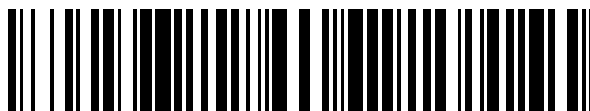


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 598**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

A61K 38/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2015** **PCT/US2015/032126**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015** **WO15179734**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2015** **E 15727792 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020** **EP 3145552**

54 Título: **Métodos para preparar conjugados a partir de proteínas que contienen disulfuro**

30 Prioridad:

23.05.2014 US 201462002585 P

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

11.11.2020

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

HU, QI-YING y

ALLAN, MARTIN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 792 598 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para preparar conjugados a partir de proteínas que contienen disulfuro

5 Antecedentes

10 Se ha adherido covalentemente una amplia diversidad de restos químicos ("cargas") a enzimas, anticuerpos y otros polipéptidos o proteínas, para formar conjugados. Las cargas se pueden utilizar para ubicar la proteína a la que están adheridas (por ejemplo, etiquetas), para modificar las propiedades fisicoquímicas o la estabilidad de la proteína (por ejemplo, PEGilación), para posibilitar que la proteína se adhiera a otra molécula o proteína (grupos de acoplamiento o funcionales, para conectar el conjugado a otro compuesto u otro conjugado) o para modificar la función o actividad de la carga o la proteína (por ejemplo, conjugados de vacunas). La proteína también puede actuar como un portador para suministrar la carga adherida a un tejido o tipo celular particular, tal como en conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés). Las clases de cargas que se pueden unir de forma útil a proteínas incluyen restos detectables (etiquetas), restos de anclaje para adherir la proteína a una superficie u otro compuesto, antígenos que provocan una respuesta inmunitaria cuando se conjugan con una proteína, grupos de acoplamiento que reaccionan fácilmente con un compañero de acoplamiento complementario desde un punto de vista químico (y conecta de este modo la proteína a otra entidad) y restos terapéuticos tales como citotoxinas y otros agentes bioactivos.

20 La adhesión de estas diversas estructuras a proteínas de una manera controlada y reproducible a menudo es crucial para que los conjugados funcionen correctamente, especialmente cuando se utilizan como agentes terapéuticos. En los ADC, por ejemplo, es importante controlar con cuidado el número de compuestos de carga adheridos a un anticuerpo, lo que no es fácil ya que el portador es una proteína grande y compleja. Por ejemplo, dependiendo de la diana, conector y citoxina particulares, la DAR (siglas en inglés de relación entre fármaco y anticuerpo) óptima para un ADC puede variar de 1 a 6 o más, con el fin de cuadrar factores tales como la eficacia, estabilidad y seguridad. Si los ADC se preparan como mezclas con relaciones fármaco/anticuerpo (DAR) variables, la separación es difícil, y la uniformidad del producto es importante tanto por razones terapéuticas como reguladoras. Por lo tanto, se necesitan métodos para producir ADC con un buen control de las relaciones fármaco-anticuerpo, así como también una conjugación eficaz y colocación uniforme del punto de unión de la carga.

30 Se han desarrollado varios métodos para adherir cargas a proteínas para resolver algunos de estos problemas. Véase, por ejemplo, Sletten, E. M. y Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974 - 6998; Basle', E.; Joubert, N.; Pucheault, M. *Chemistry & Biology* **2010**, *17*, 213-227; y Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, 2.^a ed.; Academic Press: San Diego, CA, 2008. Los métodos más habituales de conjugación dependen de la reactividad química de determinados aminoácidos que existen de forma natural en muchas proteínas naturales: a menudo se utilizan lisina y cisteína porque proporcionan un sitio reactivo para conectar la carga a la proteína. Sin embargo, las proteínas a menudo tienen más lisinas que el número óptimo de cargas que se van a unir: la adición de suficientes restos de carga para ocupar todas las lisinas disponibles con el fin de producir un producto homogéneo y uniforme puede añadir demasiadas moléculas de carga para una eficacia óptima, mientras que una adición parcial de cargas proporciona normalmente un producto heterogéneo, lo que puede ser problemático por diversas razones, en el caso de Mylotarg™, el primer ADC comercializado, por ejemplo, parece probable que heterogeneidad del producto ADC haya contribuido a problemas que condujeron a la decisión de retirar el producto del registro. Fuenmayor, et al., *Cancers*, vol. 3, 3370-93 (2011).

45 La frecuencia de aparición de cisteínas en proteínas naturales es inferior a la de lisinas, y la cisteína puede ser adecuada para su uso como un sitio de conjugación cuando está disponible en números adecuados; cuando haya presentes demasiadas pocas cisteínas, se pueden insertar una o más por métodos convencionales de modificación de proteínas. Sin embargo, a menudo es preferible evitar modificar la secuencia de la proteína natural insertando una cisteína o eliminando un disulfuro. Aunque no es difícil convertir un disulfuro en dos cisteínas libres reduciendo el disulfuro, hacerlo puede alterar la estructura secundaria o terciaria de la proteína.

50 Se ha publicado que algunos métodos para insertar un anclaje entre residuos de cisteína formados por reducción de un disulfuro en una proteína. Esta estrategia es especialmente atractiva para la producción de ADC, debido a que la estructura de anticuerpo típica contiene cuatro disulfuros intercatenarios que se pueden reducir que se pueden utilizar sin modificar la proteína. Uno método utilizado para una conjugación de este tipo implica un derivado de metacrilato sustituido con sulfona. US2006/0210526. Este método forma un intermedio reactivo que requiere un paso de eliminación antes de que se produzca la alquilación del segundo azufre. Las condiciones para ese proceso de múltiples pasos pueden dar como resultado la formación incompleta de un conector (anclaje) entre cisteínas, y las condiciones de reacción pueden provocar la desnaturalización proteica. Otra estrategia utiliza un derivado de maleimida, por ejemplo, una 3,4-dibromomaleimida. WO2011/018613. Sin embargo, el conjugado formado en este proceso se puede ver afectado por problemas de estabilidad debido a que la adición de Michael de los tioles del anillo de maleimida es reversible, de manera que el anclaje entre los átomos de azufre o la propia carga se puede perder. Por lo tanto, se necesitan métodos novedosos que puedan transformar grupos disulfuro en sitios de conjugación sin renunciar al efecto estabilizador de los disulfuros intercatenarios, a la vez que proporcionen eficacia en la conjugación, estabilidad y relaciones de carga/proteína uniformes. La presente invención proporciona métodos útiles para preparar tales ADC.

El documento WO 96/41813 A2, McReynolds K.D. *et al*, *Tetrahedron Letters* 55(14), 2270-3 (2014), Berthleemann A. *et al*, *Org. Biomol. Chem.* 12(16), página 2306 (2014) y Khomutov, A., *Tetrahedron* 52(43), páginas 13751-66 (2013), documentos WO 2013/190292 A2 y WO2013/111110 A2 divulgan conjugados proteicos, incluyendo los últimos dos documentos restos de alcoxiamina.

COMPENDIO

En un aspecto, la invención como se define en las reivindicaciones proporciona un método para utilizar dos disulfuros en un anticuerpo para unir una carga a la proteína y formar un conjugado proteico. El método conlleva reducir los disulfuros para proporcionar los grupos tiol libres, y ligar los dos grupos tiol juntos con un grupo puente que los mantenga en aproximadamente las mismas posiciones que ocupaban cuando formaban un disulfuro. Mantener los grupos cisteína en sus mismas posiciones aproximadas minimiza cualquier efecto adverso en la conformación de la proteína que pueda producirse tras la reducción del disulfuro. El anclaje que se introduce para unir los dos grupos tiol juntos contiene un grupo funcional reactivo que se puede utilizar para adherir una carga de interés. El anclaje contiene un grupo carbonilo que es lo suficientemente reactivo para formar un enlace oxima con un grupo hidroxilamina, y la carga se conjuga con la proteína activada formando tal enlace. Por ejemplo, la proteína reducida se puede hacer reaccionar con una 1,3-dihaloacetona tal como dicloroacetona o dibromoacetona, e insertar de esta manera un anclaje de 3 carbonos que conecta los dos átomos de azufre entre sí. Esto puede simular convenientemente el efecto del disulfuro, mantener la proteína en una conformación muy similar a la que tenía cuando estaba presente el disulfuro, mientras que también proporciona mayor estabilidad que el disulfuro, así como un lugar para adherir una carga. Los anclajes T¹ y T² (como se definen en las reivindicaciones) que se utilizan en los métodos y composiciones de la invención proporcionan un grupo funcional con reactividad química, y en la presente se denomina proteína activada a una proteína que contiene este tipo de anclaje entre dos átomos de azufre de cisteína. Aunque se puede utilizar cada cetona para adherir una carga, en la presente invención dos cetonas u otros grupos de anclaje de este tipo se conectan entre sí con un grupo de puente que proporciona un nuevo punto de adhesión para una carga. Como resultado de utilizar dos anclajes S-S para adherir un grupo de puente que porta una carga, el número de compuestos de carga de un polipéptido concreto es la mitad del número de disulfuros utilizados en el método de conjugación. Las Figuras de la presente proporcionan una representación esquemática de los conjugados de la invención. Otros métodos de utilización de disulfuros para formar conjugados se describen en los documentos WO/2014/083505 y PCT/IB2014/066300.

Estos métodos se pueden aplicar a cualquier proteína que tenga dos o más enlaces disulfuro accesibles, y normalmente son útiles para proteínas naturales que tienen un peso molecular superior a 500 Da y típicamente superior a 2000 Da, donde un disulfuro está presente en la forma nativa o activa de la proteína. Los métodos se pueden utilizar con proteínas que contienen más de un disulfuro, tal como 2-10, o típicamente hasta 6 grupos disulfuro, donde al menos uno de los cuales está lo suficientemente accesible para ser reducido mediante agentes de reducción de disulfuro convencionales. Estos métodos producen un conjugado que contiene al menos una carga por cada par de grupos disulfuro que se utilizan, y el conjugado mantiene sustancialmente la conformación nativa o activa de la proteína.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema que ilustra cómo se puede activar un disulfuro y utilizarse para preparar un conjugado polipéptido-carga.

La Figura 2 proporciona un diagrama de un anticuerpo genérico, que ilustra la presencia y posición de disulfuros intercatenarios que se pueden utilizar en los métodos de la invención para formar conjugados.

Las Figuras 3A, 3B y 3C representan las subunidades de un anticuerpo con disulfuros, que se utilizan posteriormente para preparar un polipéptido activado, y un conjugado polipéptido-carga de la invención.

La Figura 4 muestra el gel de SDS-PAGE de Fc, **12** y **14** (Ejemplo 1).

La Figura 5 muestra el gel de SDS-PAGE de los productos del Ejemplo 2.

La Figura 6 muestra el gel de SDS-PAGE de los productos de los Ejemplos 4 y 5.

Descripción detallada de realizaciones de la invención

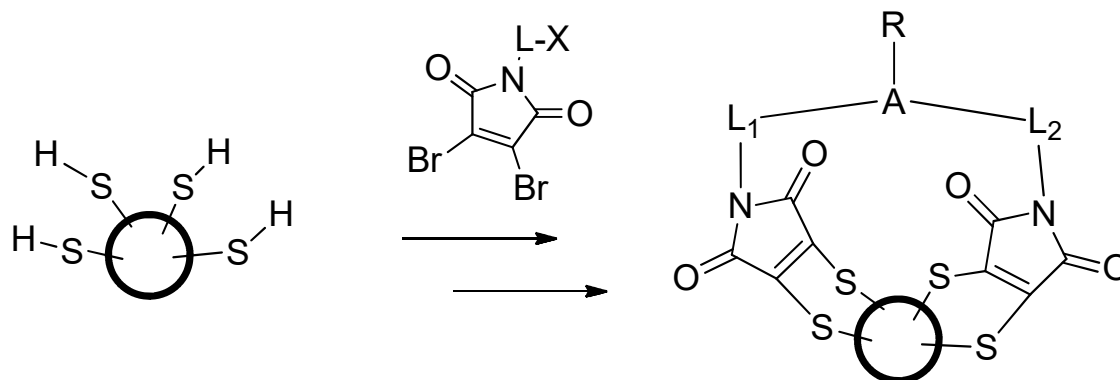
«Proteína» y polipéptido, como se utilizan en la presente, se refieren a péptidos que contienen diez o más residuos aminoácidos conectados por enlaces amida (peptídicos). Una proteína o polipéptido puede ser una única hebra continua o puede incluir dos o más hebras que se asocian de manera natural para formar un complejo estable, y pueden ser o comprender un polipéptido cíclico. Típicamente, las proteínas descritas en la presente comprenden principal o únicamente aminoácidos de origen natural, aunque los métodos descritos en la presente son igual de útiles con polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos no naturales. Habitualmente (pero no necesariamente), los aminoácidos son principal o completamente de la configuración L y se seleccionan de los aminoácidos «esenciales» comunes. Los métodos también son adecuados para su uso con complejos polipeptídicos que contienen dos o más cadenas peptídicas, donde los enlaces disulfuro utilizados para los métodos de la invención pueden ser disulfuros intercatenarios o intracatenarios.

Abreviaturas

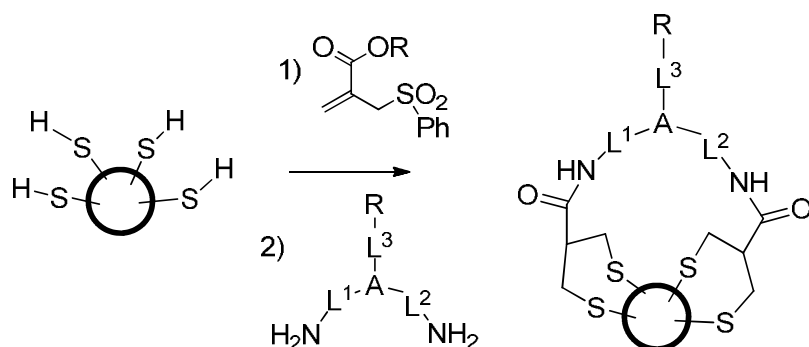
	DCM	Diclorometano
	DIC	Diisopropilcarbodiimida
	DIPEA	Diisopropiletilamina
5	EDT	Etanoditiol
	HBTU	Hexafluorofosfato de <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)uronio
	MeCN	Acetonitrilo
	NMP	<i>N</i> -Metilpirrolidinona
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
10	TCEP	Tris(carboxietil)fosfina
	TFA	Ácido trifluoroacético
	TIPS	Triisopropilsilano

En las Figuras 3A - 3C se muestra un ejemplo de una realización de la invención. La Figura presenta esquemáticamente un anticuerpo genérico, que muestra cuatro enlaces disulfuro intercatenarios. En una realización, todos los disulfuros intercatenarios están reducidos, y se forma una proteína reducida que tiene ocho tioles libres derivados de los disulfuros. A continuación, se permite que el polipéptido reducido reaccione con una dihaloacetona o biselectrófilo similar (por ejemplo, 1,3-dicloroacetona o 1,3-dibromoacetona) para formar una proteína activada donde cada par de tioles están unidos entre sí mediante un anclaje funcionalizado: el anclaje en este ejemplo contiene un grupo cetona libre que es reactivo respecto a la formación de la base de Schiff. A continuación, se permite que un grupo de puente de bisalcoxiamina reaccione con las cetonas del polipéptido activado, donde se adhiere al grupo de puente un único grupo de carga.

Los métodos de la invención pueden, como divulgación a efectos de referencia, también utilizarse con otros grupos de anclaje entre los átomos de azufre para formar un disulfuro. Por ejemplo, en la técnica existe constancia de métodos para ligar entre sí grupos sulfhidrilo utilizando grupos cíclicos, utilizando dibromomaleimida con una carga adherida al nitrógeno anular. Estos se pueden adaptar para producir conjugados ligando los restos conectores entre sí para formar un puente que porta un compuesto de carga, como se presenta aquí. Esta doble adhesión también debería reducir problemas potenciales provocados por la adición de Michael reversible del S al anillo de maleimida, que puede liberar la carga (citotoxina) de manera prematura. En el conjugado adherido a cuatro átomos de azufre, el riesgo de liberación prematura de la carga debería reducirse.



De manera similar, en la técnica existe constancia de los métodos para utilizar un par de átomos de azufre para unir una carga mediante adición de Michael/eliminación a partir de un metacrilato sustituido, y se pueden adaptar para proporcionar conjugados de la divulgación de referencia. En lugar de unir una carga a través del carboxilato de un metacrilato, se pueden enlazar entre sí dos grupos de metacrilato antes o después de la conjugación a la proteína como se muestra aquí.



Los métodos de la invención son adecuados para su uso para formar conjugados a partir de la mayoría de los polipéptidos que contienen al menos dos enlaces disulfuro que se pueden reducir sin desnaturalizar la proteína, o que contienen cuatro o más residuos de cisteína libres que se pueden conectar en pares por reacción con un reactivo de tipo 1,3-dihaloacetona. Normalmente, el polipéptido es uno donde los tioles reaccionan con dicloroacetona o dibromoacetona en condiciones descritas en la presente para producir al menos un 50% de reticulación de los dos tioles, y frecuentemente el grado de reticulación es de al menos aproximadamente un 70%, 80% o un 90%.

Un par de cisteínas que se van a unir entre sí pueden estar en una única hebra polipeptídica o pueden estar en hebras polipeptídicas separadas que formen un complejo polipeptídico. En ciertas realizaciones, los métodos utilizan una proteína o polipéptido que tiene 2-6 enlaces disulfuro, o 4-8 residuos de cisteína libres, y conllevan la reducción de al menos dos de los disulfuros. El polipéptido que contiene disulfuro puede ser cualquier polipéptido que tenga al menos 10 residuos aminoácidos, preferentemente al menos 50 aminoácidos, que contenga un par de enlaces disulfuro dentro de una única secuencia polipeptídica, incluido un complejo polipeptídico donde un disulfuro (o dos o más disulfuros) conecta una secuencia polipeptídica con otro aminoácido o polipéptido, siempre que el complejo no se disocie rápidamente cuando los disulfuros se reduzcan para insertar el anclaje entre los átomos de azufre. Las proteínas típicas para su uso en los métodos de la invención incluyen péptidos cíclicos y péptidos lineales que contienen de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos, típicamente al menos 100 aminoácidos y hasta aproximadamente 2000, incluidas proteínas funcionales tales como enzimas o receptores; complejos proteicos que tienen al menos dos enlaces disulfuro (que a menudo conectan dos hebras polipeptídicas separadas); proteínas estructurales; proteínas utilizadas como armazones de vacuna tales como CRM197 u otras proteínas que tienen actividad adyuvante; y especialmente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que tienen al menos dos enlaces disulfuro reducibles, por ejemplo, Fc. Las proteínas particularmente útiles para estos métodos incluyen anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales incluidos anticuerpos manipulados, anticuerpos modificados y fragmentos de anticuerpo que tienen dos disulfuros intercatenarios; proteínas portadoras de vacunas tales como CRM197; y proteínas monocatenarias que tienen al menos dos enlaces disulfuro o al menos cuatro residuos de cisteína y que tienen un peso molecular entre 500 y 500 000, típicamente entre 1000 y 200 000. Los métodos para manipular un anticuerpo u otra proteína para introducir dos o más residuos de cisteína, por ejemplo, y para modificar anticuerpos, son muy conocidos en la técnica.

Los métodos son especialmente útiles con anticuerpos y subunidades de anticuerpos que contienen al menos dos disulfuros reducibles, incluidos IgG y Fc, que tienen de dos a cuatro enlaces disulfuro intercatenarios accesibles que se reducen fácilmente mediante métodos conocidos en la técnica.

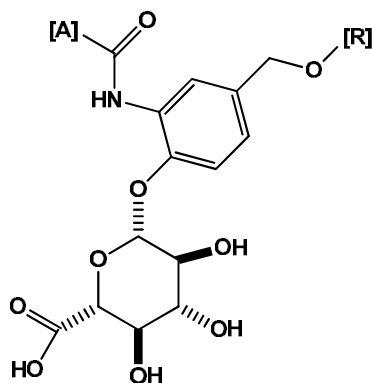
Los enlaces disulfuro de proteínas que contienen disulfuros para su uso en los métodos y composiciones de la invención se reducen para formar cuatro o más grupos tiol libres: en la técnica son muy conocidos los métodos para reducciones de este tipo. En algunas realizaciones, la reducción se realiza utilizando un agente reductor que reduce de manera selectiva enlaces disulfuro que son de fácil acceso para el disolvente alrededor de la proteína: un agente reductor adecuado es tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y sus sales, véase *Analytical Biochemistry* 273, 73-80 (1999). También se pueden utilizar otros agentes reductores de disulfuros conocidos tales como ditiotretol, 2-mercaptoetanol, cisteamina y ditiobutilamina (JM Perkel, *Chem. Eng'g News*, 29 de febrero de 2012; Lukesh, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 4057-59 (2012)) y trialquilfosfinas tales como tributilfosfina (documento WO2008/157380).

Los grupos conectores L^1 , L^2 y L^3 pueden ser cualesquiera enlaces orgánicos adecuados que conectan T^1 y T^2 con A, y conectan A con la carga R. Los ejemplos adecuados de L^1 y L^2 , que pueden ser idénticos o diferentes, incluyen $[\text{T}]-(\text{CH}_2)_{1-6}-[\text{A}]$; $[\text{T}]-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{C}(=\text{O})-[\text{A}]$; $[\text{T}]-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-[\text{A}]$; $[\text{T}]-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{O}-[\text{A}]$; $[\text{T}]-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-[\text{A}]$; $[\text{T}]-\text{Fenil}-\text{C}(\text{O})\text{NH}-[\text{A}]$, y combinaciones de estos, donde n es típicamente 1-20, y [T] y [A] respectivamente indican qué extremo del conector se adhiere al grupo T^1 o T^2 , y qué extremo conecta con el grupo A. Algunos ejemplos de enlaces adecuados para L^3 incluyen $[\text{A}]-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{1-6}-[\text{R}]$; $[\text{A}]-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-[\text{R}]$; $[\text{A}]-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-[\text{R}]$; $[\text{A}]-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-\text{O}-[\text{R}]$; $[\text{A}]-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-[\text{R}]$; $[\text{A}]-\text{Fenil}-\text{C}(\text{O})\text{NH}-[\text{R}]$, y similares, donde n es típicamente 1-20, y [A] y [R] indican respectivamente qué extremo del conector se adhiere al grupo A y qué extremo conecta con la carga R. En algunas realizaciones, el conector L^3 puede tener dos cargas

adheridas para incrementar la carga que se introduce en el conjugado. En otras realizaciones, el conector L^3 puede tener tres cargas adheridas para incrementar la carga que se introduce en el conjugado. Cuando se adhiere más de una carga a un conector concreto, las cargas pueden ser idénticas o diferentes. Los conectores adecuados también incluyen combinaciones de los componentes de estos grupos: la naturaleza de los conectores no es crucial para llevar a la práctica la invención y se puede basar en la conveniencia y disponibilidad de los métodos para la adhesión a al menos una carga R, o en las propiedades fisicoquímicas deseadas para el conjugado, o en su uso previsto. La selección de conectores adecuados está comprendida en las competencias del experto y depende de la estructura de la carga R y métodos disponibles para modificarla para adherirla al conector L^3 así como también de si el uso planeado hace que sea deseable utilizar un conector escindible. Típicamente, el conector se adhiere a uno o ambos extremos mediante un grupo amida o éster; frecuentemente el conector L contiene un enlace peptídico o éster para permitir la lisis *in vivo* por parte de las actividades proteasa o esterasa (por ejemplo, val-cit, un dipéptido que es escindido por catepsina B, o Gly-phe-leu-gly, que también es escindible por catepsina B); opcionalmente contiene una o más unidades de óxido de etileno (-OCH₂CH₂-); y en muchas realizaciones contiene al menos uno y hasta seis residuos aminoácidos. Las realizaciones adecuadas de conectores L^1 , L^2 y L^3 también pueden comprender uno o más componentes seleccionados de los siguientes grupos:

- (a) un enlace, -O-, -S-, -S-S-, -NH-, -N(alquilo(C₁-C₆))- , -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-;
- (b) alquilenilo (C₁-C₂₀), alquenilenilo (C₂-C₂₀), alquinilenilo (C₂-C₂₀), -Z-alquilenilo (C₁-C₂₀)-, -Z-alquenilenilo (C₂-C₂₀), -Z-alquinilenilo (C₂-C₂₀), alquilenilo (C₁-C₂₀)-Z-alquilenilo (C₁-C₂₀), alquenilenilo (C₂-C₂₀)-Z-alquenilenilo (C₂-C₂₀), alquinilenilo (C₂-C₂₀)-Z-alquinilenilo (C₂-C₂₀), donde Z es -C(O)-, -NH-, -N(alquilo (C₁-C₆))- , -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-, cicloalquilenilo (C₃-C₇), fenilenilo, heteroarilenilo, o heterociclono y donde dicho alquilenilo (C₁-C₂₀), dicho alquenilenilo (C₂-C₂₀), y dichos restos alquinilenilo (C₂-C₂₀) contienen cada uno independientemente opcionalmente uno o más átomos de oxígeno intercalados dentro de dichos restos, de modo que los átomos de oxígeno estén separados por al menos uno y preferentemente dos átomos de carbono;
- (c) cicloalquilenilo (C₃-C₇), cicloalquilenilo (C₃-C₇)-Y-cicloalquilenilo (C₃-C₇), -Y-cicloalquilenilo (C₃-C₇), fenilenilo, -Y-fenilenilo, fenilenilo-Y-fenilenilo, heteroarilenilo, Y-heteroarilenilo, heteroarilenilo-Y-heteroarilenilo, heterociclono, -Y-heterociclono, o heterociclono-Y-heterociclono, donde Y es alquilenilo (C₁-C₂₀), alquenilenilo (C₂-C₂₀), alquinilenilo (C₂-C₂₀), -O-, -C(O)-, -S-, -NH-, -N(alquilo (C₁-C₆))- , -NH-C(O)-NH-, -C(O)-NH-, o -NH-C(O)- y donde dicho cicloalquilenilo (C₃-C₇), dicho fenilenilo, dicho heteroarilenilo, y dichos restos heterociclono están cada uno individualmente opcionalmente sustituidos con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados entre halo, alquilo (C₁-C₄) o alquilo (C₁-C₄) halosustituido;
- (d) -[OCH₂CH₂]_v-, donde v es 1-20, preferentemente 1-10; y
- (e) un péptido que comprende de 1 a 100 aminoácidos, preferentemente 1-30 o 1-6 aminoácidos.

Además, L^3 puede ser o puede comprender un conector escindible tal como Val-Cit (valina-citrulina, un dipéptido que es escindido selectivamente por catepsina B) o val-cit-PABC (*p*-aminobencilcarbamato de valina-citrulina, véase *Bioconjugate Chem.* 19(10), 1960-63 (2008)), un disulfuro o un conector escindido por glucuronidasa, tal como el conector presente en esta fórmula:



donde [A] indica un punto de adhesión al grupo A en la Fórmula (I), y [R] representa un punto de adhesión a la carga R. (*ACS Med. Chem. Letters*, vol. 1, 277-280 (2010)). Tales conectores escindibles se utilizarían preferiblemente como L^3 en la Fórmula (I), pero también se pueden utilizar como L^1 y/o L^2 .

La carga (R) puede ser cualquier resto que sea útil para adherirse a una proteína. En la técnica se conocen muchos ejemplos de compuestos que pueden adherirse de forma útil a proteínas. Los ejemplos incluyen restos de etiquetas que posibilitan que un usuario ubique o identifique la proteína, incluidos quelantes que se unen a iones metálicos para proporcionar detectabilidad del conjugado; restos de unión tales como biotina o avidina, polinucleótidos, anticuerpos o fragmentos de estos, poli-Arg o poli-lys que contienen 5-15 residuos aminoácidos, etc., que hacen que sea fácil purificar o aislar la proteína o fijarla a una superficie; grupos modificadores de propiedades tales como grupos de ácidos grasos o polietilenglicol (PEG); grupos antigénicos tales como polisacáridos o proteínas de la superficie celular que son característicos de un tipo particular de célula o bacteria; grupos de acoplamiento que posibilitan que la proteína o péptido modificado se adhiera a otra molécula para generar conjugados más complejos, tales como anticuerpos biespecíficos

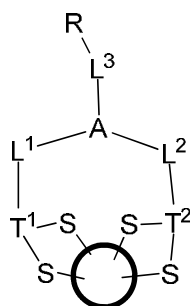
(véase la Figura 2); y compuestos bioactivos incluidos compuestos farmacéuticos y radionúclidos, así como también citotoxinas, que pueden verse transportados por la proteína hasta un tejido o célula deseado donde pueden producir un efecto deseado. Estos compuestos transportados pueden actuar mientras permanecen conjugados a la proteína o una parte de esta, o pueden desprenderse en primer lugar de la proteína si el grupo conector es uno que puede escindirse fácilmente *in vivo*. Las cargas farmacéuticas adecuadas para su uso con estos métodos incluyen inhibidores de microtúbulos, inhibidores de la topoisomerasa I, agentes intercalantes, inhibidores de rutas de señalización intracelular, inhibidores de cinasas y agentes de unión al surco menor del ADN, incluidos clases de compuestos tales como maitansinoides, auristatinas, caliqueamicinas, psimberinas, duocarmicinas, antraciclinas, camptotecinas, doxorrubicinas, taxoles, pirrolbenzodiazepinas y similares.

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

Los grupos de acoplamiento adecuados que se pueden utilizar como cargas (grupos que se pueden utilizar para acoplar el conjugado a otro resto) incluyen maleimida, tioles, alfa-halocetonas (por ejemplo, $-\text{C}(=\text{O})\text{-CH}_2\text{-X}$ donde X es cloro, bromo o yodo), ácidos carboxílicos, aminas, hidroxilos, alquenos, alquinos incluidos octinos cíclicos que se pueden utilizar en química «click» sin cobre, azida y similares. Los métodos para utilizar estos grupos de acoplamiento para conectar los conjugados de la invención a otros compuestos que tienen grupos de acoplamiento complementarios son muy conocidos en la técnica, e incluyen la adición de Michael de un tiol a una maleimida, alquilación de un tiol con una alfa-halocetona, formación de enlace amida entre amina y un ácido carboxílico, química «click» (véase, por ejemplo, Meldal, *et al.*, *Chem Rev.*, vol. 108, 2952-3015 (2008)) para unir una azida a un alquino al formar un anillo de 1,2,3-triazol, y química «click sin cobre». Véase, por ejemplo, Meeuwissen, *et al.* *Polymer Chemistry*, vol. 3, 1783-95 (2012). Los grupos de acoplamiento «complementarios» son dos grupos de acoplamiento que se combinan fácilmente para formar un enlace covalente, tal como los pares mencionados anteriormente (carboxilato más amina para formar una amida; azida más alquino para formar un 1,2,3-triazol; maleimida más tiol, donde el tiol se añade al doble enlace mediante una adición de Michael; alfa-halocetona más tiol que forman una alfa-tiocetona por alquilación del tiol; etc.). En ejemplos particulares, se selecciona un grupo de acoplamiento para actuar como Carga (R) del grupo constituido por halógeno, $-\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}=\text{CH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $-\text{SO}_2\text{-CH}=\text{CH}_2$, $-\text{O-NH}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{O-P}(\text{O})(\text{OH})_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{-H}$, $-\text{C}(\text{O})\text{-CH}_3$, $-\text{NH-C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-I}$, maleimidilo, 3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-4-ilo, 1H-pirrol-2,5-diona-1-ilo, piridin-2-ildisulfanilo, tetrahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-2(3H)-ona-4-ilo, 1-carboniloxi-2,5-dioxopirrolidina, 1-carboniloxi-2,5-dioxopirrolidino-3-sulfonato de sodio, $-\text{SSR}^1$, $-\text{C}(\text{O})\text{-OR}^1$, $-\text{N}(\text{R}^1)\text{H}$, $-\text{NH-N}(\text{R}^1)\text{H}$, donde R^1 es H o alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$), y $-\text{C}(\text{O})\text{-R}^2$, donde R^2 es H, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$), alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_4$) halosustituido, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{N}(\text{R}^1)\text{H}$, o $-\text{NH-N}(\text{R}^1)\text{H}$.

Las siguientes realizaciones enumeradas ilustran aspectos particulares de la invención.

1. Un conjugado polipeptídico que comprende:



(I)

donde el círculo representa un polipéptido o complejo polipeptídico, que puede comprender modificaciones diferentes de la mostrada:

cada S es un átomo de azufre de un residuo de cisteína del polipéptido o complejo polipeptídico;

T¹ representa un grupo de fórmula -CH₂-C(=N-O-[L¹])-CH₂-, donde [L¹] indica el punto de adhesión de T¹ a L¹, y

T² representa un grupo de fórmula -CH₂-C(=N-O-[L²])-CH₂-, donde [L²] indica el punto de adhesión de T² a L², L¹ y L² representan cada uno un grupo conector que conecta T¹ o T², respectivamente, a A;

L^3 es un grupo conector que conecta A a R ;

A representa un grupo que conecta L^1 , L^2 y L^3 .

y R representa una carga o grupo funcional reactivo para adherir una carga.

2. El conjugado polipeptídico de cualquiera de la realización 1, donde L^1 y L^2 son idénticos.

5 3. El conjugado polipeptídico de cualquiera de las realizaciones 1-2, donde el polipéptido es un anticuerpo o Fc de anticuerpo, y los dos átomos de azufre adheridos a T^1 formaron un enlace disulfuro en el anticuerpo o Fc de anticuerpo no conjugado.

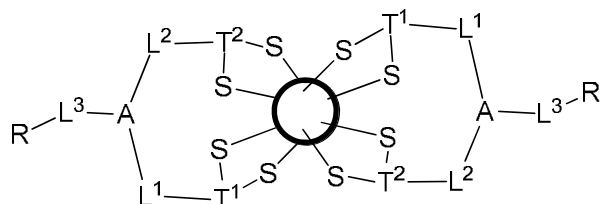
10 4. El conjugado polipeptídico de una cualquiera de las realizaciones 1-3, donde el polipéptido es un anticuerpo o Fc de anticuerpo, y los dos átomos de azufre adheridos a T^2 forman un enlace disulfuro en el polipéptido no conjugado.

5. El conjugado polipeptídico de una cualquiera de las realizaciones 1-4, donde R representa un agente terapéutico, una etiqueta detectable, un antígeno o un grupo de unión.

15 6. El conjugado polipeptídico de la realización 5, donde R representa una citotoxina.

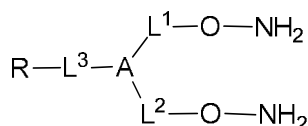
7. El conjugado polipeptídico de una cualquiera de las realizaciones 1-6, donde A es N, CH, fenilo, cicloalquilo C_{3-6} o un grupo heteroarilo o heterocíclico de 5-6 miembros que tiene hasta dos heteroátomos seleccionados entre N, O y S como miembros anulares.

20 8. El conjugado polipeptídico de una cualquiera de las realizaciones 1-7, que tiene la fórmula



donde el círculo representa un anticuerpo.

9. Un compuesto de la fórmula (IIa)



(IIa)

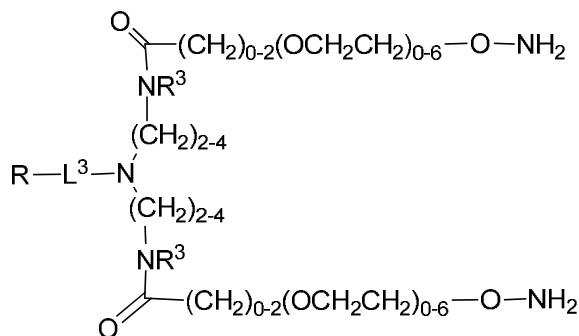
donde R es una citotoxina;

L^1 , L^2 y L^3 son grupos conectores y L^1 y L^2 son idénticos; y

A es N, CH, fenilo, cicloalquilo C_{3-6} o un grupo heteroarilo o heterocíclico de 5-6 miembros que tiene hasta dos heteroátomos seleccionados entre N, O y S como miembros anulares;

o una sal de este.

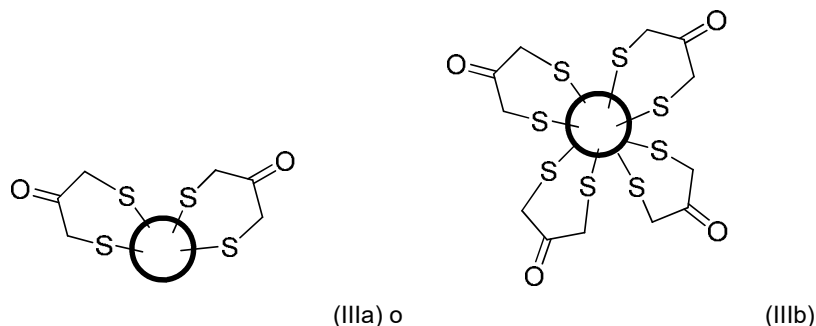
10. El compuesto de la realización 9, que tiene la fórmula



, donde R^3 es H o alquilo (C_1-C_6).

11. El compuesto de una cualquiera de las realizaciones 9-10, donde $R-L^3$ tiene la fórmula $R-Z-C(=O)-$, donde Z comprende al menos un grupo seleccionado entre $-(CH_2)_{1-6}-$, $-(CH_2CH_2O)_{1-6}-$ y $-(OCH_2CH_2)_{1-6}-$.

12. Un método para preparar un conjugado polipéptido-carga, que comprende poner en contacto un polipéptido o complejo polipeptídico activado de fórmula (IIIa) o (IIIb):



donde el círculo representa un polipéptido o complejo polipeptídico, que está activado por los grupos carbonilo insertados, y cada S representa un átomo de azufre de un residuo de cisteína comprendido en el polipéptido o complejo polipeptídico, Con el compuesto de una cualquiera de las realizaciones 9 a 11.

13. El método de la realización 12, donde el polipéptido o complejo polipeptídico es un anticuerpo o una porción Fc de un anticuerpo.

14. El método de la realización 12 o 13, que comprende además un paso de preparación del polipéptido o complejo polipeptídico activado mediante un método que comprende reducir al menos dos enlaces disulfuro de un anticuerpo o Fc de anticuerpo para producir un polipéptido o complejo polipeptídico reducido, y poner en contacto el polipéptido o complejo polipeptídico reducido con dicloroacetona para proporcionar el polipéptido o complejo polipeptídico activado.

15. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado polipéptido-carga de una cualquiera de las realizaciones 1-7 y al menos un portador, diluyente o tampón farmacéuticamente aceptable.

Los métodos de la invención conllevan reducir un disulfuro de una proteína que se va a modificar, para formar una proteína reducida que contiene dos grupos tiol libres. La proteína reducida se pone en contacto con un compuesto de anclaje funcionalizado que es capaz de reaccionar con ambos tioles libres en la proteína reducida para anclar los tioles libres juntos, a la vez que se retiene al menos un grupo funcional en el anclaje que es adecuado para la conjugación; o como alternativa, el grupo que se va a adherir ya puede estar conectado al grupo de anclaje antes de que el grupo de anclaje se añada a la proteína. El anclaje es un grupo carbonilo, por ejemplo, la cetona obtenida cuando se permite que los tioles libres reaccionen con una 1,3-dihalocetona (véase la Figura 1). Como los tioles libres son fuertemente nucleófilos, reaccionan fácilmente con electrófilos tales como haluros de alquilo o tosilatos de alquilo, mediante reacciones irreversibles que conllevan desplazar un grupo saliente y formar un enlace covalente de azufre-carbono. Algunos ejemplos adecuados de compuestos de anclaje que contienen carbonilo funcionalizados incluyen 1,3-dicloroacetona y 1,3-dibromoacetona. Estos reactivos se han utilizado para estabilizar restos disulfuro en péptidos cíclicos pequeños anclando sulfhidrilos juntos. Véase, por ejemplo, el documento WO2008/157380 (reacción de dicloroacetona con un pentapéptido cíclico reducido, seguido de reducción del carbonilo). También se pueden utilizar sulfonatos de 1,3-dihidroxiacetona (por ejemplo, mesilato, triflato, fenilsulfonato, tosilato y similares). Estos reactivos son suficientemente reactivos respecto a los tioles libres de una proteína reducida para proporcionar reacción razonablemente rápida para formar una proteína activada con dos restos de cisteína anclados juntos, donde cada uno de los tioles libres está adherido covalentemente al grupo de anclaje funcionalizado.

La proteína reducida y el compuesto de anclaje funcionalizado se ponen en contacto en condiciones adecuadas para promover la reacción entre el compuesto de anclaje y los dos tioles libres de la proteína reducida, y particularmente en condiciones de concentración y temperatura que favorezcan provocar que ambos tioles libres que se unieron previamente en un enlace disulfuro reaccionen con una única molécula del compuesto de anclaje de modo que una vez más se ligen juntos, pero ahora con una conexión que es un anclaje corto en lugar de un enlace disulfuro directo. Esta reacción forma una proteína activada como se ilustra en la Figura 1, que tiene un anclaje funcionalizado $[-CH_2C(O)-CH_2-]$ entre los dos átomos de azufre. El anclaje en la Figura 1 incluye un carbonilo que se puede utilizar para adherir de forma eficaz una carga mediante química de formación de bases de Schiff limpia y eficaz.

Para la presente invención, al menos dos disulfuros se reducen y utilizan para la conjugación. Como el grupo de anclaje contiene una cetona reactiva para actuar como el sitio de conjugación, como se representa en la Figura 1, la proteína se activará típicamente con dos grupos de anclaje, que habitualmente serán idénticos. Los dos grupos de anclaje activados

se unirán a continuación entre sí mediante una reacción con un reactivo de puente que tiene dos grupos aminooxi, véase la Figura 3. El grupo puente proporciona a continuación un punto de adhesión para una carga.

Se entiende en todo este análisis que la proteína, aunque se representa como un círculo o esfera, puede ser un polipéptido pequeño de menos de 10 aminoácidos o una enzima grande o un complejo de dos o más subunidades o hebras polipeptídicas. Los dos átomos de azufre del disulfuro pueden estar en una subunidad de un complejo multimérico, o pueden estar en hebras diferentes de un complejo proteico. Además del disulfuro que participa en las transformaciones descritas en la presente, la proteína también puede contener otros enlaces disulfuro que se pueden reducir, o puede que no estén reducidos debido a su ubicación dentro de la proteína. Los métodos de la invención pueden utilizar métodos conocidos para reducir selectivamente enlaces disulfuro accesibles al disolvente cerca de la superficie de la proteína plegada, a menudo sin reducir los disulfuros «enterrados» que pueden ser esenciales para mantener la forma y funcionalidad globales de la proteína, o para mantener dos subunidades unidas entre sí en un complejo de múltiples subunidades.

Una vez que se ha formado la proteína activada, se puede adherir una carga mediante la formación de una oxima cuando el anclaje contiene una cetona reactiva. Como se ilustra en las Figuras 3A-3C y ciertos de los ejemplos, un compuesto bis-aminooxi que contiene la carga se puede añadir en un paso; como alternativa, una alcoxiamina que tiene un grupo funcional se puede añadir al anclaje, y el grupo funcional se puede utilizar para adherir la carga en un paso posterior.

La proteína activada se pone en contacto típicamente con un compuesto aminooxi que contiene una carga, o un grupo que se puede utilizar para adherir una carga, sin purificar o aislar la proteína activada. Los Ejemplos ilustran la introducción de un grupo reactivo en la proteína en primer lugar, y la utilización a continuación del grupo reactivo para adherir una citotoxina.

Ejemplos

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

Método A:

Eluyente A: agua + 0,1% de ácido fórmico, Eluyente B: acetonitrilo + 0,08 % de ácido fórmico
Gradiente: de un 3 a un 80% de B en 2 min - Flujo 1,0 mL/min. Columna: Proswift Monolith 4,6*50 mm 40 °C

Método B:

Eluyente A: agua + 0,1% de ácido fórmico, Eluyente B: acetonitrilo + 0,04 % de ácido fórmico
Gradiente: de un 3 a un 80% de B en 2 min - Flujo 1,0 mL/min. Columna: Proswift Monolith 4,6*50 mm 40 °C

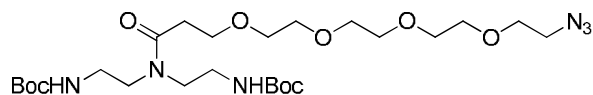
Método C:

Eluyente A: agua + acetato de amonio 3,75 mM + 2% de acetonitrilo, Eluyente B: acetonitrilo
Gradiente: de un 2 a un 98% de B en 1,7 min - Flujo 1,0 mL/min. Columna: Acquity CSH 2,1*50 mm 50 °C

Método D (HRMS):

Eluyente A: agua + 0,05% de ácido fórmico + acetato de amonio 3,75 mM, Eluyente B: acetonitrilo + 0,04 % de ácido fórmico.
Gradiente: de un 2 a un 98% de B en 4,4 min - Flujo 1,0 mL/min. Columna: Acquity CSH 2,1*50 mm 50 °C

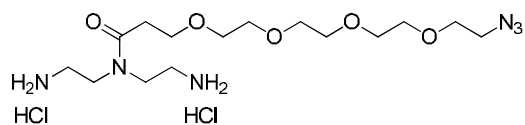
Preparación de compuestos aminooxi



(1)

Se añadieron NHS-PEG₄-azida (50 mg, 0,129 mmol) y trietilamina (72 μ L, 0,515 mmol) a 1,7-bis-Boc-1,4,7-triazaheptano (47 mg, 0,155 mmol) en diclorometano (1,3 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió cloruro de sodio acuoso saturado y la mezcla se extrajo con diclorometano dos veces, y los extractos combinados se secaron con sulfato de magnesio anhidro. Después de la filtración y concentración, el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (0-40%, v/v, acetato de etilo/heptano) para obtener el compuesto del título **1** (30 mg, 40%). LC-MS ($M+1$) 577,4, t = 1,20 minutos. HRMS: calculada para C₂₅H₄₉N₆O₉ (MH^+) 577,3561, observada 577,3548. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,44 (s a., 18 H) 2,63 (t, J =6,28 Hz, 2 H) 3,27 - 3,34 (m, 4 H) 3,40 (t, J =5,04 Hz, 2 H) 3,46 - 3,51 (m, 4 H) 3,54 - 3,72 (m, 14 H) 3,80 (t, J =6,33 Hz, 2 H) 5,11 (s a., 1 H) 5,18 (s a., 1 H).

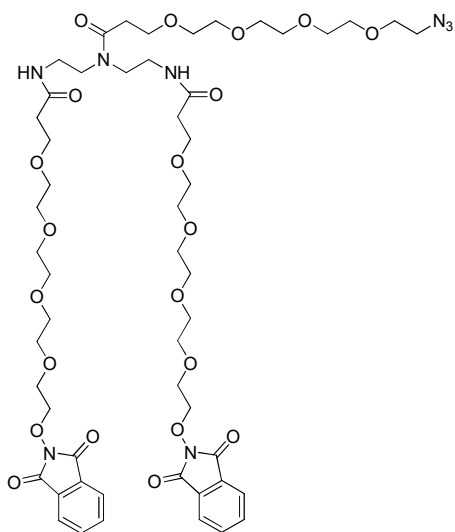
Dihidroclorehidrato de N,N-bis(2-aminoetil)-1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (2)



(2)

Se añadió gota a gota HCl 4 N en dioxano (130 μ L, 0,52 mmol) a la solución de **1** (30 mg, 0,052 mmol) en diclorometano (1 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y a continuación se concentró al vacío y se obtuvo el compuesto del título diclorhidrato de *N,N*-bis(2-aminoetil)-1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**2**, 14 mg, 60%). LC-MS ($M+1$) 377,3, $t = 0,44$ minutos.

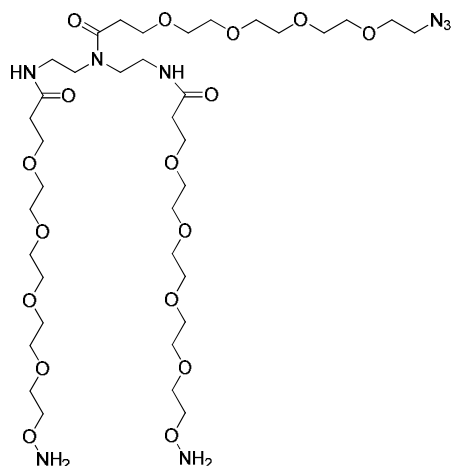
1-azido-*N,N*-bis(1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaoctadecan-18-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**3**)



(3)

Se añadieron 1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (35 mg, 0,069 mmol) y trietilamina (17 μ L, 0,125 mmol) a una solución de diclorhidrato de *N,N*-bis(2-aminoetil)-1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**2**, 14 mg, 0,031 mmol) en diclorometano. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas y después se concentró al vacío. Se obtuvo el compuesto del título 1-azido-*N,N*-bis(1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaoctadecan-18-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**3**, 0,031 mmol). LC-MS ($M+1$) 1163,6, $t = 1,12$ minutos.

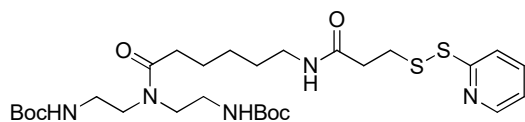
N,N-bis(1-(aminooxi)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaoctadecan-18-il)-1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**4**)



(4)

Se añadió hidrazina monohidratada (61 μ L, 1,24 mmol) a una solución de 1-azido-*N,N*-bis(1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaoctadecan-18-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**3**, 0,031 mmol) en diclorometano (0,6 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se concentró al vacío. El residuo resultante se purificó mediante HPLC preparativa (15-40%, v/v, acetonitrilo/(NH₄OH 5 mM acuoso)) y los eluidos combinados se concentraron para producir el compuesto del título *N,N*-bis(1-(aminooxi)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaoctadecan-18-il)-1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**4**, 13 mg, 46%). LC-MS (M+1) 903,6, t = 0,65 minutos. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 2,41 - 2,53 (m, 4 H) 2,66 (t, *J*=6,42 Hz, 2 H) 3,37 - 3,45 (m, 6 H) 3,45 - 3,54 (m, 4 H) 3,56 - 3,71 (m, 44 H) 3,71 - 3,76 (m, 4 H) 3,78 (t, *J*=6,37 Hz, 2 H) 3,86 (s a., 4 H).

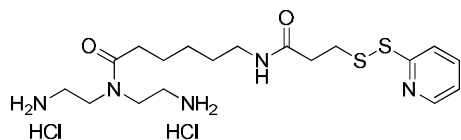
(((6-(3-(Piridin-2-ildisulfanil)propanamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato de di-*tert*-butilo (**5**)



(5)

Se añadieron Succinimidyl 6-(3-[2-piridilditio]propionamido)hexanoato de succinimido (50 mg, 0,118 mmol) y trietilamina (65 μ L, 0,47 mmol) a una solución de 1,7-bis-Boc-1,4,7-triazaheptano (43 mg, 0,141 mmol) en diclorometano (1,2 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (82 μ L, 0,47 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió cloruro de sodio acuoso saturado y después la mezcla se extrajo dos veces con diclorometano. Los extractos combinados se secaron con sulfato de magnesio anhidro. Después de la filtración y concentración, el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (0-5%, v/v, metanol/diclorometano) para obtener (((6-(3-(piridin-2-ildisulfanil)propanamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato de di-*tert*-butilo (**5**, 42 mg, 58%) como un sólido incoloro. LC-MS (M+1) 614,3, t = 1,21 minutos. HRMS: calculada para C₂₈H₄₈N₅O₆S₂ (MH⁺) 614,3046, observada 614,3065. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,31 - 1,74 (m, 24 H) 2,37 (t, *J*=7,03 Hz, 2 H) 2,64 (t, *J*=6,72 Hz, 2 H) 3,11 (t, *J*=6,72 Hz, 2 H) 3,20 - 3,38 (m, 6 H) 3,44 - 3,50 (m, 4 H) 5,20 - 5,34 (m, 2 H) 6,78 (s a., 1 H) 7,19 (s a., 1 H) 7,74 (s a., 2 H) 8,50 (d, *J*=3,42 Hz, 1 H).

Preparación del intermedio diclorhidrato de *N,N*-bis(2-aminoetil)-6-(3-(piridin-2-ildisulfanil)propanamido)hexanamida (**6**)

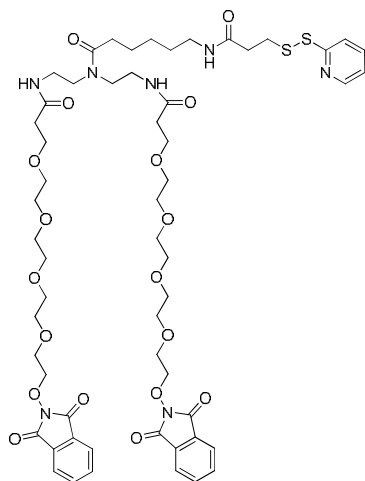


(6)

Se añadió HCl 4N en dioxano (171 μ L, 0,68 mmol) a una solución de (((6-(3-(piridin-2-ildisulfanil)propanamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato de di-*tert*-butilo (**5**, 42 mg, 0,068 mmol) en diclorometano (0,7 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y a continuación se

concentró al vacío para producir el compuesto del título diclorhidrato de *N,N*-bis(2-aminoetil)-6-(3-(piridin-2-ildisulfanil)propanamido)hexanamida (**6**, 0,068 mmol). LC-MS ($M+1$) 414,2, $t = 0,52$ minutos.

1-((1,3-Dioxoisindolin-2-il)oxi)-*N*-(1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-15-oxo-19-(6-(3-(piridin-2-ildisulfanil)propanamido)hexanoil)-3,6,9,12-tetraoxa-16,19-diazahenicosan-21-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**7**)

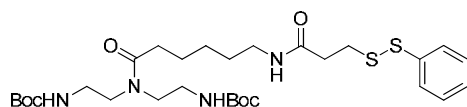


(7)

- 10 Se añadieron 1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (76 mg, 0,150 mmol) y trietilamina (38 μ L, 0,272 mmol) a una solución de diclorhidrato de *N,N*-bis(2-aminoetil)-6-(3-(piridin-2-ildisulfanil)propanamido)hexanamida (**6**, 0,068 mmol) en diclorometano (1,4 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió cloruro de sodio acuoso saturado y la mezcla se extrajo dos veces con diclorometano. Los extractos combinados se secaron con sulfato de magnesio anhidro. Después de filtración y concentración, el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (0-10%, v/v, metanol/diclorometano) para obtener
- 15 1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-*N*-(1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-15-oxo-19-(6-(3-(piridin-2-ildisulfanil)propanamido)hexanoil)-3,6,9,12-tetraoxa-16,19-diazahenicosan-21-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**7**, 47 mg, 58%) como un aceite transparente. LC-MS ($M+1$) 1200,4, $t = 1,13$ minutos. HRMS: calculada para $C_{56}H_{78}N_7O_{18}S_2$ (MH^+) 1200,4845, observada 1200,4943. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 1,31 - 1,74 (m, 6 H) 2,40 (t, $J=7,21$ Hz, 2 H) 2,43 - 2,57 (m, 4 H) 2,66 (t, $J=6,72$ Hz, 2 H) 3,12 (t, $J=6,97$ Hz, 2 H) 3,29 (c, $J=6,44$ Hz, 2 H) 3,35 - 3,55 (m, 9 H) 3,55 - 3,67 (m, 19 H) 3,67 - 3,80 (m, 8 H) 3,88 (td, $J=4,43, 2,26$ Hz, 4 H) 4,33 - 4,44 (m, 4 H) 6,96 (s a., 1 H) 6,99 - 7,10 (m, 1 H) 7,24 (s a., 2 H) 7,73 - 7,83 (m, 6 H) 7,83 - 7,91 (m, 4 H) 8,51 (d, $J=4,77$ Hz, 1 H).
- 20

(((6-(3-(Fenilsulfanil)propanamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato de di-*tert*-butilo (**8**)

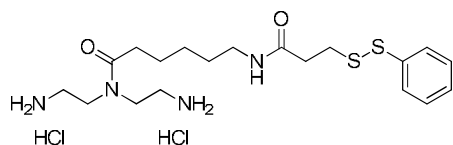
25



(8)

- Se añadió tiofenol (101 μ L, 0,98 mmol) a una solución de (((6-(3-(piridin-2-ildisulfanil)propanamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato de di-*tert*-butilo (**5**, 60 mg, 0,098 mmol) en diclorometano (0,98 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y la mezcla se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice ((10-100%, v/v, acetato de etilo/heptano) para obtener (((6-(3-(fenildisulfanil)propanamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato de di-*tert*-butilo (**8**, 35 mg, 58%) como un aceite transparente. LC-MS ($M+1$) 613,2, $t = 1,38$ minutos. HRMS: calculada para $C_{29}H_{49}N_4O_6S_2$ (MH^+) 613,3094, observada 613,3097. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 1,29 - 1,55 (m, 22 H) 1,55 - 1,78 (m, 2 H) 2,35 (t, $J=7,20$ Hz, 2 H) 2,56 (t, $J=7,01$ Hz, 2 H) 3,03 (t, $J=7,01$ Hz, 2 H) 3,16 - 3,36 (m, 6 H) 3,37 - 3,53 (m, 4 H) 7,14 - 7,30 (m, 1 H) 7,30 - 7,41 (m, 2 H) 7,47 - 7,59 (m, 2 H).
- 30
- 35

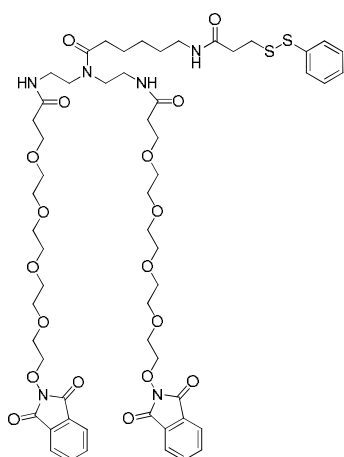
Preparación del intermedio diclorhidrato de *N,N*-bis(2-aminoetil)-6-(3-(fenildisulfanil)propanamido)hexanamida (**9**)



(9)

Se añadió HCl 4N en dioxano (143 μ L, 0,57 mmol) a una solución de (((6-(3-(fenyldisulfanyl)propanamido)hexanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diil))dicarbamato de di-*tert*-butilo (**8**, 35 mg, 0,057 mmol) en diclorometano (0,6 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos, y la mezcla se concentró al vacío para obtener diclorhidrato de *N,N*-bis(2-aminoetil)-6-(3-(fenyldisulfanyl)propanamido)hexanamida (**9**, 0,057 mmol). LC-MS (*M*+1) 413,2, *t* = 0,67 minutos.

1-((1,3-Dioxoisindolin-2-il)oxi)-*N*-(1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-15-oxo-19-(6-(3-(fenyldisulfanyl)propanamido)hexanoil)-3,6,9,12-tetraoxa-16,19-diazahenicosan-21-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**10**)

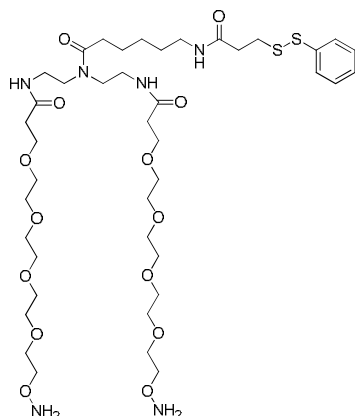


(10)

Se añadieron 1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (87 mg, 0,171 mmol) y trietilamina (39 μ L, 0,285 mmol) a una solución de diclorhidrato de *N,N*-bis(2-aminoetil)-6-(3-(fenyldisulfanyl)propanamido)hexanamida (**9**, 0,057 mmol) en diclorometano (0,6 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió cloruro de sodio acuoso saturado y la mezcla se extrajo dos veces con diclorometano. Los extractos combinados se secaron con sulfato de magnesio anhidro. Después de filtración y concentración, el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (0-10%, v/v, metanol/diclorometano) para obtener

1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-*N*-(1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-15-oxo-19-(6-(3-(fenyldisulfanyl)propanamido)hexanoil)-3,6,9,12-tetraoxa-16,19-diazahenicosan-21-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**10**, 45 mg, 66%) como un aceite transparente. LC-MS (*M*+1) 1199,3, *t* = 1,25 minutos. HRMS: calculada para $C_{57}H_{79}N_6O_{18}S_2$ (*M*H⁺) 1199,4892, observada 1199,4955. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,32 - 1,44 (m, 2 H) 1,44 - 1,60 (m, 4 H) 2,41 (t, *J*=7,40 Hz, 2 H) 2,49 (d, *J*=4,89 Hz, 4 H) 2,60 (s a., 2 H) 3,04 (t, *J*=7,09 Hz, 2 H) 3,25 (d, *J*=4,40 Hz, 2 H) 3,44 (d, *J*=6,85 Hz, 6 H) 3,52 (s a., 3 H) 3,56 - 3,78 (m, 27 H) 3,88 (td, *J*=4,31, 2,75 Hz, 4 H) 4,30 - 4,45 (m, 4 H) 7,18 - 7,38 (m, 3 H) 7,55 (dd, *J*=6,91, 1,65 Hz, 2 H) 7,71 - 7,82 (m, 4 H) 7,82 - 7,91 (m, 4 H).

Preparación del intermedio 1-(aminooxi)-*N*-(1-(aminooxi)-15-oxo-19-(6-(3-(fenyldisulfanyl)propanamido)hexanoil)-3,6,9,12-tetraoxa-16,19-diazahenicosan-21-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**11**)



(11)

Se añadió hidrazina monohidratada (74 μ L, 1,501 mmol) a una solución de 1-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-*N*-((1,3-dioxoisindolin-2-il)oxi)-15-oxo-19-(6-(3-(fenildisulfanil)propanamido)hexanoil)-3,6,9,12-tetraoxa-16,19-diazahenicosan-21-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**10**, 45 mg, 0,038 mmol) en diclorometano (0,75 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y después se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (15-40%, v/v, acetonitrilo/(NH₄OH 5 mM acuoso)). Después de la concentración, se obtuvo 1-(aminooxi)-*N*-(1-(aminooxi)-15-oxo-19-(6-(3-(fenildisulfanil)propanamido)hexanoil)-3,6,9,12-tetraoxa-16,19-diazahenicosan-21-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**11**, 12 mg, 34%). LC-MS ((M/2)+1) 470,6, t = 1,15 minutos.

10

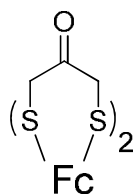
Preparación de conjugados con grupo(s) funcional(es) bioortogonal(es)

Preparación de Fc a partir de IgG:

Se añadieron secuencialmente 0,61 mL de Tris 0,1 M pH 8,0, y Lys-C (100 μ L de una solución de 0,1 mg/mL en agua) a IgG (0,639 mL de una solución de 78,26 mg/mL en PBS pH 7,4, 0,336 μ mol). La mezcla resultante se incubó a 37 °C durante 45 minutos. Se añadió a la mezcla Proteína A inmovilizada en microesferas de Sepharose y posteriormente estas se lavaron tres veces con tampón PBS para eliminar Lys-C y los fragmentos Fab. A continuación, se liberó Fc añadiendo glicina 0,1 M pH 2,5 dos veces y eluyendo en Tris 1 M pH 8,0. El Fc eluido se sometió a intercambio del tampón con PBS pH 7,4 utilizando filtros de centrifuga Amicon con MWCO para obtener Fc (700 μ L, 19,6 mg/mL, 13,7 mg, 77%). LCMS ESI (después de la desglicosilación con PNGasa F): 50410.

20

Preparación de **12**



25

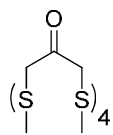
12

Se añadieron secuencialmente 900 μ L de Tris 0,25 M pH 7,4, y 1,3-dicloroacetona en DMSO (120 μ L, 0,019 mmol) a una solución de Fc (10 mg, 0,189 μ mol) en 510 μ L de PBS pH 7,4 a 4°C. La mezcla se agitó a 4°C durante 10 minutos, y a continuación se añadió gota a gota TCEP.HCl en agua (180 μ L, 1,887 μ mol). La mezcla se agitó a 4 °C durante 20 horas. La mezcla se hizo pasar a través de columnas de centrifugación Zeba con MWCO (siglas en inglés de corte de peso molecular) de 7K tres veces para obtener **12** (1,8 mL, 5,35 mg/mL, 9,63 mg, 96%). LCMS ESI (después de la desglicosilación con PNGasa F): 50521.

30

Preparación de IgG anti-Her2 (**13**) modificada

35



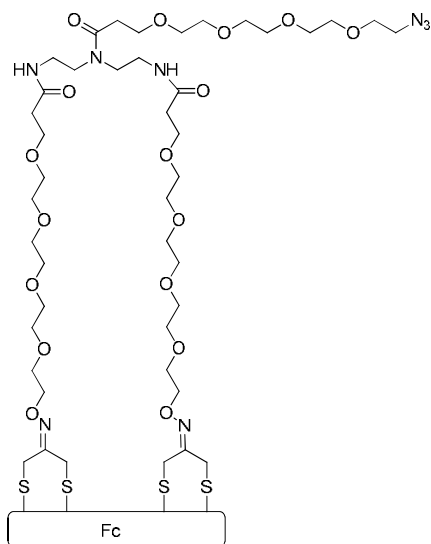
IgG anti-Her2

13

5

10

Se añadió 1,3-dicloroacetona en DMSO (9,72 μ L, 1,53 μ mol) a una solución de IgG anti-Her2 (1,5 mg, 0,010 μ mol) en 82 μ L de Tris (0,25 M pH 7,4) a 4 °C. La mezcla se agitó a 4 °C durante 10 minutos, y a continuación se añadió gota a gota TCEP.HCl en agua (14,62 μ L, 0,153 μ mol). La mezcla resultante se agitó a 4 °C durante 20 horas y a continuación se hizo pasar a través de columnas de centrifugación Zeba con MWCO de 7K tres veces consecutivas para obtener IgG anti-Her2 **13** modificada (110 μ L, 11,6 mg/mL, 1,27 mg, 85%). LCMS ESI (después de la desglicosilación con PNGasa F): 145401.

Ejemplo 1. Preparación de conjugado Fc-azido (**14**)**14**

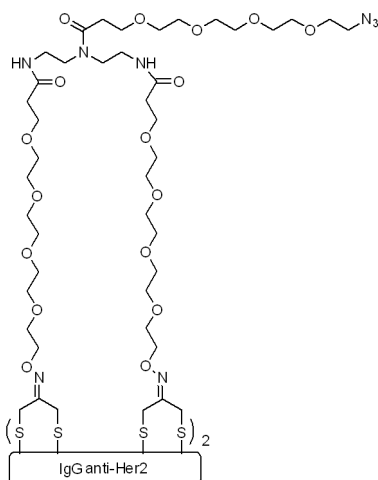
15

20

Se añadieron secuencialmente 0,4 mL de PBS pH 7,4, *N,N*-bis(1-(aminooxi)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaooctadecan-18-il)-1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**4**, 52 μ L de una solución de 30 mg/mL en DMSO, 1,55 mg, 1,717 μ mol), y ácido 3,5-diaminobenzoico en DMSO (130 μ L, 0,172 mmol) a una solución de **12** (9,1 mg, 0,172 μ mol) en 1,7 mL de PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 20 °C durante 16 horas, y a continuación se concentró utilizando un filtro de centrifuga Amicon ultra con MWCO de 10K con PBS como el tampón de lavado para obtener el compuesto del título **14** (310 μ L, 27 mg/mL, 8,37 mg, 90%). LCMS ESI (después de la desglicosilación con PNGasa F): 51388. Véase la Figura 4 para la SDS-PAGE del producto de reacción junto con Fc y **12**.

Ejemplo 2. Preparación de IgG anti-Her2 con funciones diazido (**15**)

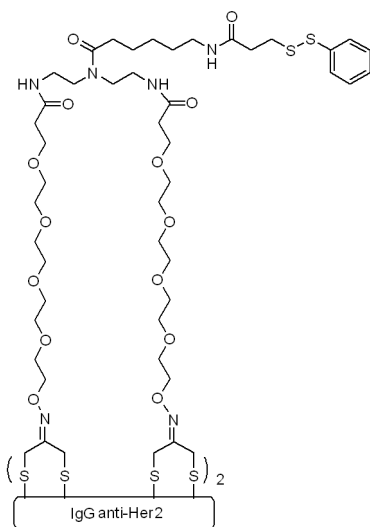
25

**15**

Se añadieron secuencialmente *N,N*-bis(1-(aminooxi)-15-oxo-3,6,9,12-tetraoxa-16-azaoctadecan-18-il)-1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**4**, 1,81 μ L de una solución de 30 mg/mL en DMSO, 54 μ g, 0,060 μ mol) y ácido 3,5-diaminobenzoico en DMSO (2,28 μ L, 3,00 μ mol) a la IgG anti-Her2 modificada (**13**, 441 μ g, 0,003 μ mol) en 38 μ L de PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a 20 °C durante 16 horas y a continuación se hizo pasar a través de columnas de centrifugación Zeba con MWCO de 7K tres veces consecutivas para obtener el compuesto del título (**15**, 125 μ L, 3,05 mg/mL, 380 μ g, 85%). LCMS ESI (después de la desglicosilación con PNGasa F): 147132. Véase la Figura 5 para SDS-PAGE de este producto junto con el anticuerpo solo (TBS) y otro conjugado de TBS no incluido aquí.

10

Ejemplo 3. Preparación de IgG anti-Her2 con fenildisulfuros **16**

**16**

Se añadieron 1-(aminooxi)-*N*-(1-(aminooxi)-15-oxo-19-(6-(3-(fenildisulfanil)propanamido)hexanoil)-3,6,9,12-tetraoxa-16,19-diazahenicosan-21-il)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (**11**, 8,44 μ L de una solución de 30 mg/mL en DMSO, 253 μ g, 0,269 μ mol) y ácido 3,5-diaminobenzoico en DMSO (5,12 μ L, 6,74 μ mol) a la IgG anti-Her2 modificada (**13**, 2 mg, 0,013 μ mol) en 135 μ L de PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 20 °C durante 16 horas y a continuación se hizo pasar a través de columnas de centrifugación Zeba con MWCO de 7K tres veces consecutivas para obtener el compuesto del título **16** (150 μ L, 9,24 mg/mL, 1,4 mg, 69%). LCMS ESI (después de la desglicosilación con PNGasa F): 147204.

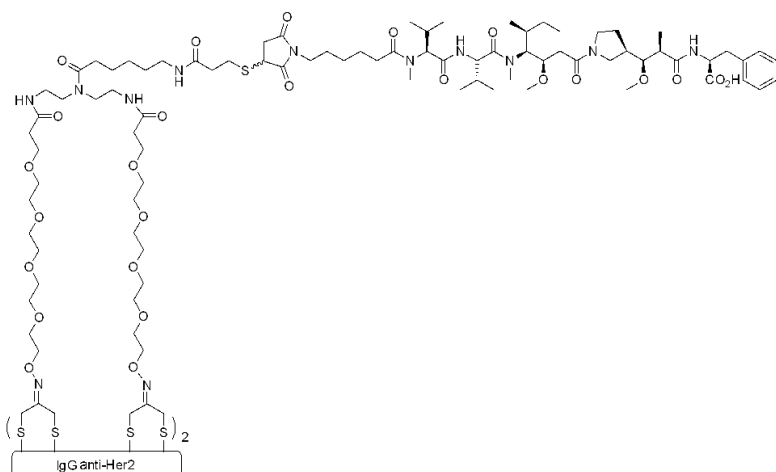
15

20

Preparación de conjugados con cargas de citotoxina

Ejemplo 5. Preparación de IgG anti-Her2-diMMAF **17**

25



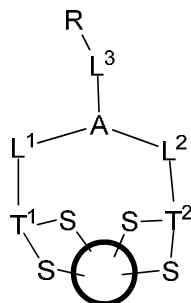
17

Se añadió gota a gota una solución de TCEP.HCl en agua (0,88 μL , 0,092 μmol) a IgG anti-Her2 con fenildisulfuros **16** (0,69 mg, 0,0046 μmol) en 75 μL de PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a 20 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos y a continuación se hizo pasar a través de columnas de centrifugación Zeba con MWCO de 7K (preequilibradas con PBS 0,1 M + EDTA 10 mM, pH 7,4) tres veces consecutivas. A continuación, se añadió ácido (S)-2-((2R,3S)-3-((R)-1-((3R,4S,5S)-4-((R)-2-((S)-2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-N-metilhexanamido)-3-metilbutanamido)-N,3-dimetilbutanamido)-3-metoxi-5-metilheptanoil)pirrolidin-3-il)-3-metoxi-2-metilpropanamido)-3-fenilpropanoico (4,27 μL , 0,092 μmol , 20 mg/mL en DMSO) y la mezcla se agitó a 20 $^{\circ}\text{C}$ durante 16 horas. La mezcla se hizo pasar a través de columnas de centrifugación Zeba con MWCO de 7K tres veces consecutivas para obtener el compuesto del título **17** (100 μL , 4,93 mg/mL, 493 μg , 70%). LCMS ESI (después de la desglicosilación con PNGasa F): 146987 (10% por intensidad del pico, IgG anti-Her2-conector, + 0 MMAF), 148839 (90% por intensidad del pico, IgG anti-Her2-diMMAF, + 2 MMAF). La DAR promedio para el producto final se estimó que era 1,8 en función de los picos de ESI-MS. Véase la Figura 6 para la SDS-PAGE de este producto junto con el precursor e IgG anti-Her2.

Preparación de muestras reducidas para SDS PAGE (protocolo de gel reductor): A una solución en PBS de proteínas (5 μg , 0,00017 μmol) se añadió una solución de TCEP HCl (1 μL , 0,5 M, 0,5 μmol). La mezcla resultante se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min.

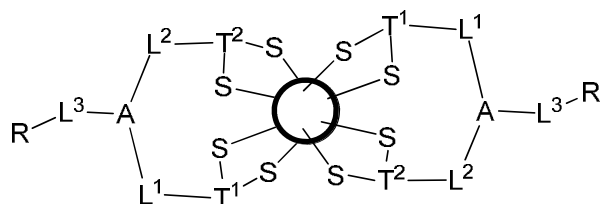
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado polipeptídico que comprende:



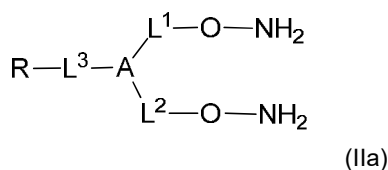
(I)

- 5 donde el círculo representa un polipéptido o complejo polipeptídico, que puede comprender modificaciones diferentes de la mostrada;
 cada S es un átomo de azufre de un residuo de cisteína del polipéptido o complejo polipeptídico;
 T¹ representa un grupo de la fórmula $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{N}-\text{O}-[\text{L}^1])-\text{CH}_2-$, donde $[\text{L}^1]$ indica el punto de adhesión de T¹ a L¹, y
 T² representa un grupo de la fórmula $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{N}-\text{O}-[\text{L}^2])-\text{CH}_2-$, donde $[\text{L}^2]$ indica el punto de adhesión de T² a L²;
 10 L¹ y L² representan cada uno un grupo conector que conecta T¹ o T², respectivamente, a A;
 L³ es un grupo conector que conecta A a R;
 A representa un grupo que conecta L¹, L² y L³;
 y R representa una carga o un grupo funcional reactivo para adherir una carga.
- 15 2. El conjugado polipeptídico de la reivindicación 1, donde L¹ y L² son idénticos.
3. El conjugado polipeptídico de la reivindicación 2, donde el polipéptido es un anticuerpo o Fc de anticuerpo, y los dos átomos de azufre adheridos a T¹ formaron un enlace disulfuro en el anticuerpo o Fc de anticuerpo no conjugado.
- 20 4. El conjugado polipeptídico de la reivindicación 3, donde el polipéptido es un anticuerpo o Fc de anticuerpo, y los dos átomos de azufre adheridos a T² formaron un enlace disulfuro en el polipéptido no conjugado.
5. El conjugado polipeptídico de la reivindicación 4, donde R representa un agente terapéutico, una etiqueta detectable, un antígeno o un grupo de unión.
- 25 6. El conjugado polipeptídico de la reivindicación 5, donde R representa una citotoxina.
7. El conjugado polipeptídico de la reivindicación 6, donde A es N, CH, fenilo, cicloalquilo C₃₋₆ o un grupo heteroarilo o heterocíclico de 5-6 miembros que tiene hasta dos heteroátomos seleccionados entre N, O y S como miembros anulares.
- 30 8. El conjugado polipeptídico de la reivindicación 7, que tiene la fórmula



donde el círculo representa un anticuerpo.

- 35 9. Un compuesto de la fórmula (IIa)



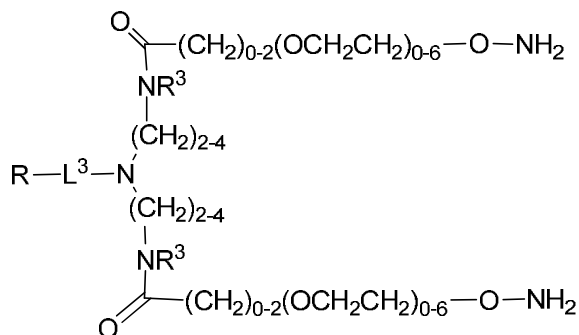
donde R es una citotoxina;

L¹, L² y L³ son grupos conectores y L¹ y L² son idénticos; y

A es N, CH, fenilo, cicloalquilo C₃₋₆ o un grupo heteroarilo o heterocíclico de 5-6 miembros que tiene hasta dos heteroátomos seleccionados entre N, O y S como miembros anulares.

5 o una sal de este.

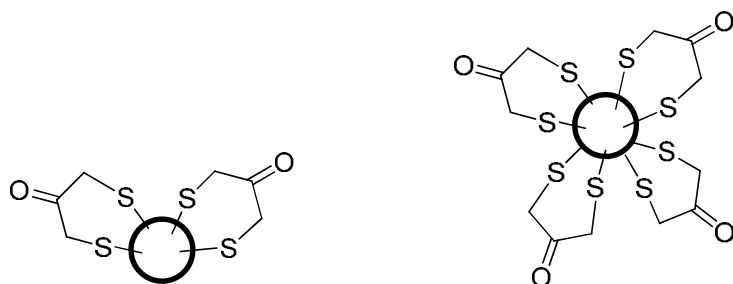
10. El compuesto de la reivindicación 9, que tiene la fórmula



y R³ es H o alquilo (C₁-C₆).

10 11. El compuesto de la reivindicación 10, donde R-L³- tiene la fórmula R-Z-C(=O)-, donde Z comprende al menos un grupo seleccionado entre -(CH₂)₁₋₆-, -(CH₂CH₂O)₁₋₆- y -(OCH₂CH₂)₁₋₆-.

12. Un método para preparar un conjugado polipéptido-carga, que comprende poner en contacto un polipéptido o complejo polipeptídico activado de fórmula (IIIa) o (IIIb):



15 (IIIa) or

(IIIb)

donde el círculo representa un polipéptido o complejo polipeptídico, que está activado por los grupos carbonilo insertados, y cada S representa un átomo de azufre de un residuo de cisteína comprendido en el polipéptido o complejo polipeptídico, con el compuesto de la reivindicación 11.

20 13. El método de la reivindicación 12, donde el polipéptido o complejo polipeptídico es un anticuerpo o una porción Fc de un anticuerpo.

25 14. El método de la reivindicación 13, que comprende además un paso de preparación del polipéptido o complejo polipeptídico activado mediante un método que comprende reducir al menos dos enlaces disulfuro de un anticuerpo o Fc de anticuerpo para producir un polipéptido o complejo polipeptídico reducido, y poner en contacto el polipéptido o complejo polipeptídico reducido con dicloroacetona para proporcionar el polipéptido o complejo polipeptídico activado.

30 15. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado polipéptido-carga de la reivindicación 1 y al menos un portador, diluyente o tampón farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

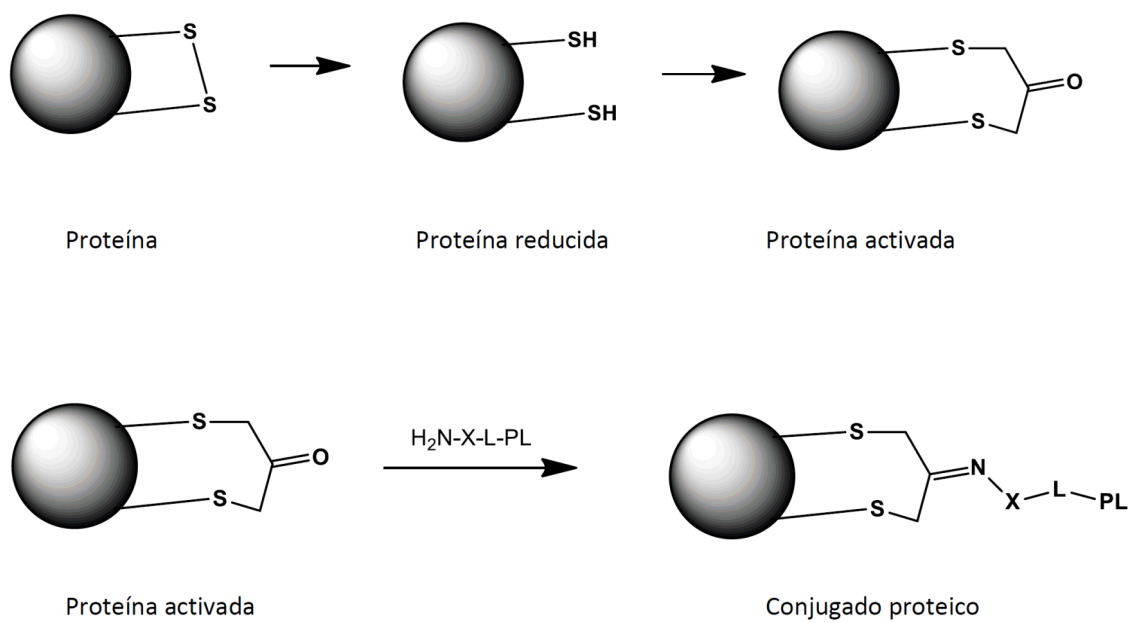


Figura 3A

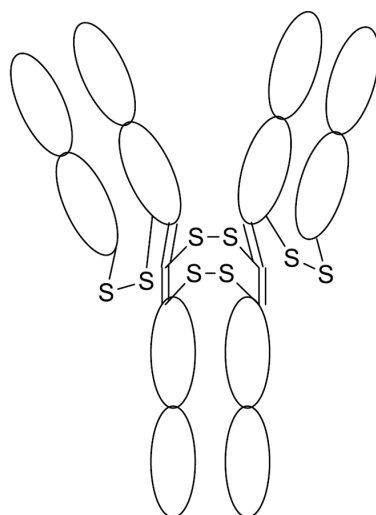


Figura 3B

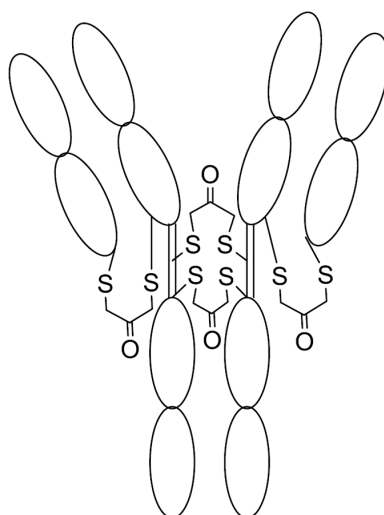


Figura 3C

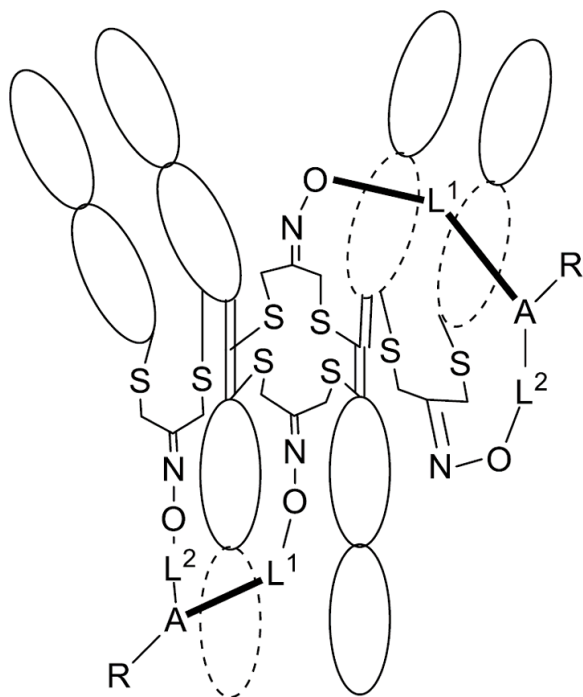
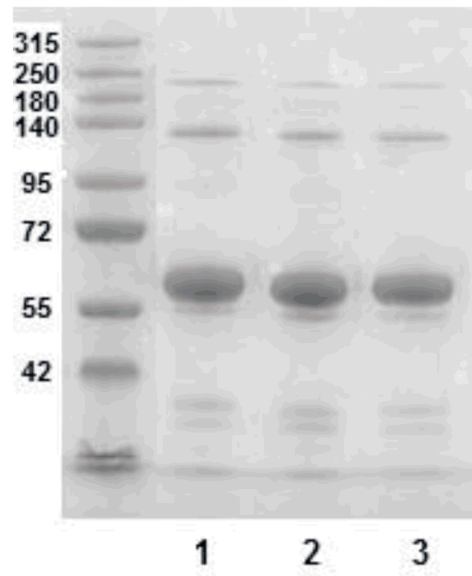


Figura 4

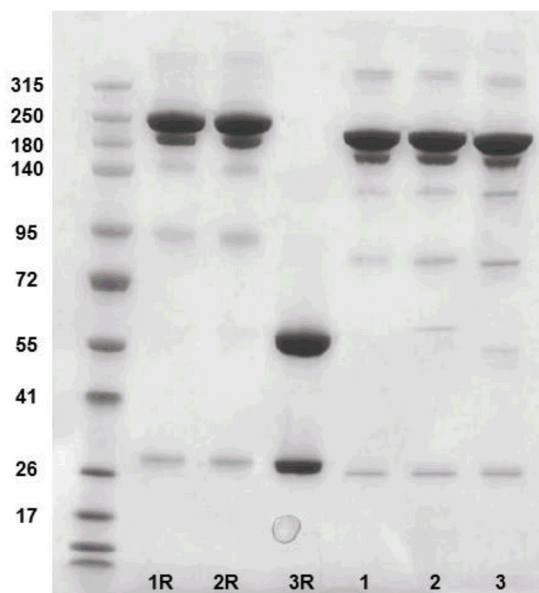
SDS-PAGE de Fc, 12 y 14



1. 14
2. 12
3. Fc

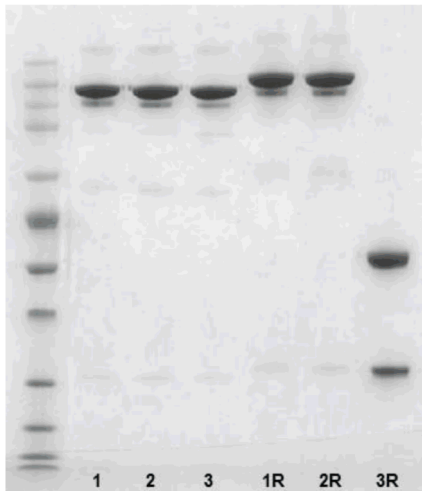
Figura 5

SDS-PAGE de trastuzumab y trastuzumab-diazido



1. (otro conjugado de trastuzumab)
 2. Trastuzumab-diazido
 3. Trastuzumab
- (1R, 2R and 3R son muestras reducidas)

Figura 6



1. 17

2. 16

IgG anti-Her2

(1R, 2R y 3R son 17, 16, IgG anti-Her2 pretratados con reactivos reductores en exceso)