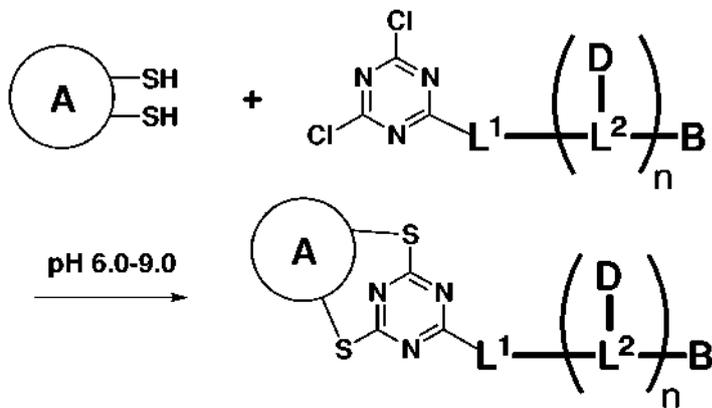
Método de una etapa



Triazol método de una etapa



Triazina método de una etapa



5 Descripción experimental

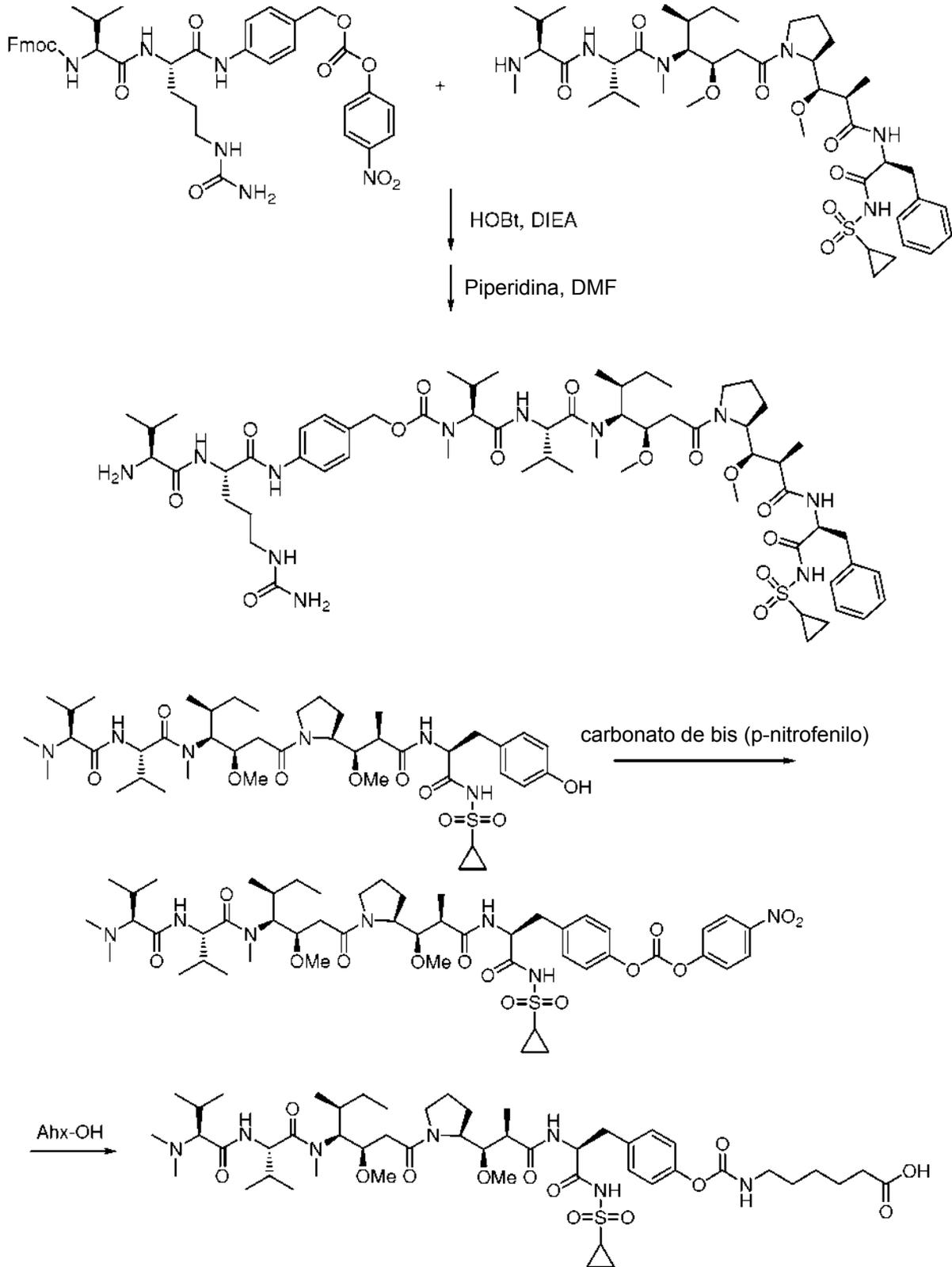
Etapa 1. Síntesis de construcción de fármaco-ligador (-L<sup>2</sup>-D)

Métodos de síntesis de construcciones de fármaco-ligador, pero sin limitación:

Método 1-1: Ligador y fármaco conectados mediante un enlace carbamato mediante el procedimiento general G o I para la activación y la formación de carbamato y el procedimiento general C, D o F para la eliminación de grupos protectores.

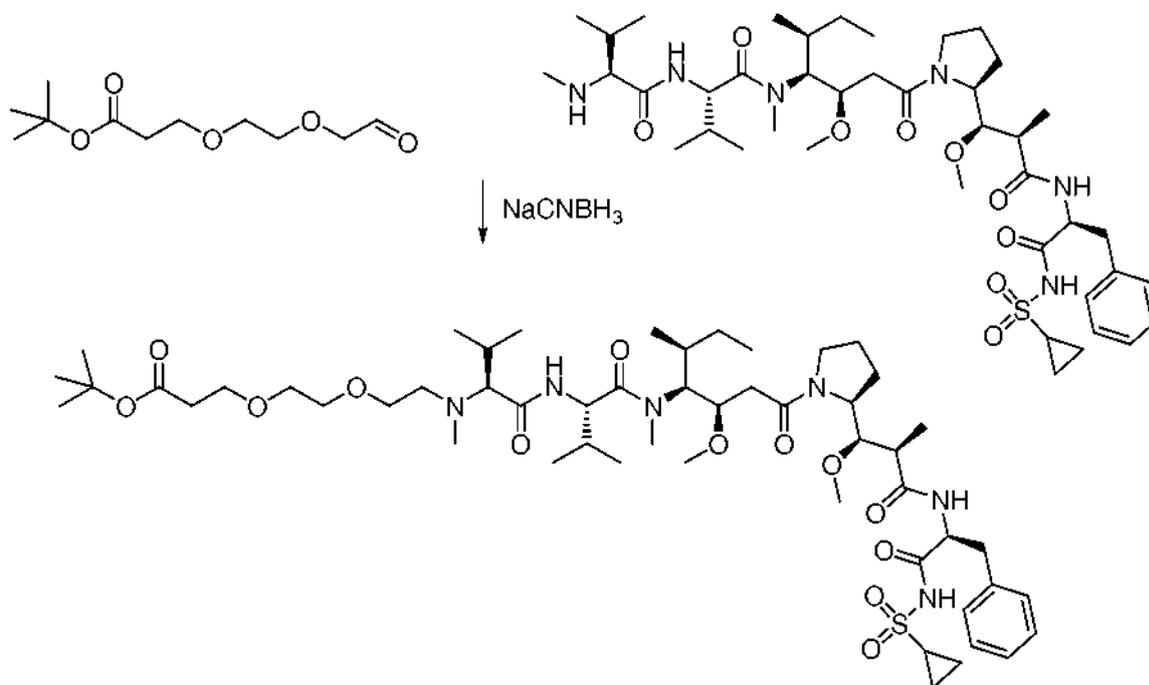
10

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO GENERAL I



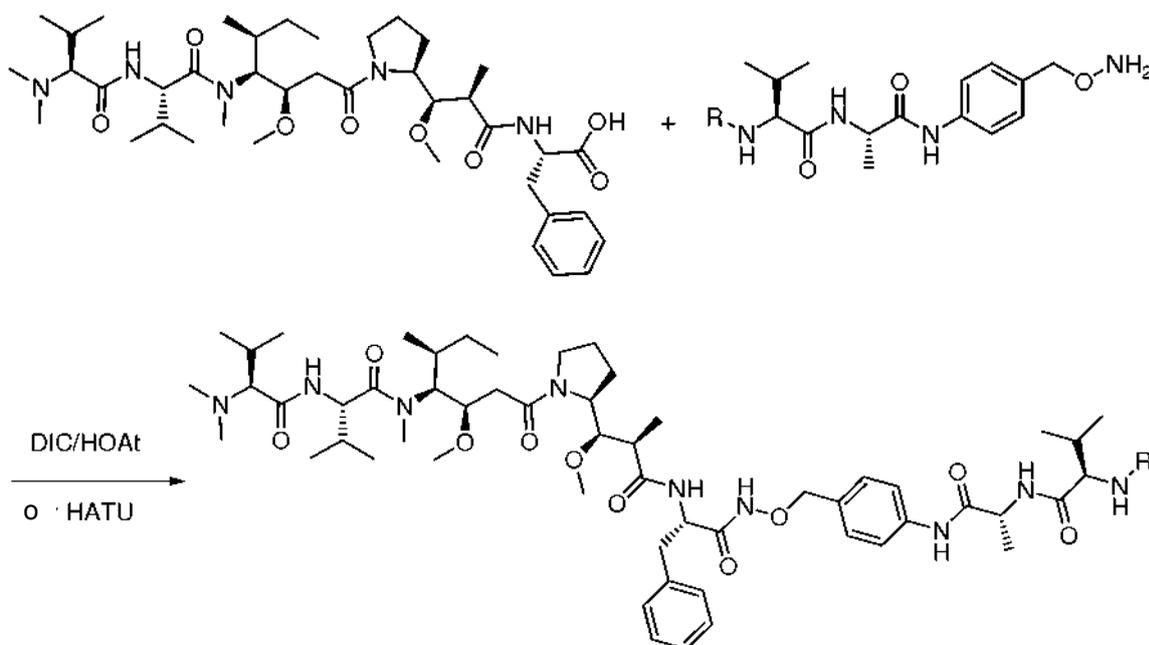
Método 1-2: Ligador y fármaco conectados mediante una reacción de alquilación reductora (Procedimiento general E)

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO GENERAL II



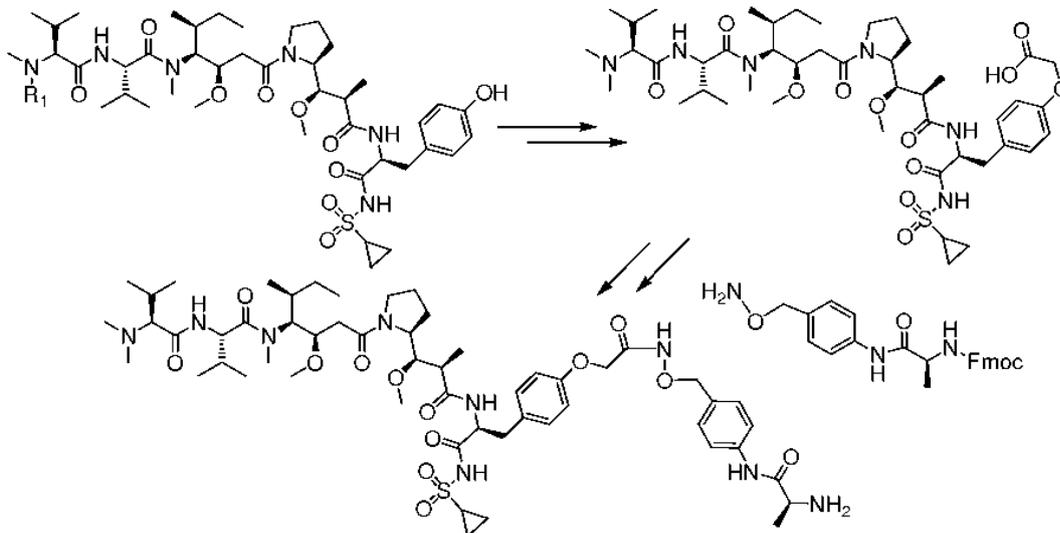
5 Método 1-3. Molécula activa que contiene un resto de ácido carboxílico conectado a un ligador de alcoxi-amino a través de la formación de hidroxamato (Procedimiento general A o B), seguido de la eliminación de grupos protectores.

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO GENERAL III



10 Para las moléculas activas que son ácidos hidroxámicos, el método anterior aún puede emplearse ya que la construcción liberará ácido hidroxámico en condiciones de escisión enzimática. La reacción debe comenzar desde su correspondiente ácido carboxílico.

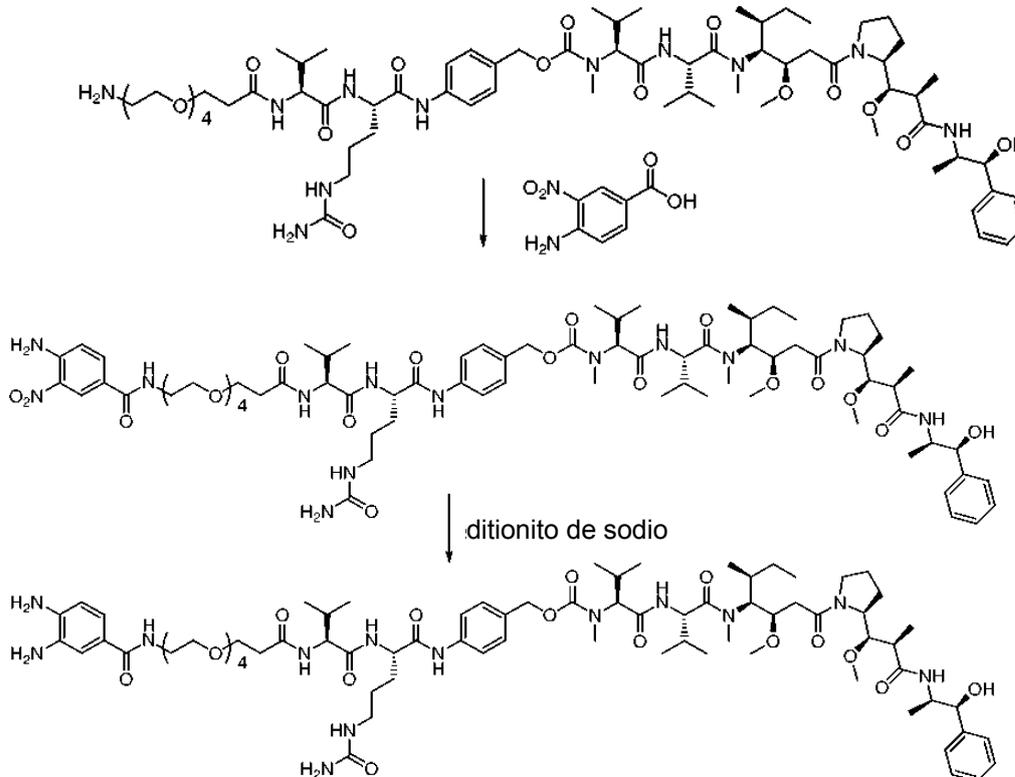
ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO GENERAL IV



Etapa 2. Introducción de grupos funcionales en L1-(L2-D)

Método 2. Introducción del resto o-fenilendiamina

5 ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO GENERAL V



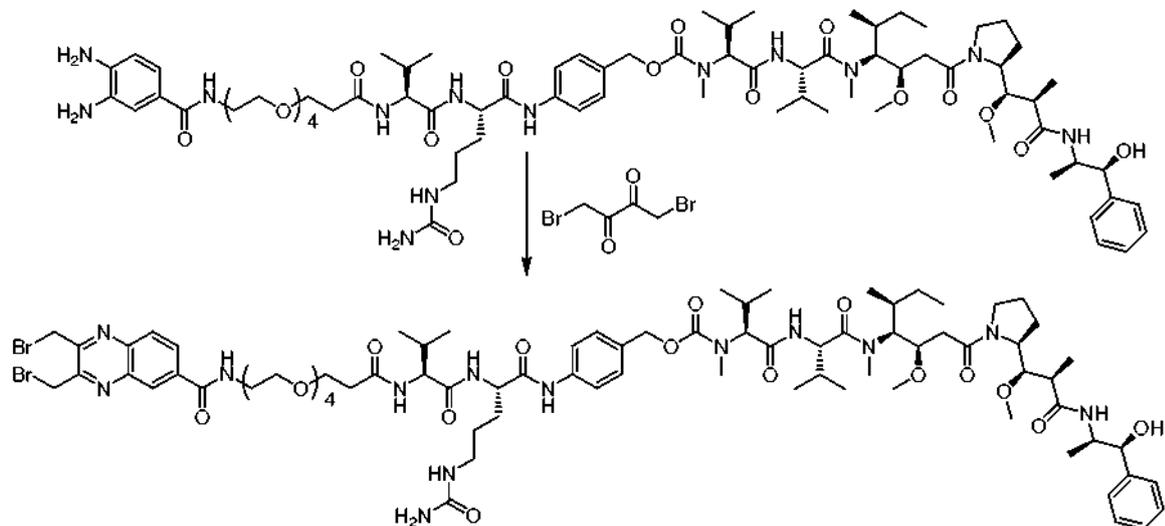
El ácido 3-nitro-4-amino benzoico se incorporó utilizando una reacción de amidación estándar (Procedimiento general B). El grupo nitro se redujo usando ditionito de sodio (3 eq) en acetonitrilo / agua para dar la o-fenilendiamina deseada. MS encontrada: 1504,8 (M + H)<sup>+</sup>.

10

Etapa 3 Introducción de los grupos funcionales finales antes de la conjugación.

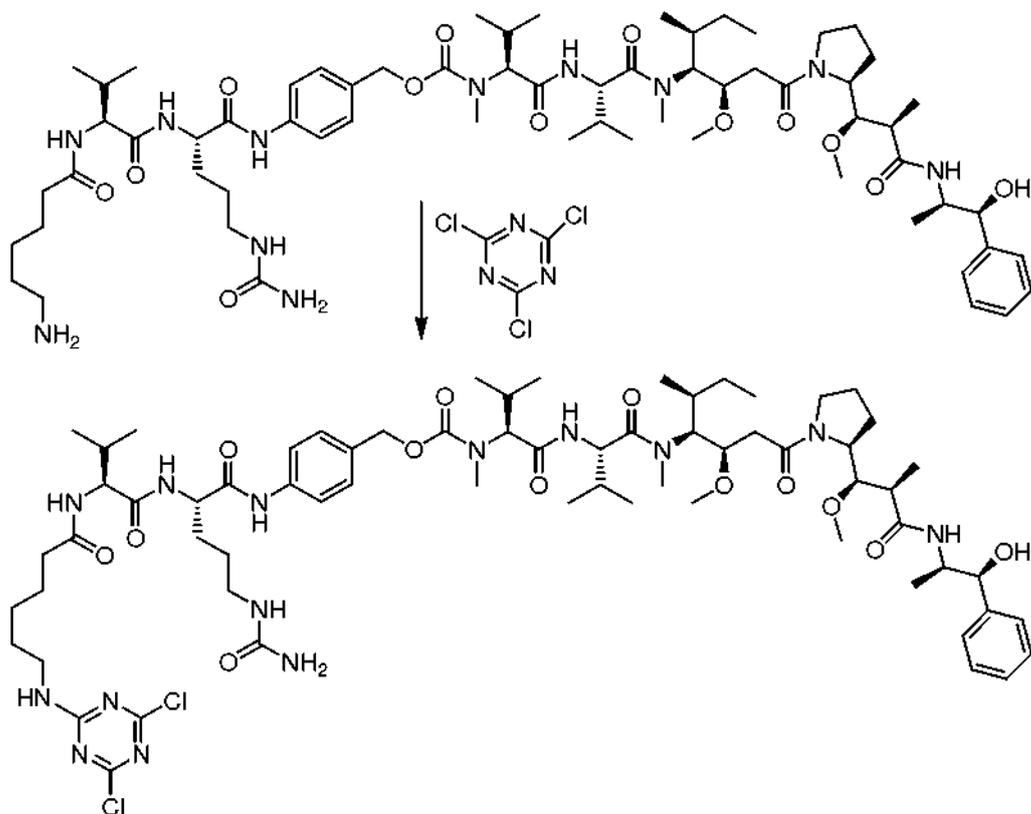
Métodos de introducción del grupo reactivo final antes de la reacción de conjugación, pero sin limitación:

## Método 3-1. Formación de dibromometil quinoxalina.



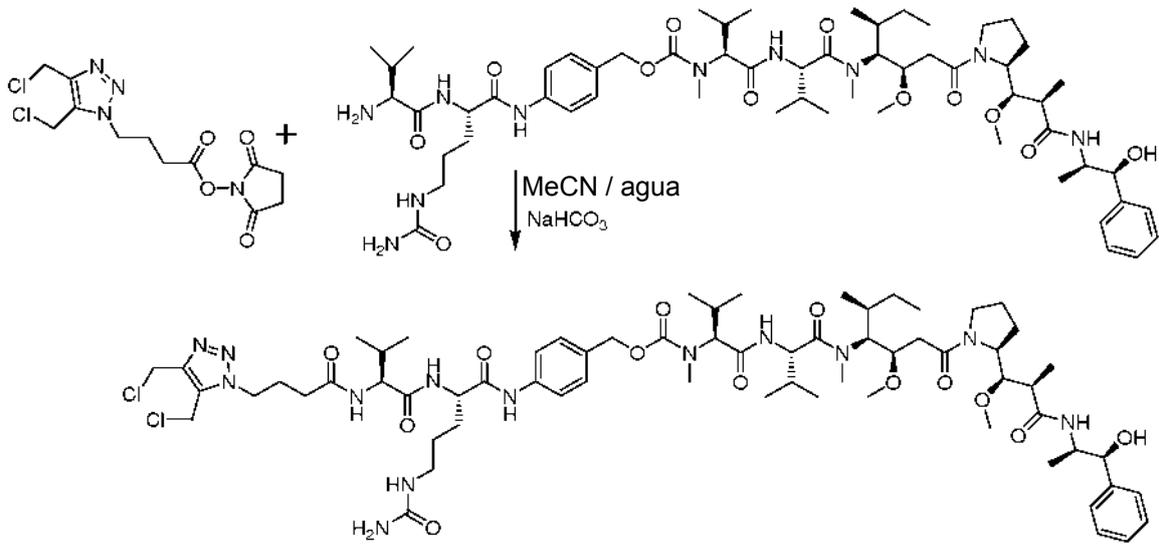
El compuesto de o-fenilendiamina se disolvió en acetonitrilo / agua. Se añadió dibromometil dicetona. La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se purificó directamente por RP-HPLC para dar la quinoxalina deseada.

## 5 Método 3-2. Formación de diclorotriazina.



A una solución agitada y enfriada (baño de hielo) de compuesto de amina (12 mg) en DMF (1 ml) se le añadió una solución de cloruro cianúrico (10 mg) en THF (0,5 ml) y DIEA (5  $\mu$ L). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por RP-HPLC para dar la diclorotriazina deseada (11 mg) como un polvo blanco después de la liofilización. MS encontrado 1383,9 (M + H)<sup>+</sup>.

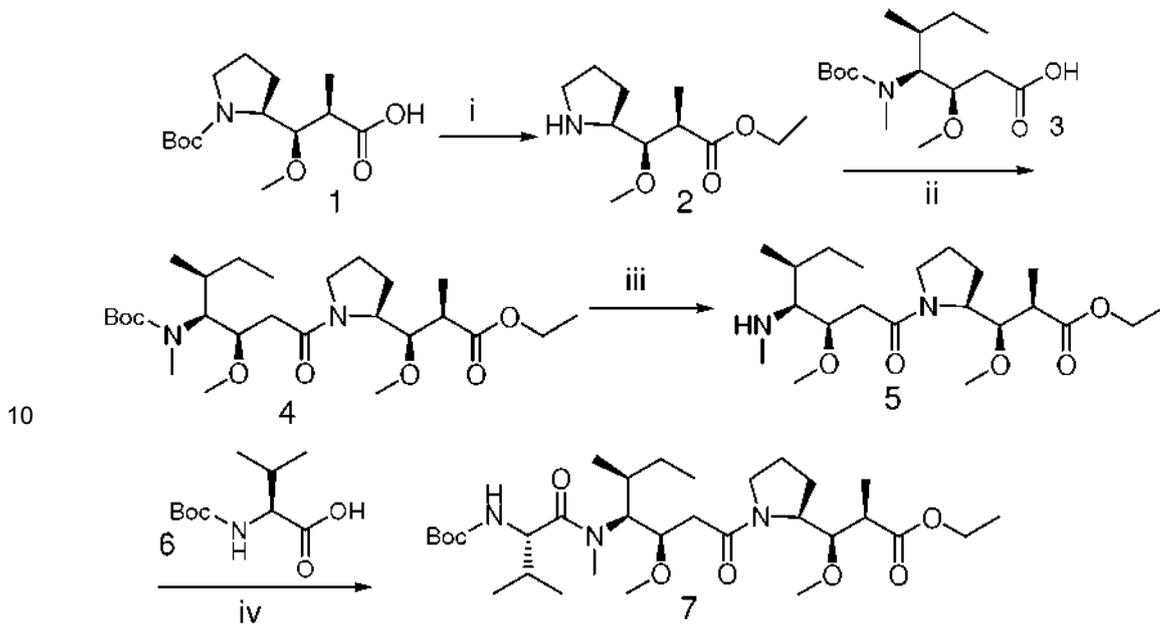
Método 3-3. Formación de diclorometiltriazol

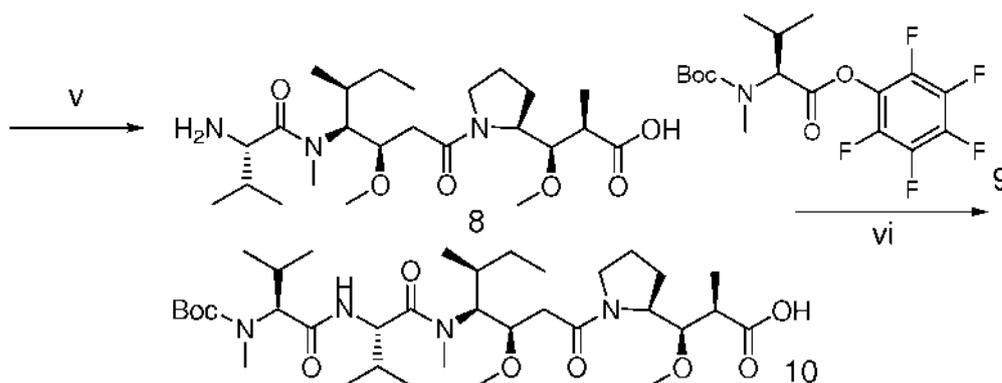


5 A una solución agitada de VC-PAB-MMAE (30 mg) en acetonitrilo / agua (2 ml, 6/4, v / v) se le añadió una solución de triazol NHS éster (15 mg) en acetonitrilo (0,5 ml) y NaHCO<sub>3</sub> sat. ac. (0,1 ml). La mezcla de reacción se purificó por RP-HPLC para dar el producto deseado en forma de un polvo blanco después de la liofilización (28 mg). MS encontrado: 1356,9 (M + H)<sup>+</sup>

Ejemplo I. Síntesis del compuesto 10.

ESQUEMA I





Esquema I. Reactivos y condiciones: i.  $\text{SOCl}_2$ , EtOH; ii. DEPC, TFA, DCM; iii. TFA, DCM; iv. BrOP, DCM, DIEA; v. TFA, DCM; vi. DIEA, DCM, HOBT.

5 A una solución del compuesto 1 (23,4 g, 81,53 mmol) en EtOH seco (200 ml) se le añadió  $\text{SOCl}_2$  (100 ml) a  $0^\circ\text{C}$ . La mezcla se agitó durante una noche y el disolvente se eliminó por evaporación al vacío. El residuo se usó inmediatamente para la siguiente etapa sin purificación adicional. A una solución del compuesto 2 (81,53 mmol), se le añadió el compuesto 3 (50 g, 163,1 mmol) en DMF seco (150 ml) DEPC (15,9 g, 97,8 mmol), TEA (41 g, 0,408 mol) a  $0^\circ\text{C}$ . La mezcla se agitó durante 2 h a  $0^\circ\text{C}$ . Luego la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por evaporación a vacío. El residuo se diluyó con acetato de etilo-tolueno (2: 1, 900 ml) y se lavó con 1 M de  $\text{KHSO}_4$ , agua,  $\text{NaHCO}_3$  sat., y salmuera. La capa orgánica se secó y se concentró para dar un residuo, que se purificó en columna (hexanos: acetato de etilo: DCM = 5: 1: 1) para dar 38 g del compuesto 4.

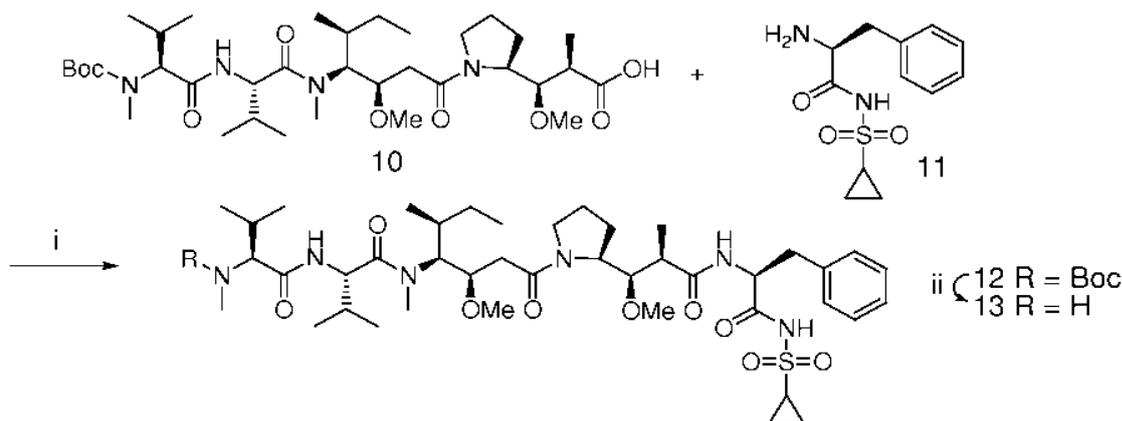
10 A una solución de Boc-Val-OH (30,6 g, 0,142 mol), se le añadió BrOP (28 g, 70,87 mmol) del compuesto 5 (de 25 g del compuesto 4) en DCM (400 mL), DIEA (30 g, 0,236 mol) a  $0^\circ\text{C}$ . La mezcla se protegió de la luz y se agitó durante 0,5 h a  $0^\circ\text{C}$ . Luego la mezcla se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por evaporación al vacío. El residuo se diluyó con acetato de etilo-tolueno (3: 1, 900 ml) y se lavó con 1 M de  $\text{KHSO}_4$ , agua,  $\text{NaHCO}_3$  sat., y salmuera. La capa orgánica se secó y se concentró para dar un residuo, que se purificó en columna de gel de sílice (hexanos: acetato de etilo: DCM = 3: 1: 1) para dar 22 g del compuesto 7.

15 A una solución del compuesto 7 (40 g, 66,7 mmol) en THF (600 ml) se le añadió una mezcla de LiOH (14 g, 0,33 mol) en agua (300 ml) por debajo de  $10^\circ\text{C}$ . La mezcla se agitó durante 5 días a  $25^\circ\text{C}$ . El THF se eliminó por evaporación. La capa acuosa se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$  (200 ml x 3). La capa acuosa se acidificó a pH 2 con HCl 1 N a  $0^\circ\text{C}$ , la mezcla se extrajo con acetato de etilo y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó y se concentró para dar un residuo, que se purificó mediante Prep-HPLC para dar 14 g del compuesto 8.

20 A una solución del compuesto 8 (3 g) en DCM (100 ml) se le añadió el compuesto 9 (3 g, preparado según el procedimiento general J a partir de Boc-N-Me-Val-OH usando EDC y pentafluorofenol). Se añadió DIEA (2,6 ml), seguido de HOBT (cat. 100 mg) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se purificó en una columna de gel de sílice para dar el compuesto 10 en forma de un polvo blanco (3,1 g). MS  $m/z$  Calc. para  $\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{O}_9$  684,5, Encontrado 707,6 ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ).

Ejemplo II-1. Síntesis del compuesto 13.

ESQUEMA II-1



30

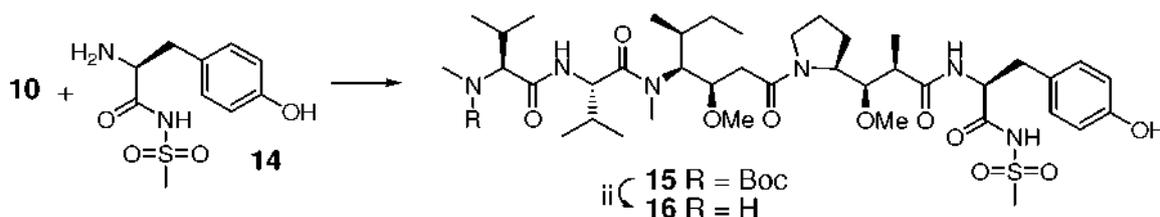
Esquema II-1. Reactivos y condiciones: i. DIC / HOAt, DMF, t.a., 16 h; ii. HCl / Dioxano

Los derivados de sulfonamida de aminoácido 11 se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento informado anteriormente (ARKIVOC 2004 (xii) 14-22, o documento WO 2007146695) utilizando un aminoácido protegido con Boc y ciclopropil / metil sulfonamida, seguido de la eliminación de Boc (Procedimiento general C)

- 5 El compuesto 13 se sintetizó utilizando los procedimientos generales descritos anteriormente como sigue: Formación de enlace amida mediada por DIC / HOAt (Procedimiento general B) entre Boc-N-Me-Val-Dil-Dap-OH (compuesto 1) y amina 11, seguidos por eliminación de Boc (Procedimiento general C). El compuesto final se purificó por HPLC de fase inversa para dar el compuesto 13 como un polvo blanco después de la liofilización. MS *m/z* Calc. para C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>S 834,5, Encontrado 835,6 ([M + H]<sup>+</sup>).

Ejemplo II-2. Síntesis de compuestos 16

10 ESQUEMA II-2



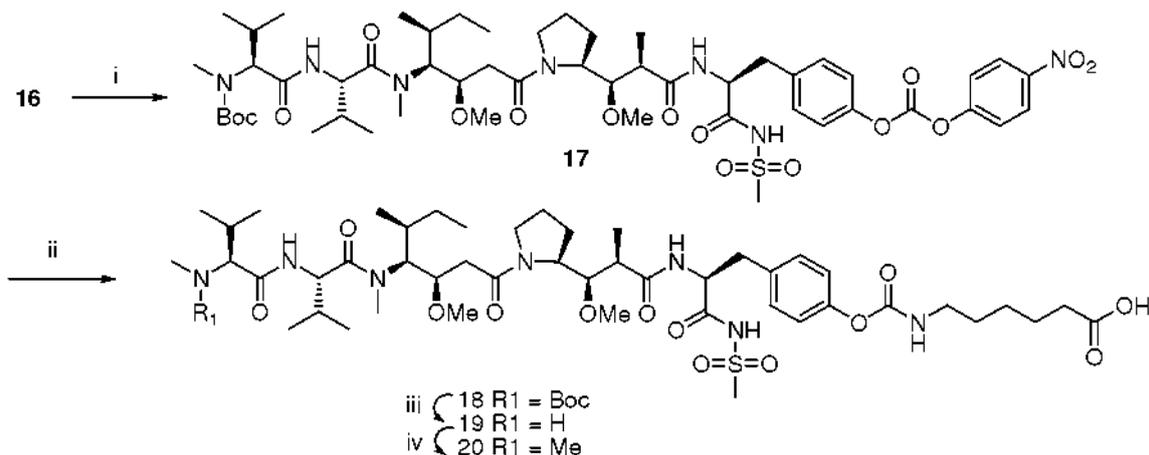
Esquema II-2. Reactivos y condiciones: i. DIC / HOAt, DMF, t.a., 16 h; ii. HCl / Dioxano

- 15 Los derivados de sulfonamida de aminoácido 14 se sintetizaron de acuerdo con el procedimiento informado anteriormente (ARKIVOC 2004 (xii) 14-22, o documento WO 2007146695) utilizando un aminoácido protegido con Boc y ciclopropil / metil sulfonamida, seguido de la eliminación de Boc (Procedimiento general C).

- 20 El compuesto 16 se sintetizó utilizando los procedimientos generales descritos anteriormente como sigue: Formación de enlace amida mediada por DIC / HOAt (Procedimiento general B) entre Boc-N-Me-Val-Dil-Dap-OH (compuesto 10) y amina 14, seguido por eliminación de Boc (Procedimiento general C). El compuesto final se purificó por HPLC de fase inversa para dar el compuesto 16 como un polvo blanco después de la liofilización. MS *m/z* Calc. para C<sub>41</sub>H<sub>70</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> S 838,5, Encontrado 839,6 ([M + H]<sup>+</sup>).

Ejemplo II-3. Síntesis del compuesto 20

Esquema IIC



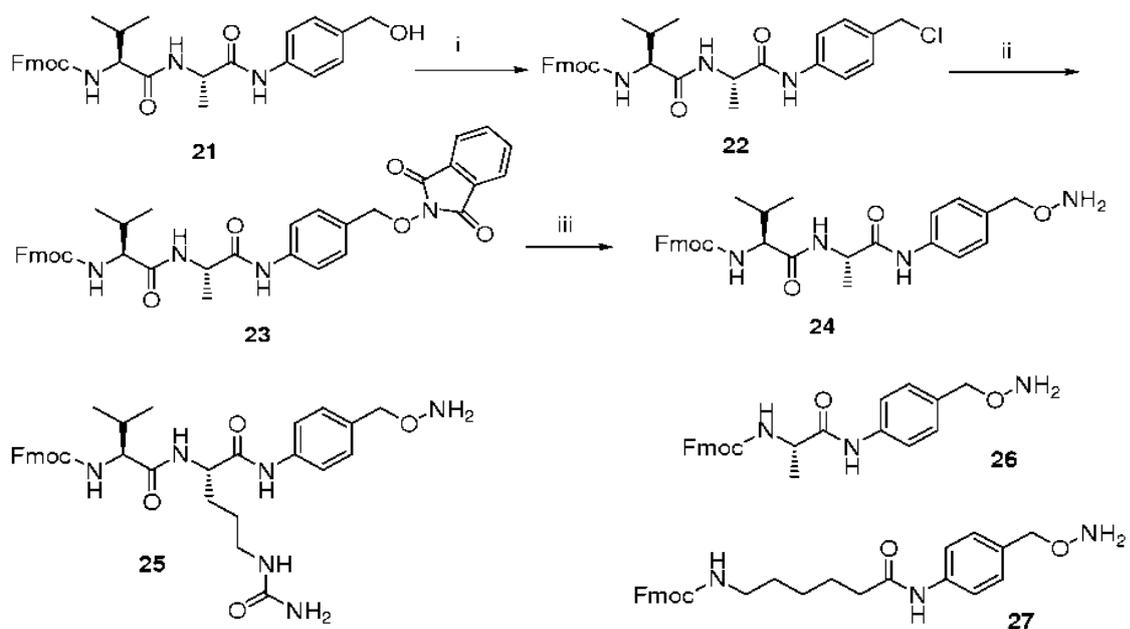
- 25 Esquema IIC. Reactivos y condiciones: i. carbonato de bis (nitrofenilo), DIEA, THF / DMF, t.a.; ii. Ácido 6-aminohexanoico, NaHCO<sub>3</sub> (ac.); iii. HCl / Dioxano (4 N); iv. HCHO, NaCNBH<sub>3</sub>, DMF, HOAc.

- 30 El fenol 16 (1 mmol) se trató con 3 eq de carbonato de bis (p-nitrofenilo) para formar el carbonato activado 17 (procedimiento general G). El producto crudo se usó directamente sin purificación adicional. El ácido 6-aminohexanoico (5 eq) se disolvió en NaHCO<sub>3</sub> sat. ac. (5 ml) y la solución se añadió. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se añadió ácido cítrico (ac., 10%) para acidificar la reacción (pH = 4-5) y luego se diluyó con EtOAc (150 ml). La capa orgánica se secó (sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentró para dar el producto bruto 18 que se sometió a los procedimientos siguientes: eliminación de Boc (Procedimiento general C), alquilación reductora usando HCHO. El producto final se purificó por RP-HPLC para dar el compuesto 20 como un polvo blanco después de la liofilización. MS *m/z* Calc. para C<sub>48</sub>H<sub>81</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub>S 995,6, Encontrado 996,4 ([M + H]<sup>+</sup>).

Ejemplo III. Síntesis de los ligadores de alcoxilamina 24, 25, 26 y 27

ID	Estructura
24	
25	
26	
27	

Esquema III



5

Esquema III. Reactivos y condiciones: i. SOCl<sub>2</sub>, THF, 1 h; ii. N-hidroxifalimida, NaHCO<sub>3</sub>, DMF, t.a., 48 h; iii. NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, HOAc, DMF.

## Ejemplo III-1. Síntesis del compuesto 24

A una solución agitada de Fmoc-VA-PAB (21) (Bioconjugate Chem., 2002, 13, 855-859) (9 g, 15 mmol) en THF (200 ml) se le añadió cloruro de tionilo (18 mmol) gota a gota. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El análisis por TLC (acetato de etilo / hexano, 1/1, v / v) mostró la finalización de la reacción. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se lavó con hexanos (100 ml) para dar el compuesto 22 en forma de un sólido ligeramente amarillento (8,8 g).

El compuesto 22 (6,2 g, 10 mmol) se disolvió en DMF anhidro (100 ml). Se añadió N-hidroxi-ftalimida (3,2 g, 20 mmol), seguido de NaHCO<sub>3</sub> sólido (3,4 g, 40 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. El análisis por TLC mostró que la mayor parte del compuesto 61 se consumió. La reacción se diluyó luego con acetato de etilo (500 ml) y se lavó sucesivamente con una solución sat. ac. de NaHCO<sub>3</sub> (3 x 200 ml) y salmuera (200 ml). La capa orgánica se secó y se concentró para dar el compuesto 23 en forma de un sólido marrón, que se usó directamente sin purificación adicional.

El compuesto crudo 23 de la etapa anterior se disolvió en DMF (100 ml). Se añadió HOAc (6 ml), seguido de hidrato de hidrazina (5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La LC / MS mostró la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se vertió luego en un vaso de precipitados que contenía 1 L de agua con agitación. El sólido precipitado se recogió por filtración y se lavó dos veces con agua para dar el compuesto 24 como un sólido blanco (pureza > 85%, se puede usar directamente). El compuesto 63 puro se obtuvo después de la purificación por RP-HPLC. MS *m/z* Calc. para C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 530,3, Encontrado 531,4 ([M + H]<sup>+</sup>).

## Ejemplo III-2. Síntesis del compuesto 25

El compuesto 25 se sintetizó a partir del compuesto Fmoc-VC-PAB (Bioconjugate Chem., 2002, 13, 855-859) utilizando los procedimientos descritos anteriormente para la síntesis del compuesto 25. MS *m/z* Calc. para C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> 616,3, Encontrado 617,5 ([M + H]<sup>+</sup>).

## Ejemplo III-3. Síntesis del compuesto 26

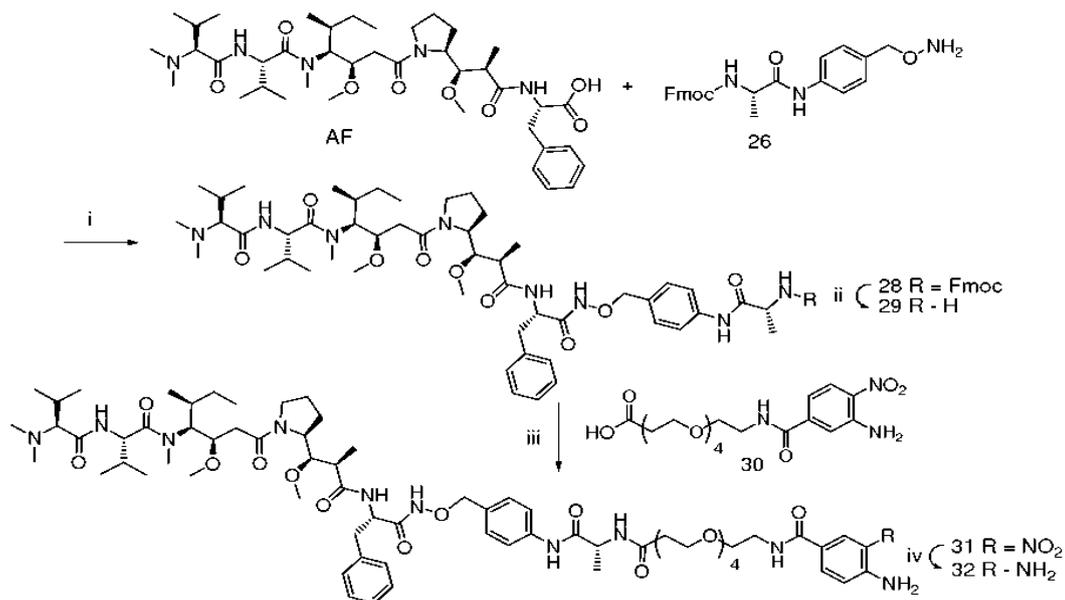
El compuesto 26 se sintetizó a partir del compuesto Fmoc-A-PAB (sintetizado de acuerdo con el procedimiento descrito: Bioconjugate Chem., 2002, 13, 855-859) utilizando los procedimientos descritos anteriormente para la síntesis del compuesto 26. MS *m/z* Calc. para C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 431,2, Encontrado 432,6 ([M + H]<sup>+</sup>).

## Ejemplo III-4. Síntesis del compuesto 27

El compuesto 27 se sintetizó a partir del compuesto Fmoc-Ahx-PAB utilizando los procedimientos descritos anteriormente para la síntesis del compuesto 27. MS *m/z* Calc. para C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 473,2, Encontrado 474,3 ([M + H]<sup>+</sup>).

## Ejemplo IV. Síntesis de -L1-(L2-D)

## ESQUEMA IV



Esquema IV. Reactivos y condiciones: i. DIC, HOAt, DMF, t.a.; ii. Piperidina, DMF; iii. HATU, DIEA, DMF; iv. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, MeCN, H<sub>2</sub>O, pH = 6.

## Ejemplo IV-1. Síntesis del compuesto 32

El compuesto 32 se sintetizó utilizando los procedimientos generales descritos anteriormente como sigue: Formación de enlace amida mediada por DIC / HOAt (Procedimiento general B) entre Auristatina F y compuesto 26, seguido de eliminación de Fmoc (Procedimiento general D), reacción con ácido 30 (Procedimiento general A), y reducción del grupo nitro a grupo amino.

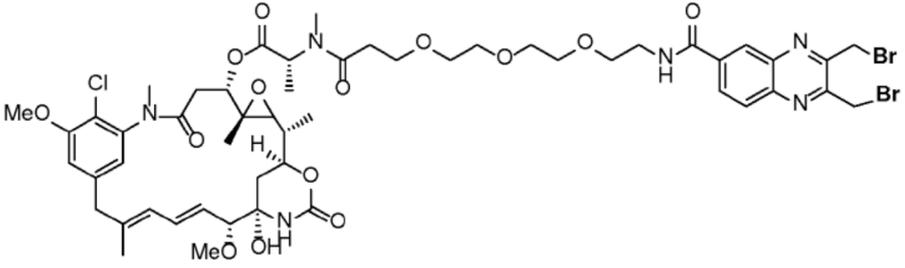
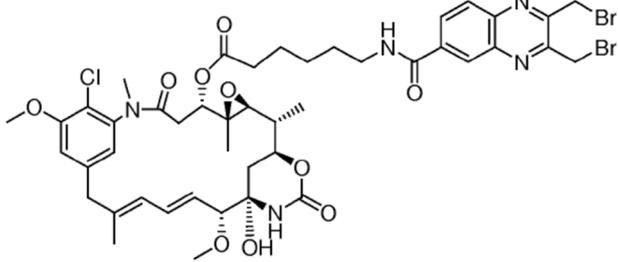
5

El compuesto nitro 31 (32 mg) se disolvió en acetonitrilo / agua (6/4, v / v) y se añadió una solución de ditionito de sodio (1 M en agua, 0,2 ml). El pH de la reacción se controló a 6-6,5 por adición de tampón MES. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se purificó directamente por RP-HPLC para dar el producto deseado en forma de un sólido blanco después de la liofilización (18 mg). MS encontrado 1319,0 (M + H)<sup>+</sup>.

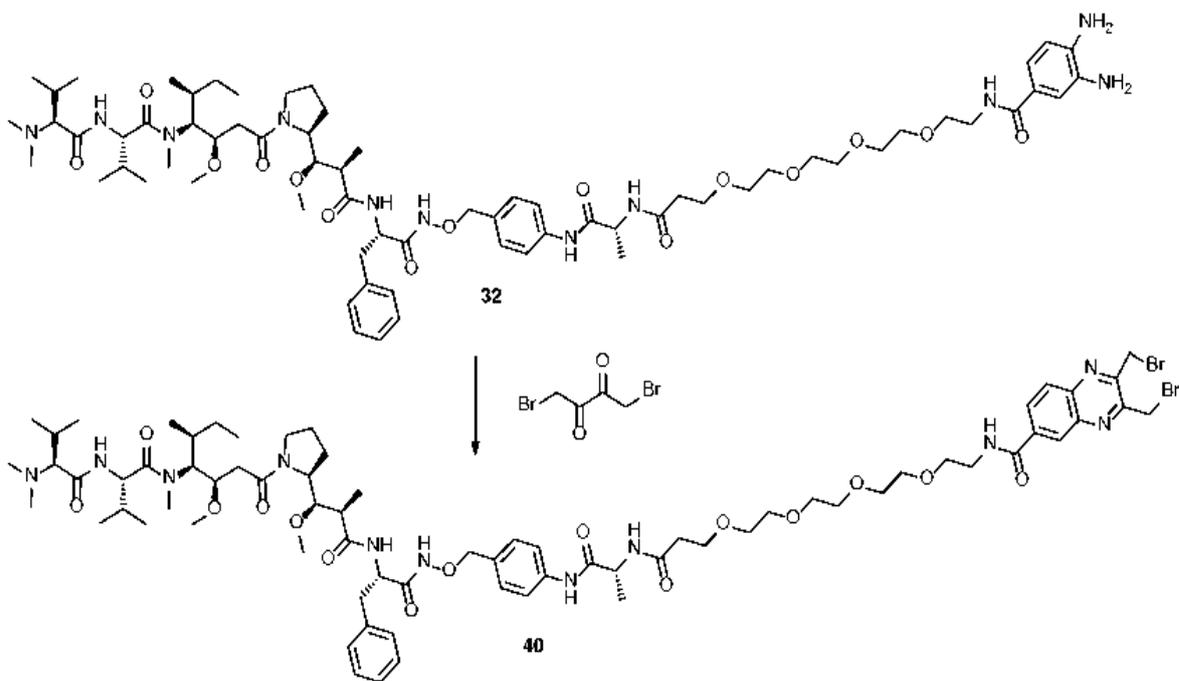
## 10 Ejemplo V. Introducción del grupo funcional final antes de la reacción de conjugación.

ID	Estructura de -L <sup>1</sup> -(L <sup>2</sup> -D)	MS encontrada (M+H) <sup>+</sup>
34		1713,0
40		1526,4
36		1383,9
39		1356,9
41		1281,2
42		1424,5

43		1249,5
44		1621,7
45		1572,7
46		1288,3
47		1510,8
48		1250,6

49		1195,4
50		1020,4

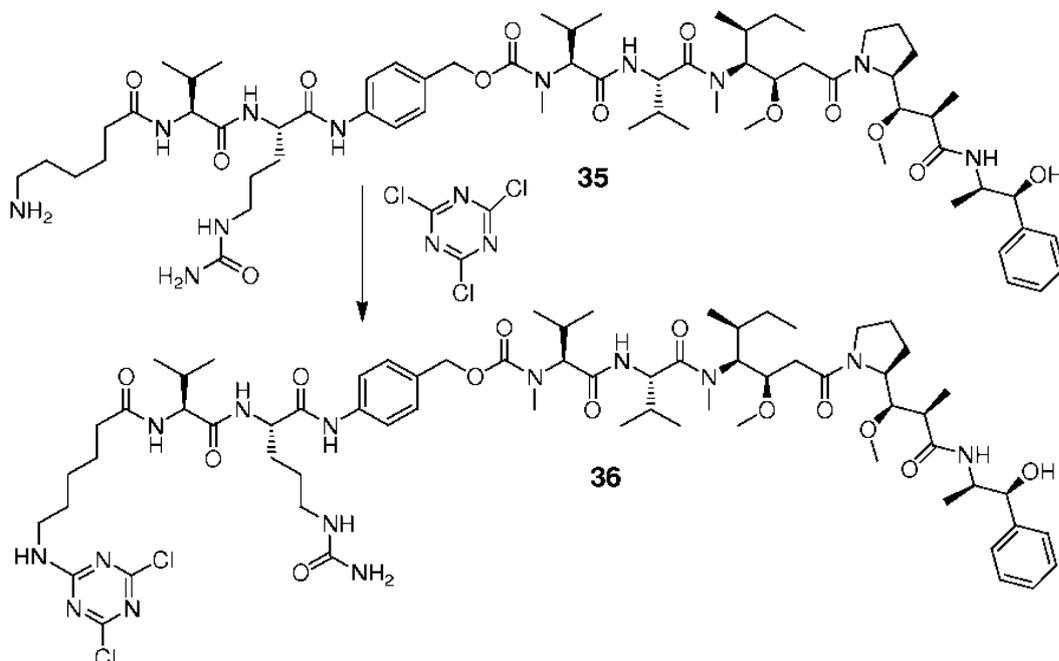
Ejemplo V-1. Formación de dibromometil quinoxalina.



5 El compuesto 32 de o-fenilendiamina (12 mg) se disolvió en acetonitrilo / agua (1 ml). Se añadió dibromometil dicetona (10 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y se purificó directamente por RP-HPLC para dar la quinoxalina 40 deseada como un polvo blanco (12 mg) después de la liofilización. MS encontrado 1526,4 (M + H)<sup>+</sup>.

Los compuestos 34, 42, 43, 44, 45, 46 y 47 se sintetizaron a partir de las o-fenilendiaminas correspondientes usando el procedimiento sintético descrito anteriormente para la síntesis del compuesto 40.

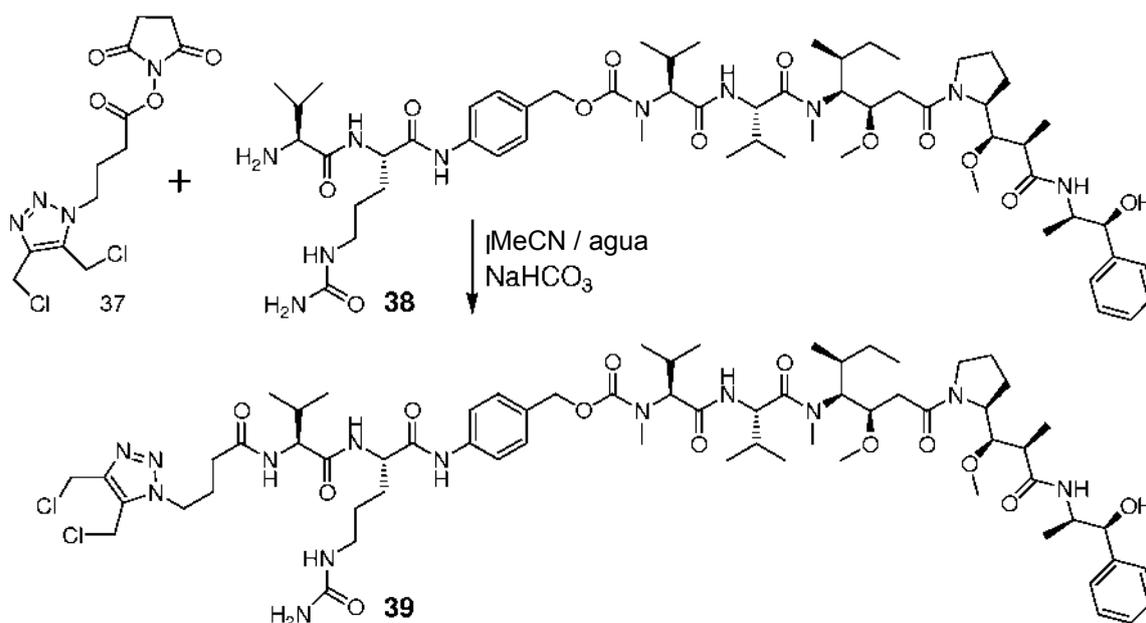
## Ejemplo V-2. Formación de diclorotriazina.



5 A una solución agitada y enfriada de compuesto de amina 35 (12 mg) en DMF (1 ml) se le añadió una solución de cloruro cianúrico (10 mg) en THF (0,5 ml) y DIEA (5  $\mu$ l). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por RP-HPLC para dar la diclorotriazina deseada 36 (11 mg) en forma de un polvo blanco después de la liofilización. MS encontrado 1383,9 (M + H)<sup>+</sup>.

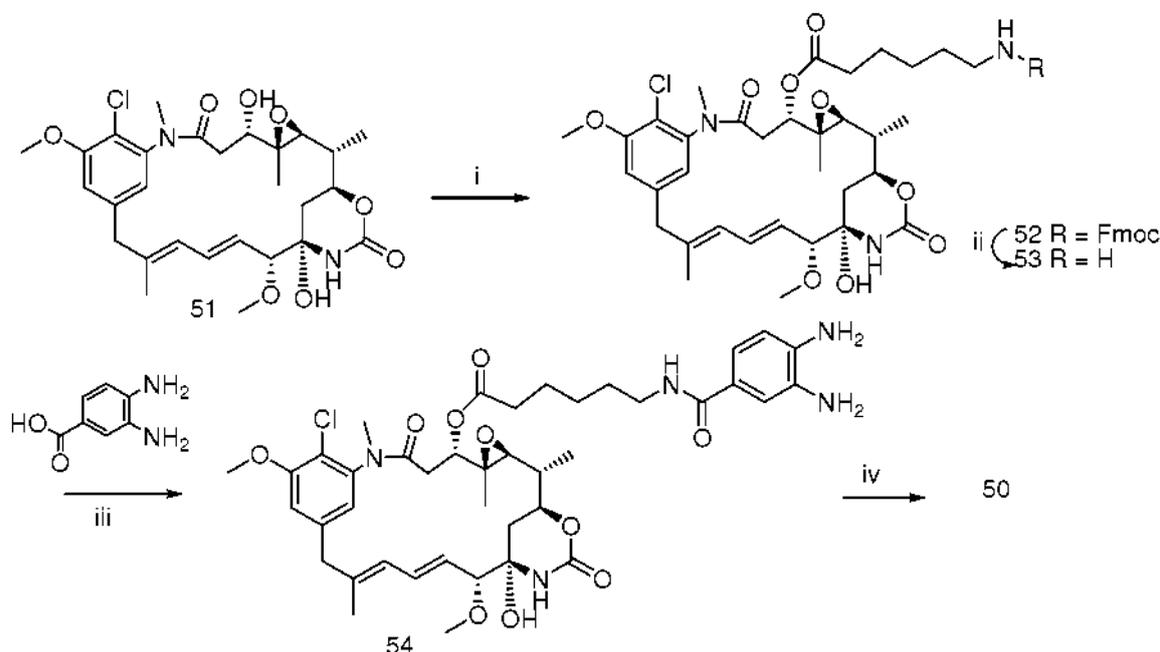
El compuesto 41 se sintetizó utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente para la síntesis del compuesto 36. MS encontrado 1281,2 (M + H)<sup>+</sup>.

## Ejemplo V-3. Formación de diclorometiltriazol



10 A una solución agitada de VC-PAB-MMAE (38, 30 mg) en acetonitrilo / agua (2 ml, 6/4, v / v) se le añadió una solución de trizol NHS éster (37, 15 mg) en acetonitrilo (0,5 mL) y NaHCO<sub>3</sub> sat. ac. (0,1 ml). La mezcla de reacción se purificó por RP-HPLC para dar el producto deseado 39 en forma de un polvo blanco después de la liofilización (28 mg). MS encontrada: 1356,9 (M + H)<sup>+</sup>.

## Ejemplo V-4. Síntesis del Compuesto 50



Esquema V-4. Reactivos y condiciones: i. Fmoc-Ahx-OH (ácido aminohexanoico), DIC, DCM, Py, t.a., 48 h; ii. Piperidina, DMF; iii. DIC, HOBt; iv. Dibromometil dicetona.

- 5 Se suspendió Fmoc-Ahx-OH (353 mg) en DCM anhidro (5 ml) y se añadió DIC (0,5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se añadió maitansinol (compuesto 51, 56 mg) a la mezcla, seguido de la adición de 0,5 ml de piridina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 h. Los disolventes se eliminaron a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice, EA / hexanos) para dar el compuesto 52 en forma de un sólido blanco (45 mg) que se trató con piperidina para eliminar Fmoc (Procedimiento general D), seguido de reacción de amidación con ácido 3,4-diaminobenzoico (1 eq) usando DIC / HOBt (Procedimiento general B, usando HOBt en lugar de HOAt) para dar el compuesto 54 (22 mg) como un polvo ligeramente amarillento después de la purificación por HPLC y la liofilización. El compuesto 54 se convirtió luego en el compuesto deseado 50 utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente para la síntesis del compuesto 40. MS encontrado 1020,4 (M + H)<sup>+</sup>.

## 15 Conjugación anticuerpo-fármaco

- Procedimiento de conjugación general: a un anticuerpo objetivo, 0,5-50 mg / ml, en un cierto tampón a pH 5,0-9,0, como PBS, se le añadieron 0,5-100 eq de agente reductor, como TCEP y DTT. La reducción se realizó a 0-40 ° C durante 0,5-40 horas con agitación suave, y luego se eliminó el agente reductor mediante columna o ultrafiltración. Al anticuerpo parcialmente reducido, 0,5-50 mg / ml, en un cierto tampón a pH 5,0-9,0, como PBS, con 0-30% de cosolvente orgánico tal como DMA, se le añadieron 0,5-10 eq del ligador de fármaco activado que albergaba una funcionalidad dibromo o dicloro. La reacción se llevó a cabo a 0-40 ° C durante 0,5-40 horas con agitación suave, controlada por HIC-HPLC. El producto de ADC crudo resultante se sometió a etapas posteriores de desalinización, cambios / formulación de tampón y, opcionalmente, purificación, utilizando los procedimientos más modernos. El producto final de ADC se caracterizó mediante HIC-HPLC, SEC, RP-HPLC y opcionalmente LC-MS. El DAR promedio se calculó por absorción UV y / o espectroscopia MS.

- Trastuzumab y el compuesto 34 se combinaron en varias proporciones fármaco / anticuerpo según lo descrito en el Procedimiento General de Conjugación. Trastuzumab se incubó con una solución madre de TCEP 10 mM a 37 ° C durante 0,5 a 40 horas. Después de la reducción, el exceso de TCEP se eliminó mediante una columna de filtración en gel. El trastuzumab reducido se mezcló luego con el compuesto 34 en un rango de intervalo de fármaco / anticuerpo de 1 a 10 a 0 a 40 ° C. Después de la reacción durante la noche, se eliminó el exceso de compuesto 34 del conjugado de Trastuzumab-c-34 mediante una columna de filtración en gel. Los conjugados purificados de Trastuzumab-c-34 se almacenaron a una temperatura de 4 a -20 ° C y se utilizarán para pruebas in vitro e in vivo.

- El producto de la reacción de conjugación se analizó usando HIC-HPLC en condiciones: Columna HPLC: TSKgel Butyl-NPR de Tosoh, 4,6 mm x 3,5 cm, 2,5 mm; Tampón A: fosfato de sodio 20 mM, sulfato de amonio 1,5 M, pH 7,0; Tampón B: fosfato de sodio 20 mM, 25% v / v de isopronal, pH 7,0; caudal: 1 ml / min; Gradiente: 10 min 10% de tampón B a 80% de tampón B, 4 min 100% de tampón B; Muestra de 20 µL.

La Figura 1 muestra el producto del cromatograma de HIC-HPLC de hacer reaccionar el fármaco y el anticuerpo en una proporción fármaco / anticuerpo de 5,5: 1, donde DAR representa el número de fármacos conjugados por anticuerpo. La Figura 2 muestra el producto del cromatograma de HIC-HPLC de hacer reaccionar el fármaco y el anticuerpo en una proporción fármaco / anticuerpo de 6: 1, donde DAR representa el número de fármacos conjugados por anticuerpo. La Figura 3 muestra el producto del cromatograma de HIC-HPLC de hacer reaccionar el fármaco y el anticuerpo en una proporción fármaco / anticuerpo de 1: 6,5, donde DAR representa el número de fármacos conjugados por anticuerpo. La Figura 4 muestra el producto del cromatograma de HIC-HPLC de hacer reaccionar el fármaco y el anticuerpo en una proporción fármaco / anticuerpo de 1: 4, donde DAR representa el número de fármacos conjugados por anticuerpo. En el recuadro, la Figura 4 muestra además los cromatogramas de HIC-HPLC para fracciones aisladas individualmente de picos de DAR 1, DAR 2, DAR 3, DAR 4 y DAR 5 purificados usando FPLC. La Figura 5 muestra los cromatogramas de HIC-HPLC para cada fracción de FPLC y, en un recuadro, una superposición de los picos para demostrar la pureza relativa de cada pico.

Las fracciones purificadas representadas en las Figuras 4 y 5 se analizaron adicionalmente mediante SDS-PAGE reductora. Las muestras de ADC se redujeron con DTT 20 mM y se cargaron en un gel Bis-Tris NuPAGE al 4-12% (Life Technology). Los resultados se muestran en la Figura 6, donde las abreviaturas son las siguientes:

- H-Cadena pesada del anticuerpo
- L-Cadena ligera del anticuerpo
- HH-Dímero de cadenas pesadas
- HL-Dímero de cadenas pesada y ligera
- HHL-Trímero de cadenas pesada-pesada y ligera
- IgG-Tetrámero de dos cadenas pesadas-dos cadenas ligeras

#### Experimento de citotoxicidad in vitro

Los conjugados farmacológicos de anticuerpos se analizaron para determinar la citotoxicidad. Las líneas celulares utilizadas fueron el adenocarcinoma de mama humano SK-BR-3 (HER2 triple positivo), el carcinoma ductal humano HCC1954 (HER2 triple positivo). Estas células estaban disponibles en la ATCC. Las células SK-BR-3 se cultivaron en medio 5A de McCoy (Caisson Labs, North Logan, UT) suplementado con suero bovino fetal al 10%. Las células HCC1954 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Caisson Labs, North Logan, UT) suplementado con suero bovino fetal al 10%. Las células SK-BR-3 se colocaron en placas de 96 pocillos a aproximadamente 7.500 células / pocillo, y las células HCC1954 se colocaron en placas de 96 pocillos a aproximadamente 20.000 células / pocillo. Los conjugados anticuerpo-fármaco se añadieron por duplicado en el mismo día. Después de 72 horas de incubación a 37 ° C, se añadieron CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI) y se determinó la viabilidad celular como se describe en el protocolo del fabricante. El porcentaje de viabilidad se determinó de la siguiente manera:

% De viabilidad = valor de luminiscencia promedio de los duplicados (pocillos tratados) / valor de luminiscencia promedio de los pocillos sin tratar

La Figura 7 muestra la viabilidad de las células SK-BR-3 para siete muestras, ADC\_C1 (DAR1 de las Figuras 4 y 5), ADC\_C2 (DAR2 de las Figuras 4 y 5), ADC\_C3 (DAR3 de las Figuras 4 y 5), ADC\_C4 (DAR4 de las Figuras 4 y 5), ADC\_5 (DAR5 de las Figuras 4 y 5), SeaGen (ADC preparado siguiendo el método publicado de Seattle Genetics) y T-DM1 (ADC preparado siguiendo el método publicado de Immunogen).

La Figura 8 muestra la viabilidad de las células HCC1954 para siete muestras, ADC\_C1 (DAR1 de las Figuras 4 y 5), ADC\_C2 (DAR2 de las Figuras 4 y 5), ADC\_C3 (DAR3 de las Figuras 4 y 5), ADC\_C4 (DAR4 de las Figuras 4 y 5), ADC\_C5 (DAR5 de las Figuras 4 y 5), ADC\_VC-M (MAE se preparó siguiendo el método publicado de Seattle Genetics), y T-DM1 (ADC preparado siguiendo el método publicado de Immunogen).

La Figura 10 muestra la viabilidad de las células SK-BR-3 para cuatro muestras, tanto ADC\_C6 (DAR2.4) como ADC\_C7 (DAR3.1) se prepararon usando el Procedimiento general de conjugación y se purificaron mediante una columna de filtración en gel. SeaGen (ADC preparado siguiendo el método publicado de Seattle Genetics), y T-DM1 (ADC preparado siguiendo el método publicado de Immunogen).

La Figura 11 muestra la viabilidad de las células HCC1954 para cuatro muestras, ADC\_C6 (DAR2.4 de la Figura 10), ADC\_C7 (DAR3.1 de la Figura 10), ADC\_VC-M (MAE se preparó siguiendo el método publicado de Seattle Genetics) y T-DM1 (ADC preparado siguiendo el método Inmunógeno publicado).

#### Conjugación anticuerpo-fármaco

Trastuzumab y el compuesto 42 se combinaron en varias proporciones de fármaco / anticuerpo en condiciones en las que se incubó Trastuzumab con solución madre de TCEP 10 mM a 37 ° C durante 0,5 a 40 horas. Después de la reducción, el exceso de TCEP se eliminó mediante una columna de filtración en gel. El Trastuzumab reducido se

mezcló luego con el compuesto 42 en un rango de proporción fármaco / anticuerpo de 1 a 10 a 0 a 40 ° C. Después de la reacción durante la noche, se eliminó el exceso de compuesto 42 del conjugado de Trastuzumab-c-34 mediante una columna de filtración en gel. Los conjugados purificados de Trastuzumab-c-42 se almacenaron a 4 a -20 ° C y se utilizaron para pruebas in vitro e in vivo.

- 5 Trastuzumab y el compuesto 40 se combinaron en varias proporciones de fármaco / anticuerpo en condiciones en las que se incubó Trastuzumab con solución madre de TCEP 10 mM a 37 ° C durante 0,5 a 40 horas. Después de la reducción, el exceso de TCEP se eliminó mediante una columna de filtración en gel. El Trastuzumab reducido se mezcló luego con el compuesto 40 en un rango de proporción fármaco / anticuerpo de 1 a 10 a 0 a 40 ° C. Después de la reacción durante la noche, se eliminó el exceso de compuesto 40 del conjugado de Trastuzumab-c-34 mediante una columna de filtración en gel. Los conjugados purificados de Trastuzumab-c-40 se almacenaron a una temperatura de 4 a -20 ° C y se usaron para pruebas in vitro e in vivo.

El producto de la reacción de conjugación se analizó utilizando SDS-PAGE reductora. Las muestras de ADC se redujeron con DTT 20 mM y se cargaron en un gel Bis-Tris NuPAGE al 4-12% (Life Technology). Los resultados se muestran en la Figura 9, donde las abreviaturas son las siguientes:

- 15 H-Cadena pesada del anticuerpo  
 L + vc-MMAE- cadena ligera del anticuerpo-vc-MMAE  
 L-Cadena ligera del anticuerpo  
 HH-Dímero de cadenas pesadas  
 HL-Dímero de cadenas pesada y ligera
- 20 HHL-Trímero de cadenas pesada-pesada y ligera  
 IgG-Tetrámero de dos cadenas pesadas-dos cadenas ligeras  
 cL-Duo3: Conjugado Trastuzumab - compuesto 42  
 cL-Duo6: Conjugado Trastuzumab - compuesto 40

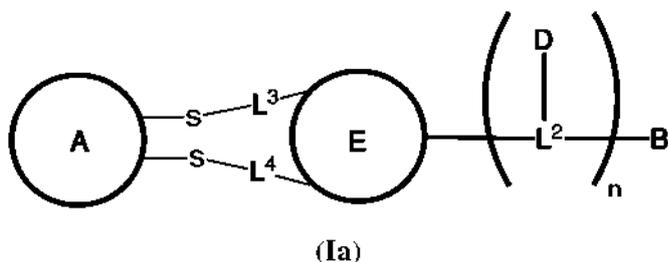
Experimento de citotoxicidad in vitro

- 25 Los conjugados Trastuzumab - compuesto 42 y Trastuzumab - compuesto 42 fueron los analizados para la citotoxicidad. Los métodos de citotoxicidad se realizaron como se describió anteriormente.

- 30 La Figura 12 muestra la viabilidad de las células SK-BR-3 para cuatro muestras, Trastuzumab-c-Duo3 (conjugado de Trastuzumab-compuesto 42), Trastuzumab-c-Duo6 (conjugado de Trastuzumab-compuesto 40), Trastuzumab-vc-MMAE (preparado siguiendo el método publicado de Seattle Genetics), y Trastuzumab-c-MMAE (conjugado de Trastuzumab-compuesto 34, preparado siguiendo el método publicado de Seattle Genetics).

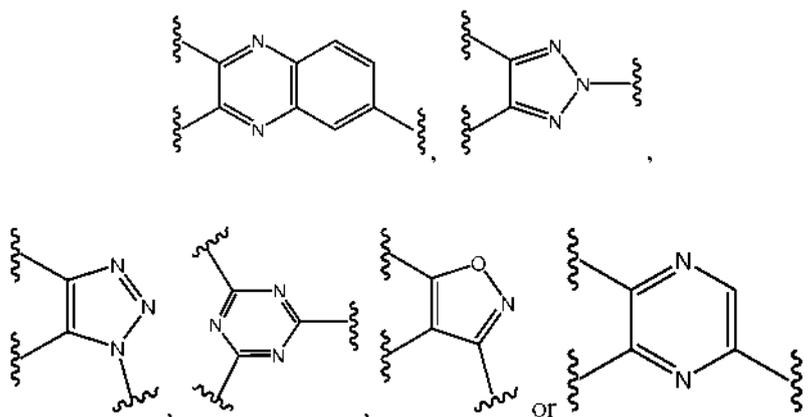
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de agente activo que tiene la estructura de Fórmula Ia:



donde:

- 5 el componente A es un resto de selección del objetivo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal (mAB), un fragmento de anticuerpo, un ligando proteico, un armazón proteico y un péptido;  
 el componente E se selecciona del grupo que consiste en



- 10  $L^3$  es un alquilo  $C_1-C_6$  opcionalmente sustituido, o  $L^3$  es nulo, cuando  $L^3$  es nulo el azufre está unido directamente al componente E; y

$L^4$  es un alquilo  $C_1-C_6$  opcionalmente sustituido, o  $L^4$  es nulo, cuando  $L^4$  es nulo, el azufre está directamente conectado al componente E

B es un resto auxiliar que opcionalmente es un segundo resto de selección del objetivo seleccionado del grupo que consiste en:

- 15 un polímero hidrófilo tal como PEG, un polímero biodegradable tal como proteínas no estructuradas, poliaminoácidos, polipéptidos, polisacáridos y combinaciones de los mismos, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un ligando proteico, un armazón proteico, un péptido, un ARN / ADN o un fragmento del mismo, o B es nulo;

cada  $L^2$  es independientemente un ligador, en el que al menos un  $L^2$  está unido a E;

- 20 cada D se selecciona de forma independiente, donde cada D incluye un agente activo seleccionado del grupo que consiste en:

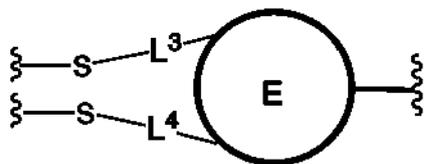
un fármaco de quimioterapia, una molécula de unión a tubulina, un agente alquilante de ADN, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de ADN topoisomerasa, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de proteasoma, un péptido, un siARN, un ADN antisentido, epotilona A, epotilona B y paclitaxel; y

- 25 n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

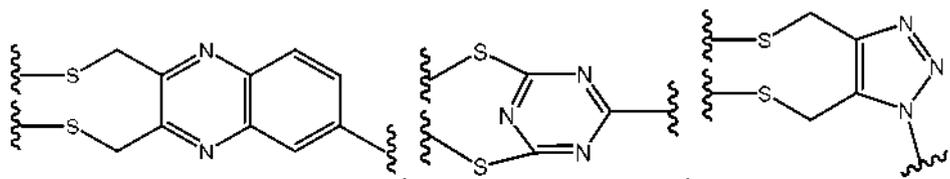
2. El conjugado de agente activo de la reivindicación 1, en el que  $L^3$  es  $-(CH_2)-$ ; y  $L^4$  es  $-(CH_2)-$ .

3. El conjugado de agente activo de la reivindicación 1, en el que  $L^3$  es nulo; y  $L^4$  es nulo.

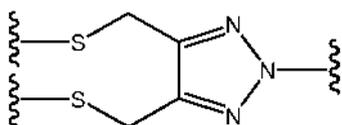
4. El conjugado de agente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:



se selecciona del grupo que consiste en:



o



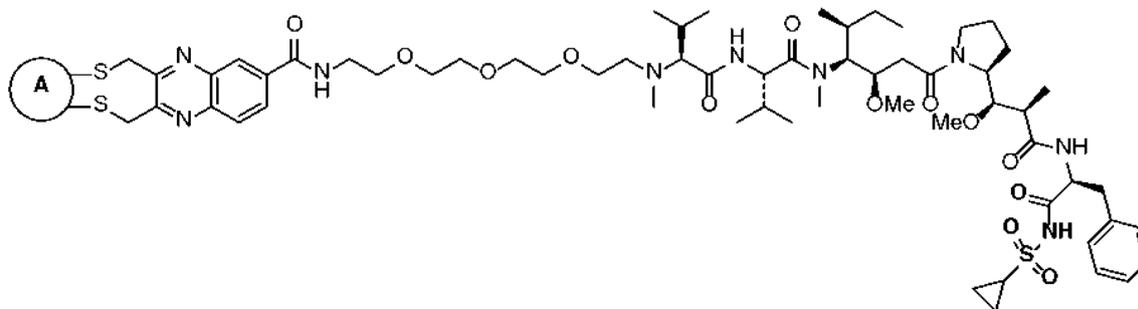
5

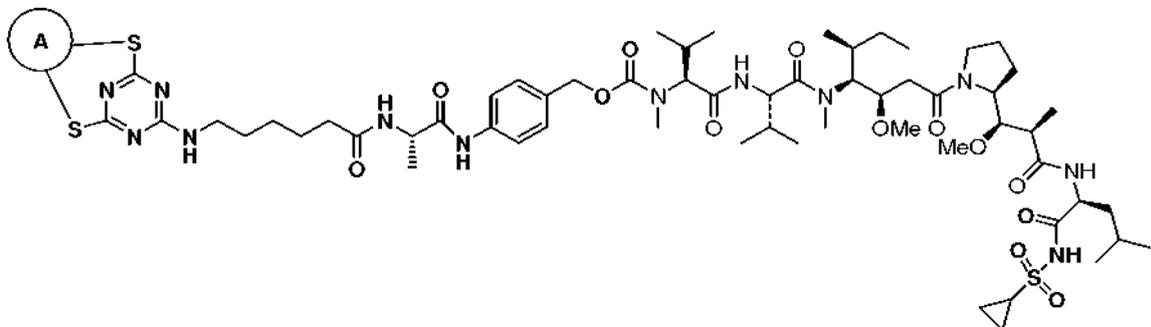
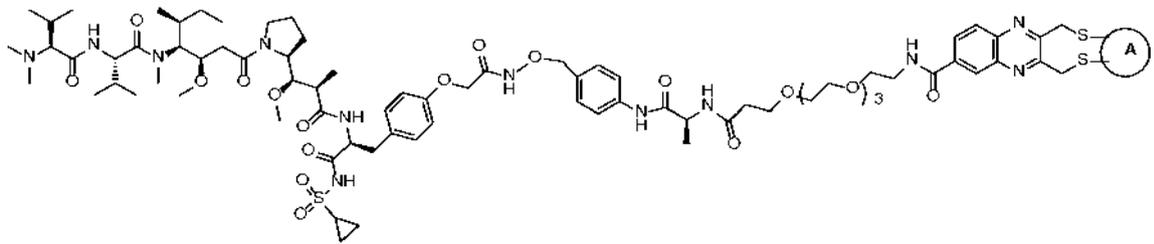
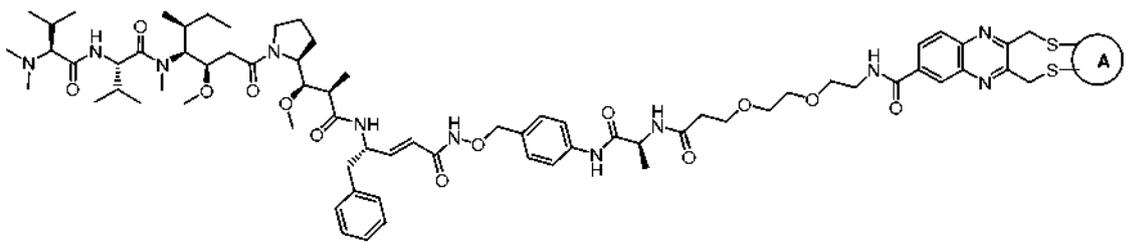
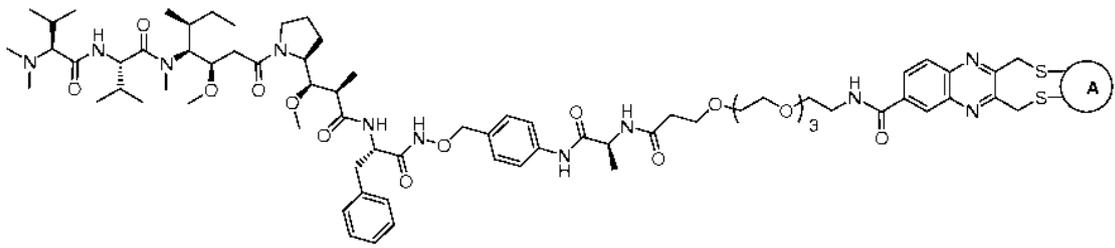
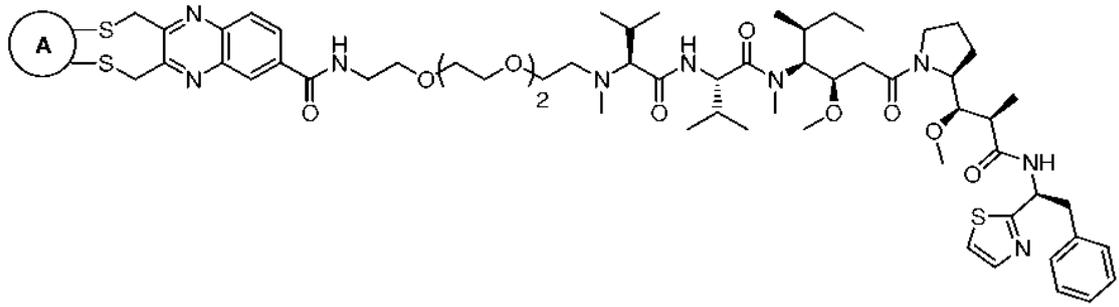
5. El conjugado de agente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho agente activo se selecciona independientemente del grupo que consiste en una molécula de unión a tubulina, un agente alquilante de ADN y un péptido.

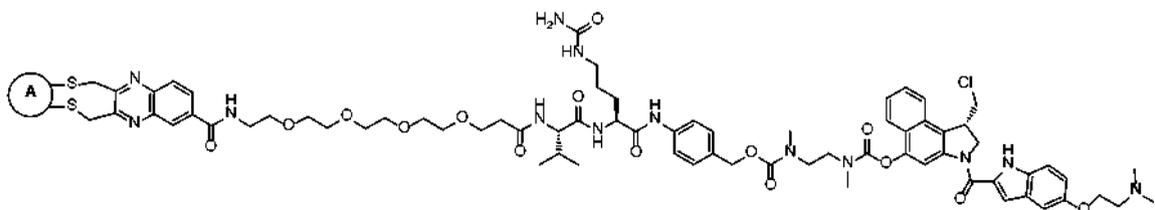
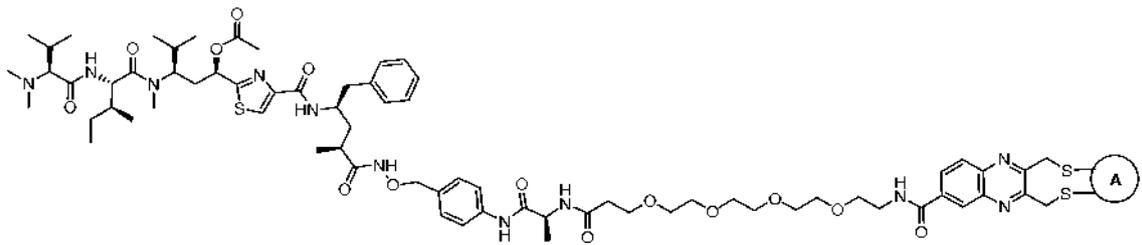
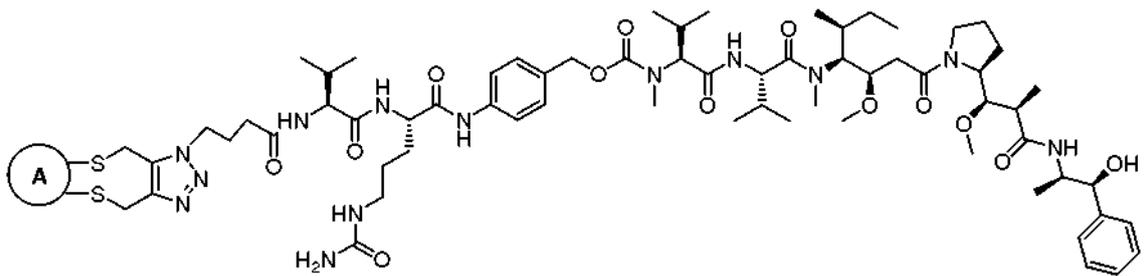
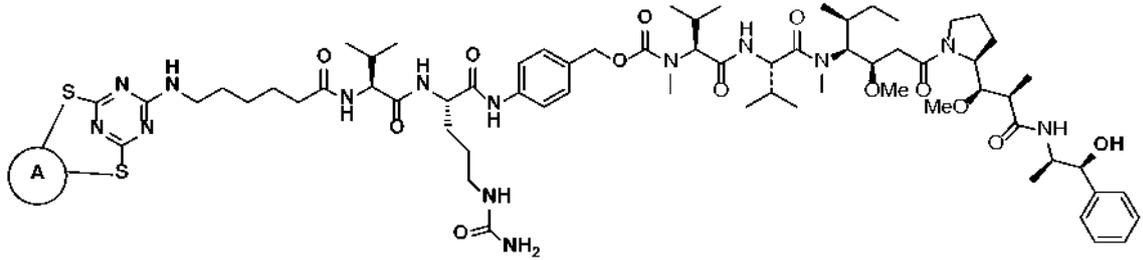
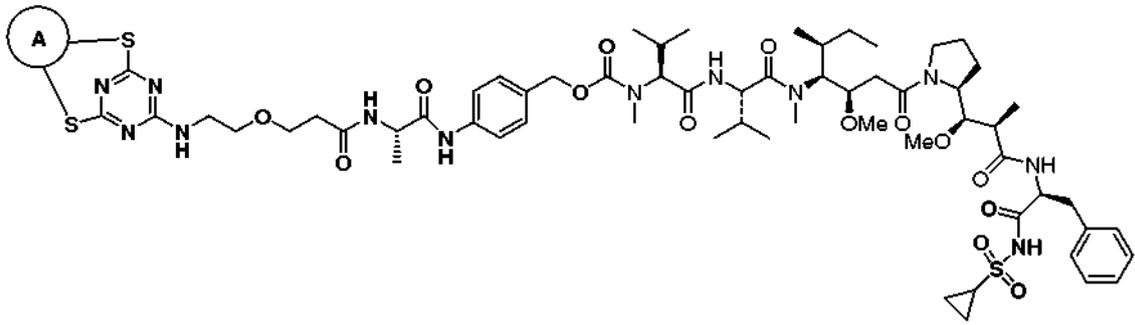
6. El conjugado de agente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos un L<sup>2</sup> se selecciona de un grupo que consiste en péptido, oligosacárido, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB, PAB, o combinaciones de los mismos, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

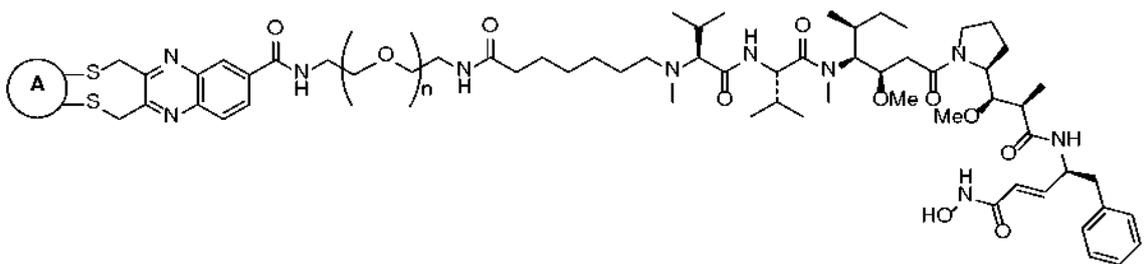
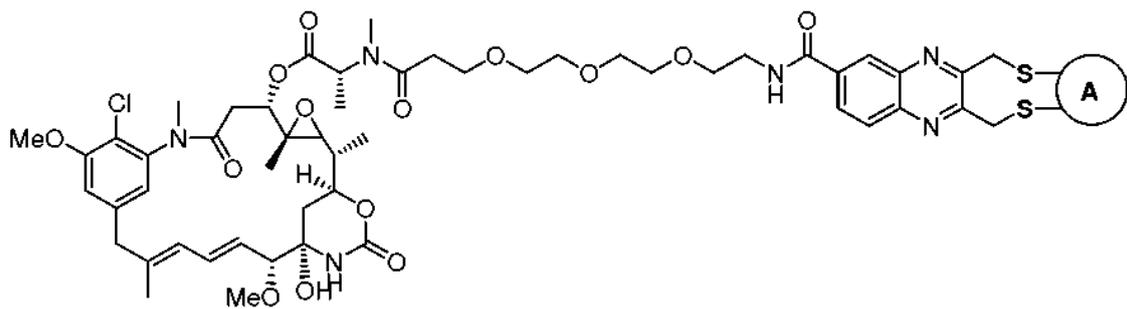
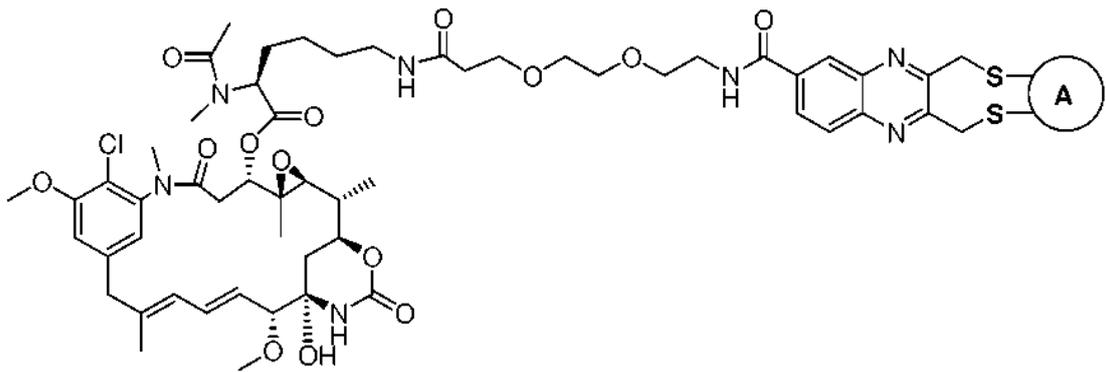
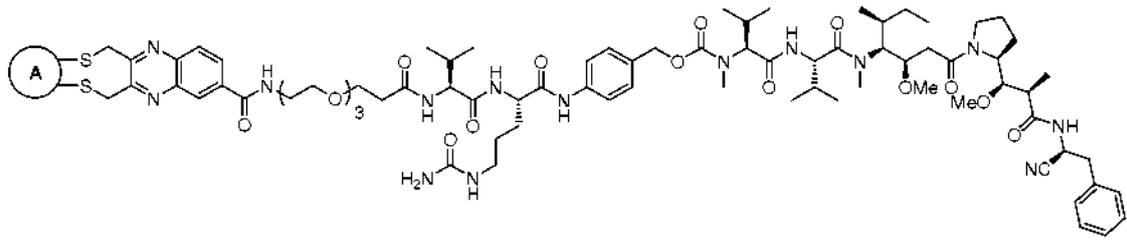
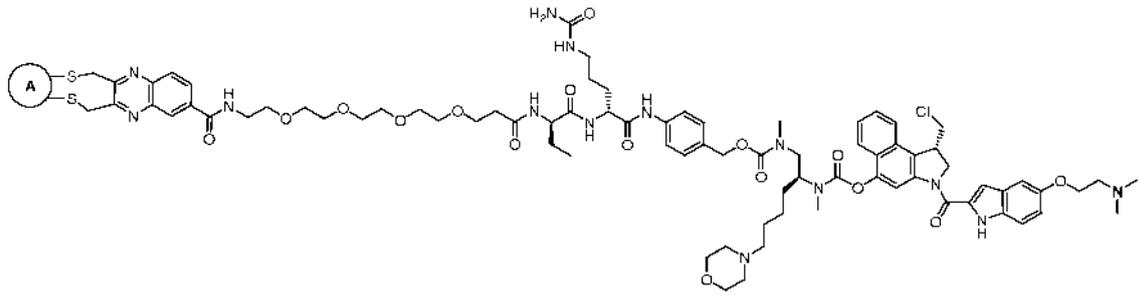
7. El conjugado de agente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que cada L<sup>2</sup> se selecciona de un grupo que consiste en péptido, oligosacárido, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB, PAB, o combinaciones de los mismos, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

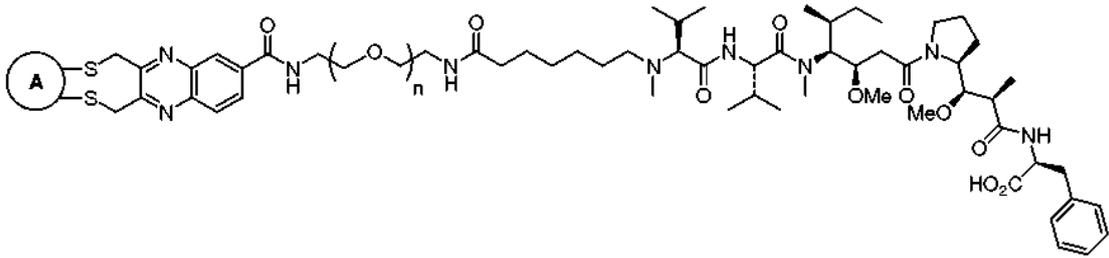
8. El conjugado de agente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la estructura de Fórmula la tiene la estructura seleccionada del grupo que consiste en:



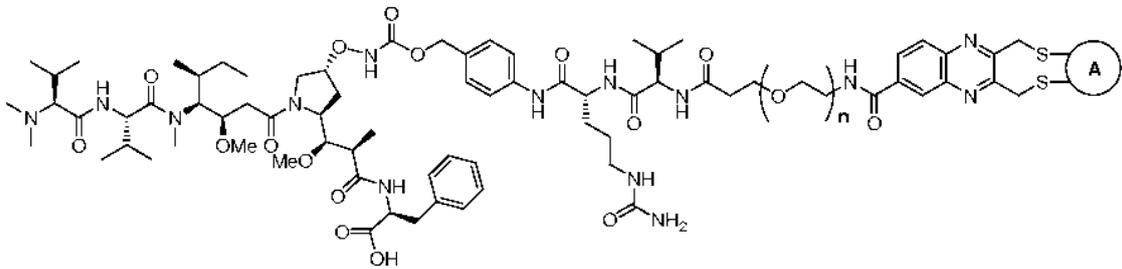








y



en donde n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

- 5 9. El conjugado de agente activo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el componente A comprende al menos un residuo de L-alanina modificado.
10. Una composición que comprende un conjugado de agente activo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

DAD1 E, Sig = 280,10 Ref = 360,100 (CBC \ 13051002.D)

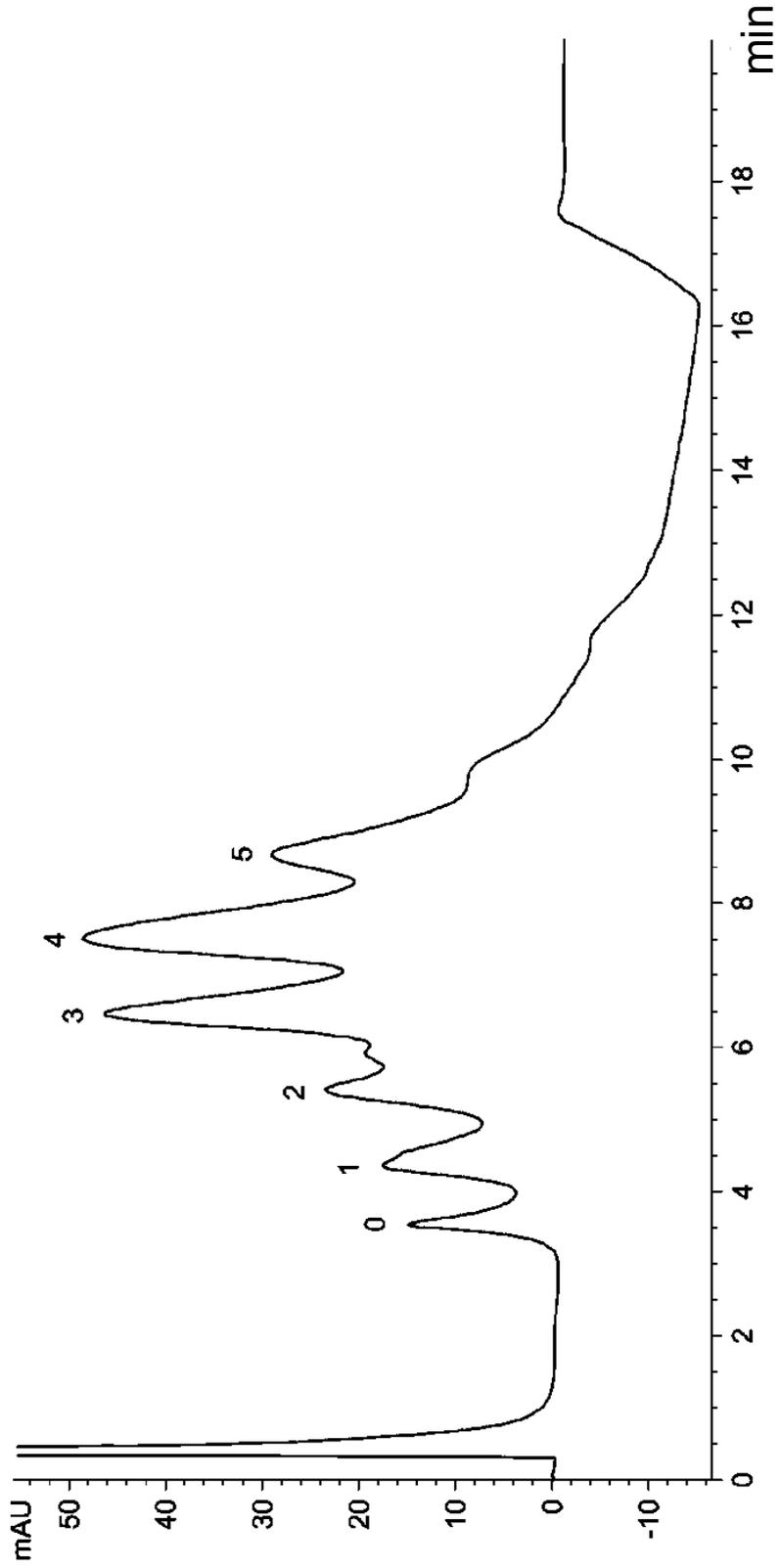


FIG. 1

DAD1 E, Sig = 280,16 Ref = 360,100 (CBC \ 130505 \ 1305056.D)

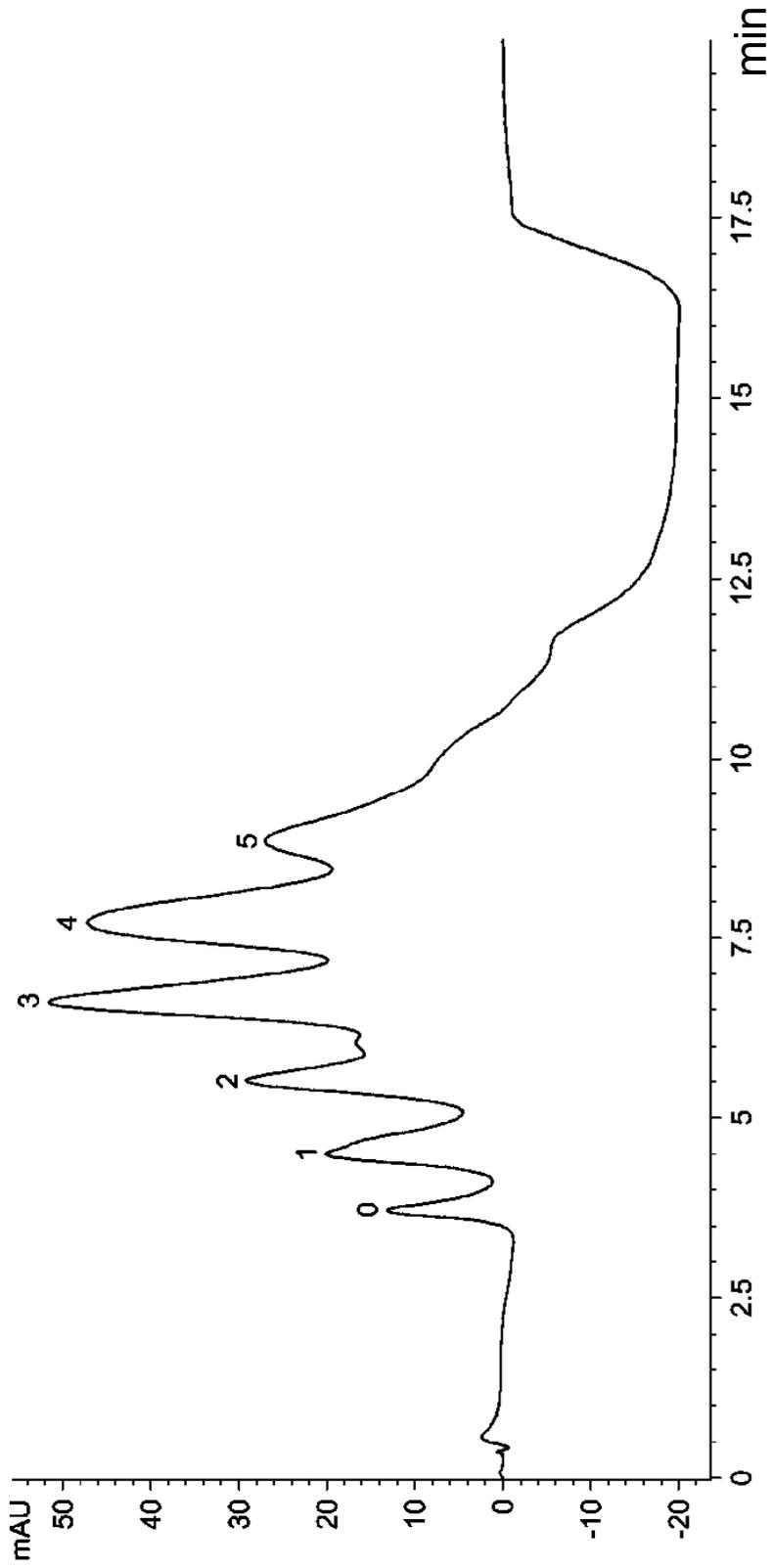


FIG. 2

DAD1 E, Sig = 280,16 Ref = 360,100 (CBC \ 13051003.D)

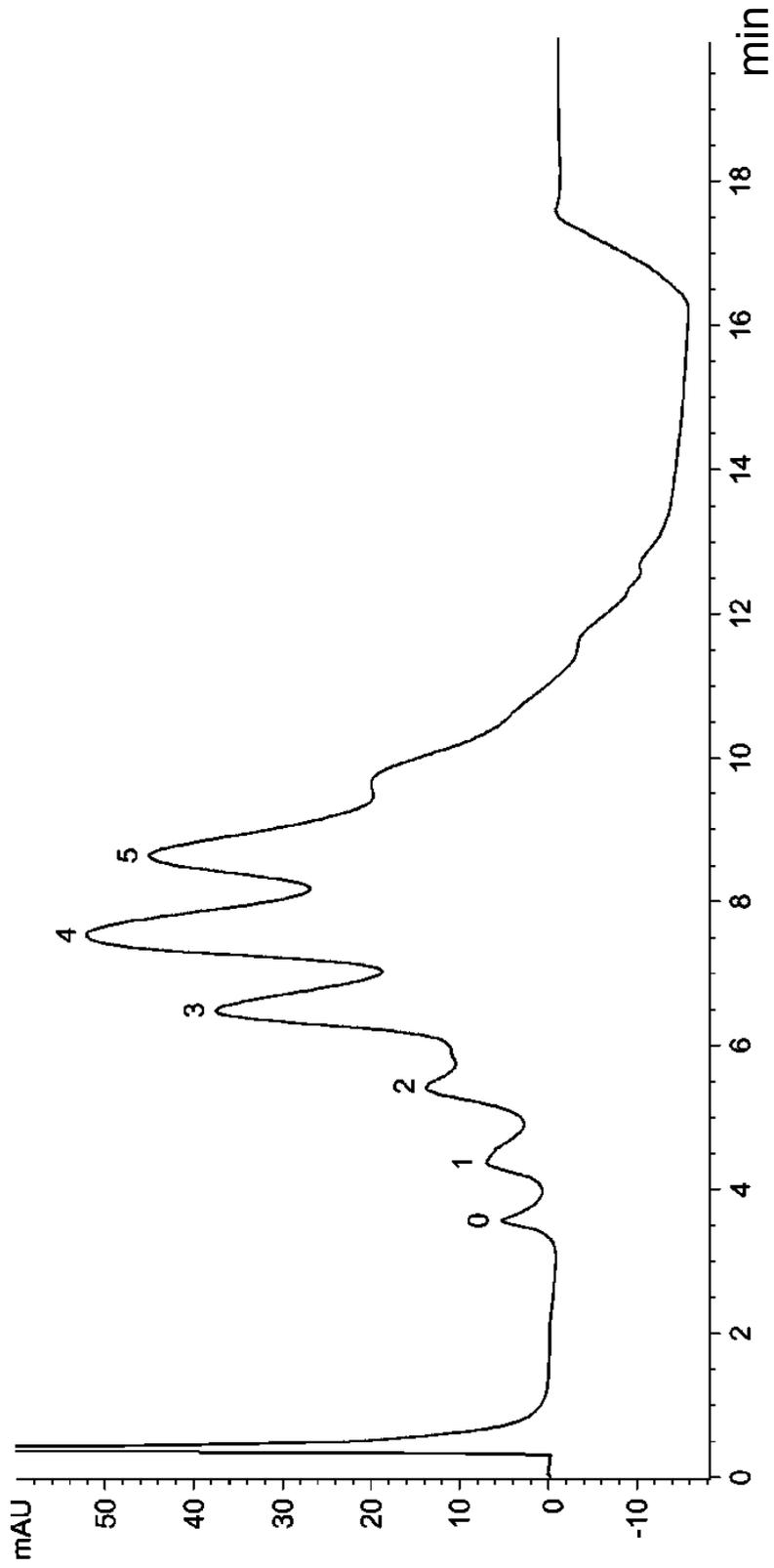


FIG. 3

- DAD1 E, Sig = 280,16 Ref = 360,100 (CBC || 130509 || 21C00008.D)
- DAD1 E, Sig = 280,16 Ref = 360,100 (CBC || 130509 || 21C00010.D)
- DAD1 E, Sig = 280,16 Ref = 360,100 (CBC || 130509 || 21C00012.D)
- DAD1 E, Sig = 280,16 Ref = 360,100 (CBC || 130509 || 21C00014.D)
- DAD1 E, Sig = 280,16 Ref = 360,100 (CBC || 130505 || 13050505.D)
- DAD1 E, Sig = 280,16 Ref = 360,100 (CBC || 130507 || 13050722.D)

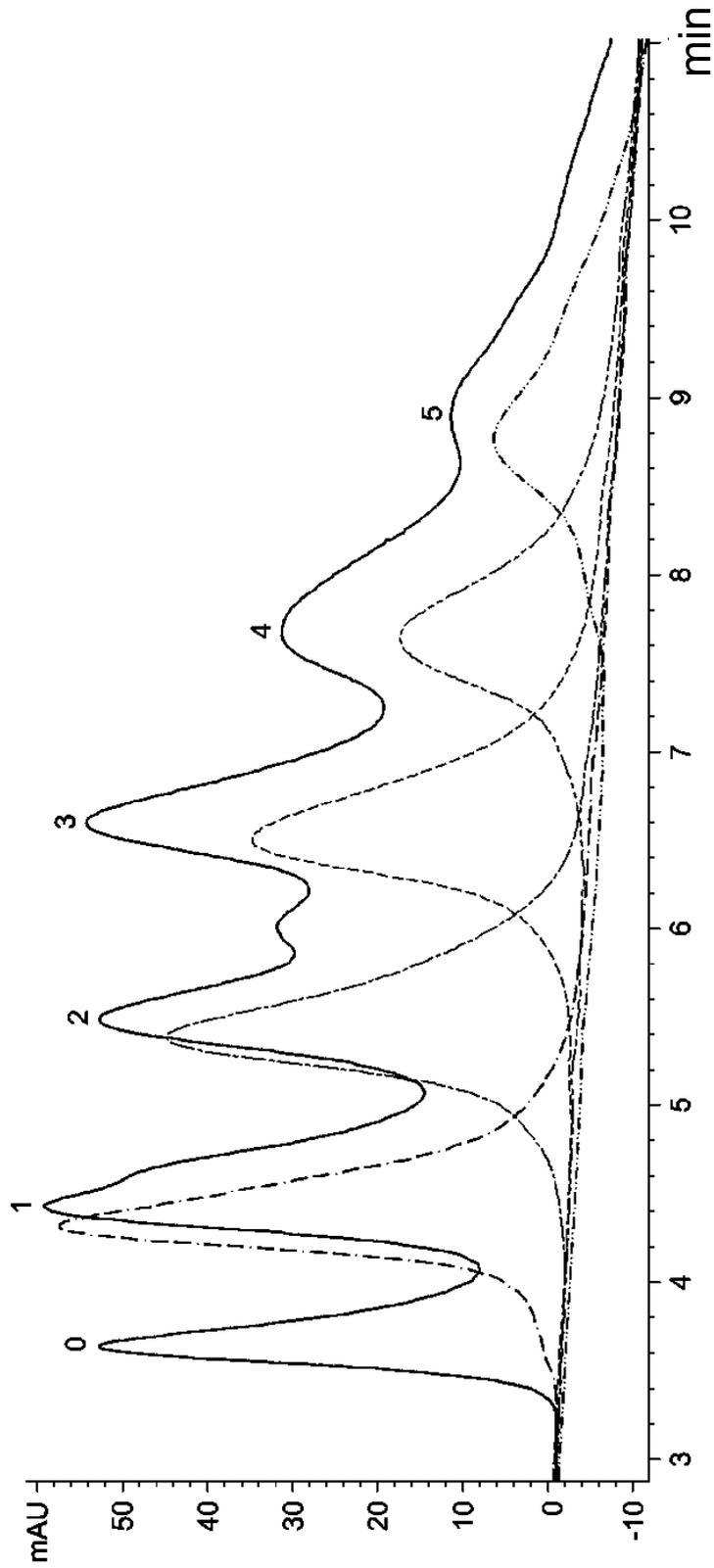


FIG. 4

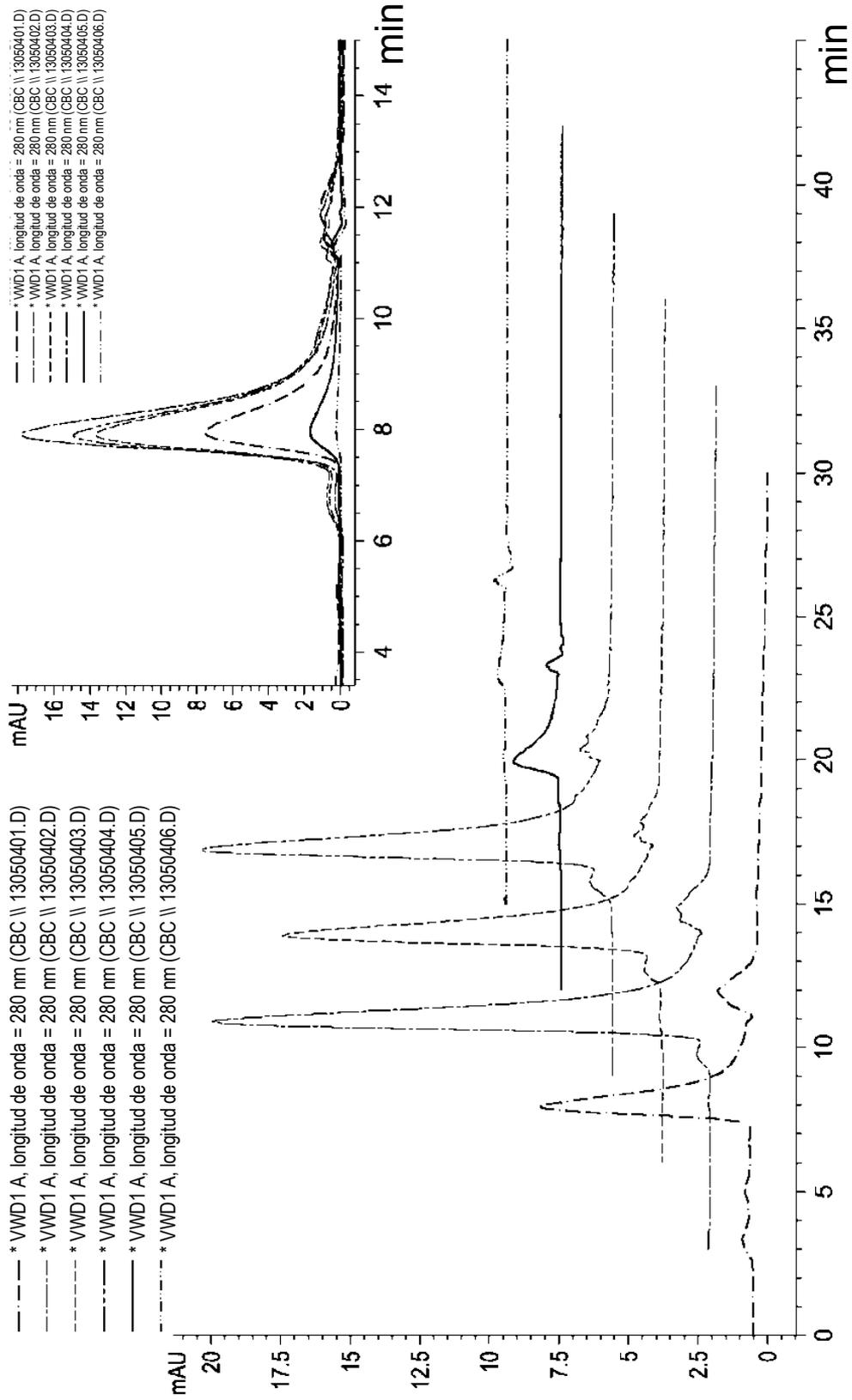


FIG. 5

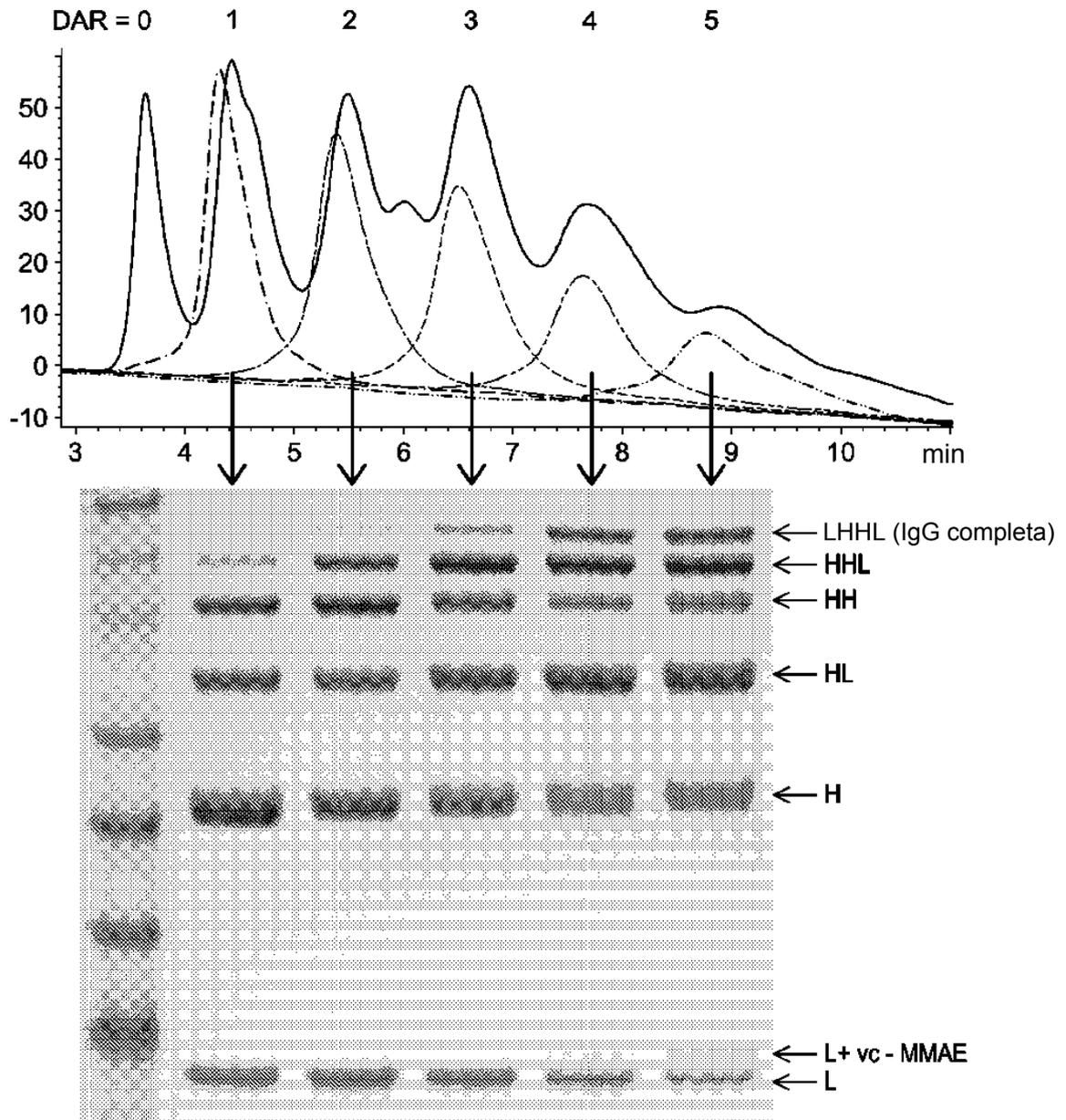


FIG. 6

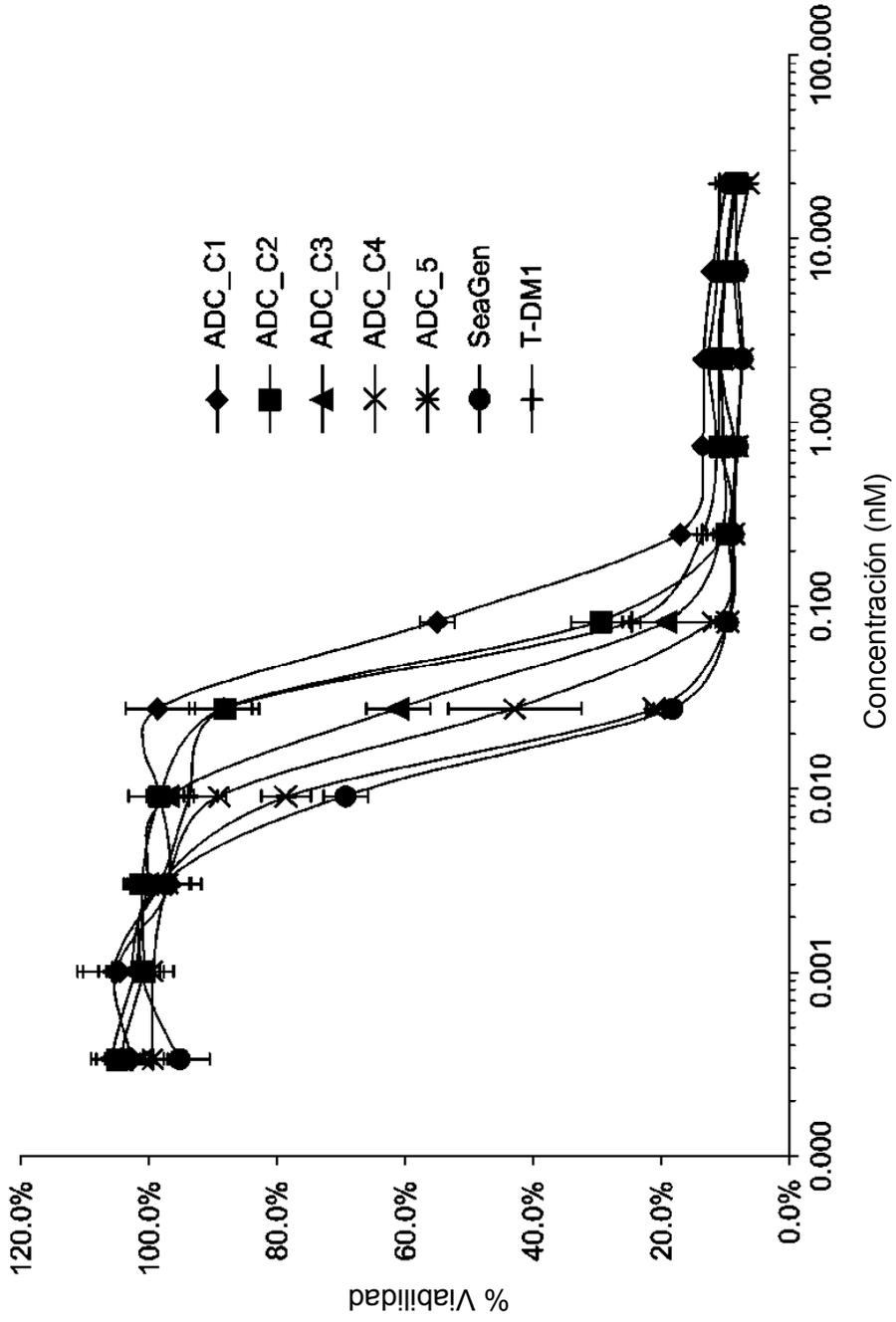


FIG. 7

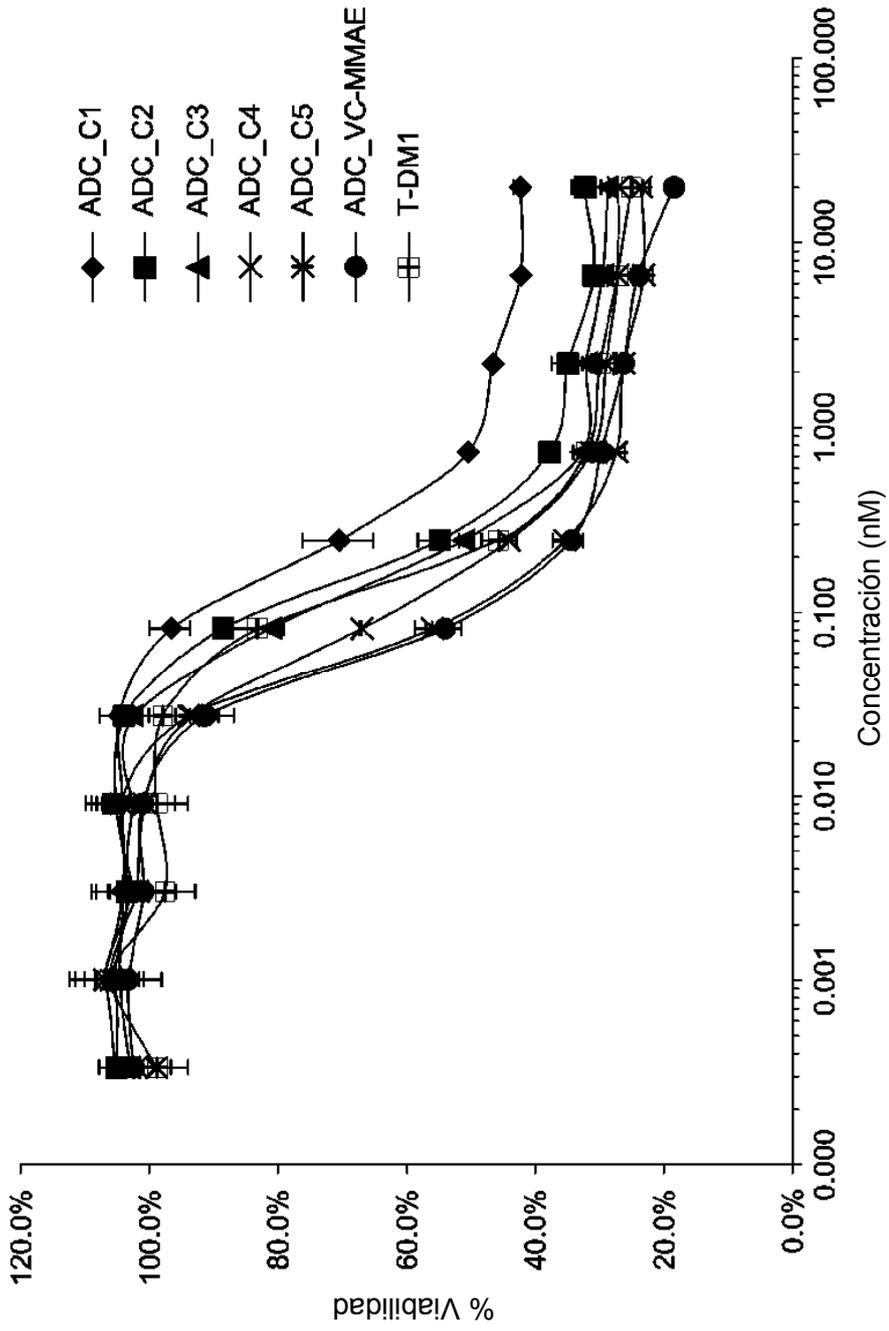


FIG. 8

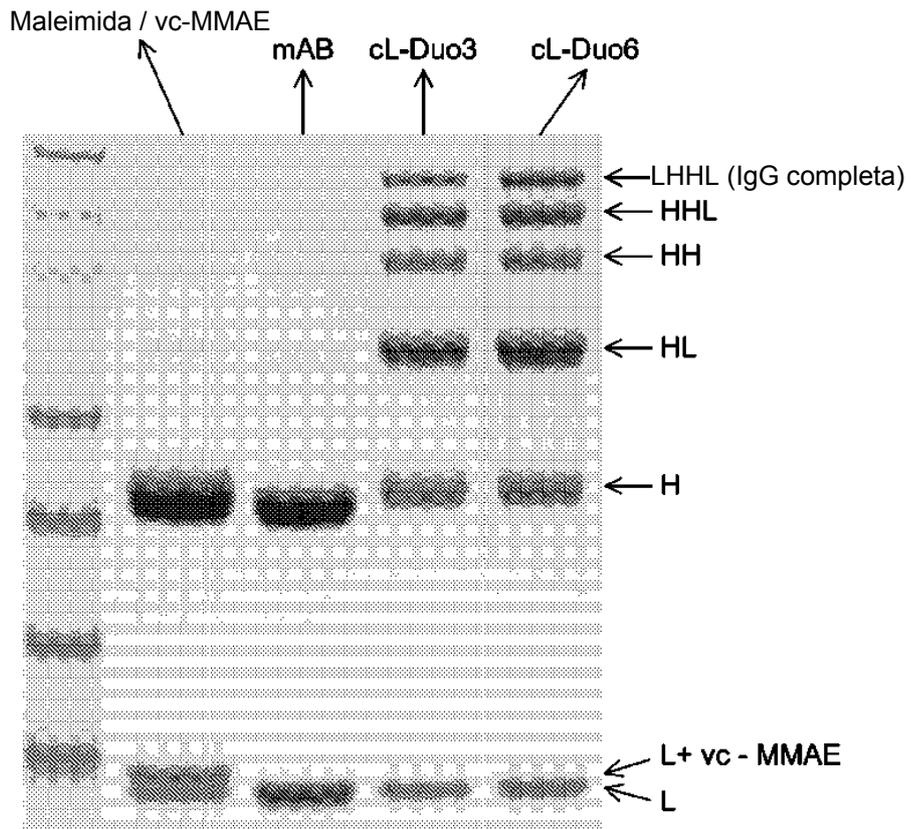


FIG. 9

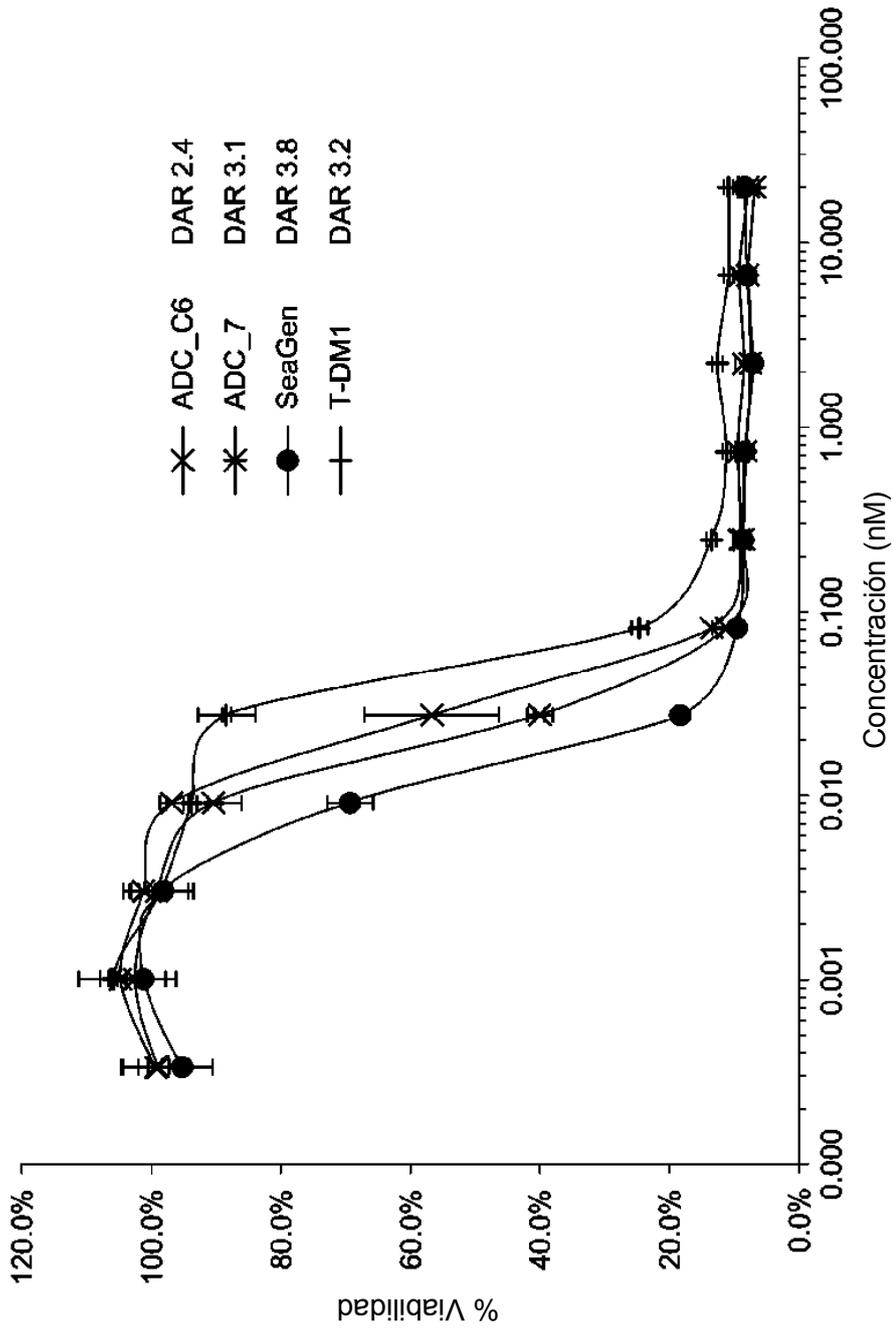


FIG. 10

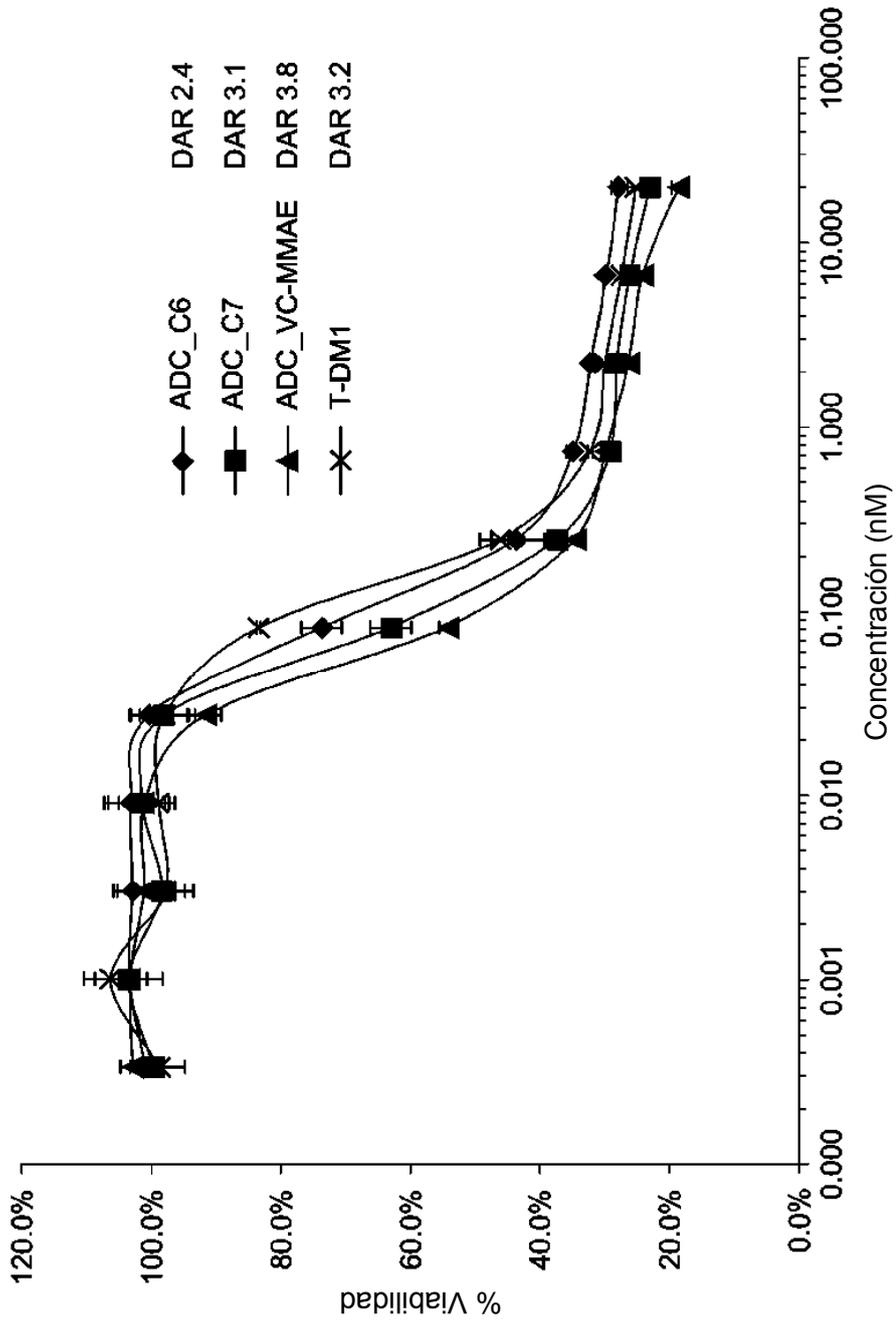


FIG. 11

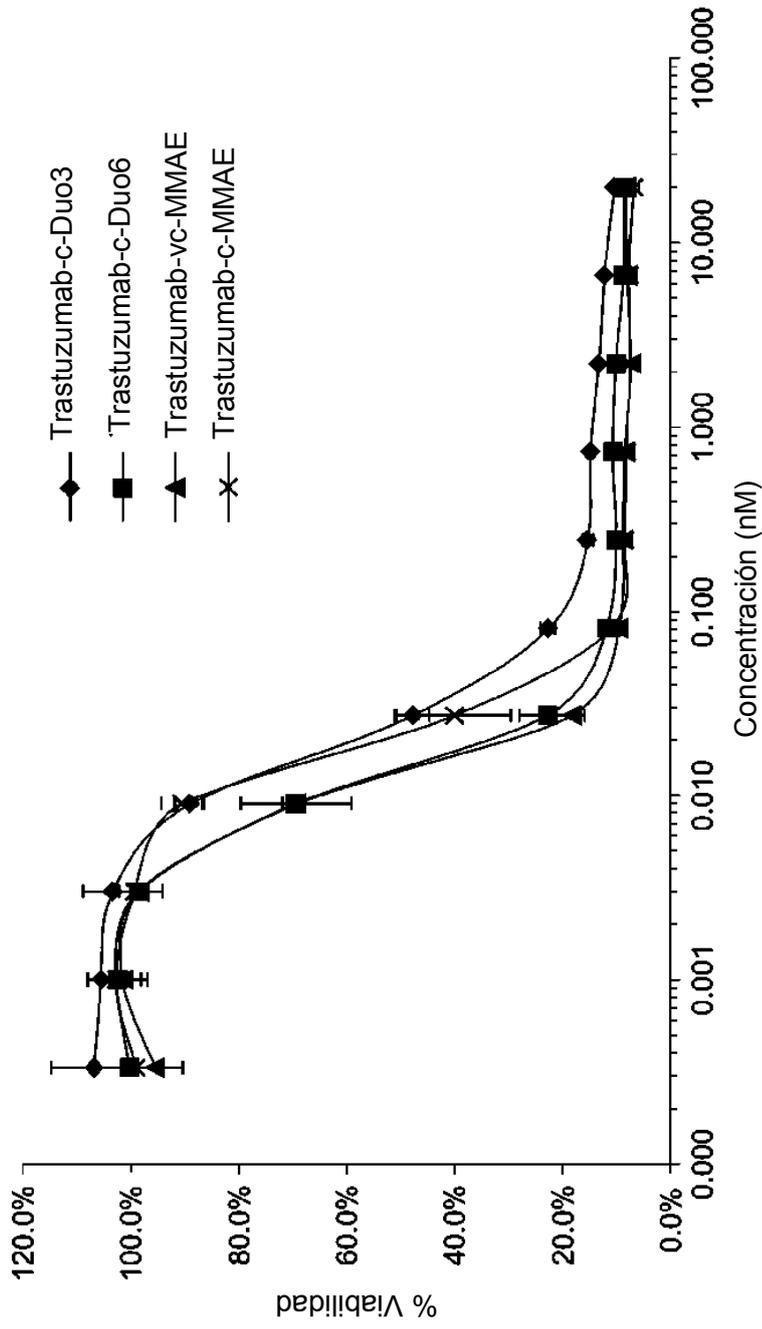


FIG. 12