

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 741**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/60** (2007.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015** **PCT/GB2015/052953**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016** **WO16063006**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015** **E 15782051 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023** **EP 3220956**

54 Título: **Conjugados y reactivos de conjugación**

30 Prioridad:

**24.10.2014 GB 201418986**

**24.10.2014 GB 201418989**

**24.10.2014 GB 201418984**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.03.2024**

73 Titular/es:

**ABZENA (UK) LIMITED (100.0%)**  
**Babraham Research Campus Babraham**  
**Cambridge, Cambridgeshire CB22 3AT, GB**

72 Inventor/es:

**GODWIN, ANTONY y**  
**FRIGERIO, MARK**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES, S.L.P.**

ES 2 960 741 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 y reactivos de conjugación

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a conjugados y reactivos de conjugación según se definen en las reivindicaciones.

## 10 Antecedentes de la invención

Se ha dedicado mucha investigación en los últimos años a la conjugación de una amplia diversidad de cargas, por ejemplo, agentes terapéuticos, de diagnóstico y de marcaje, con péptidos y proteínas destinados a un amplio abanico de aplicaciones. La proteína o péptido mismo puede poseer propiedades terapéuticas, y/o puede ser una proteína de unión.

Los péptidos y proteínas tienen un uso potencial como agentes terapéuticos, y la conjugación es un modo de mejorar sus propiedades. Por ejemplo, los polímeros sintéticos solubles en agua, particularmente los polialquilenglicoles, se utilizan de manera generalizada para conjugar péptidos o proteínas terapéuticamente activos.

Se ha mostrado que dichos conjugados terapéuticos alteran la farmacocinética favorablemente mediante la prolongación del tiempo de circulación y reduciendo las tasas de eliminación, reduciendo la toxicidad sistémica, y en varios casos, mostrando una mayor eficacia clínica. El procedimiento de conjugación covalente de polietilenglicol (PEG) con proteínas se conoce habitualmente como "PEGilación". La cadena de PEG puede portar una carga, por ejemplo, un agente terapéutico, de diagnóstico o de marcaje.

Las proteínas de unión, particularmente los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, con frecuencia se conjugan. La especificidad de las proteínas de unión para marcadores específicos sobre la superficie de las células y moléculas diana ha conducido a su uso generalizado como agentes terapéuticos o de diagnóstico por derecho propio o como portadores para cargas, entre las que se pueden incluir agentes terapéuticos, de diagnóstico o de marcaje. Dichas proteínas conjugadas con marcajes y grupos informadores, tales como fluoróforos, isótopos radioactivos y enzimas, encuentran uso en aplicaciones de marcaje y obtención de imágenes, mientras que la conjugación con fármacos, tales como agentes citotóxicos y fármacos quimioterapéuticos para producir conjugados de anticuerpo-fármaco (CAF) permite la entrega dirigida de dichos agentes en tejidos o estructuras específicas, por ejemplo, tipos celulares o factores de crecimiento particulares, minimizando el impacto sobre el tejido sano normal y reduciendo significativamente los efectos secundarios asociados a los tratamientos quimioterapéuticos. Dichos conjugados presentan muchas posibles aplicaciones terapéuticas en varios campos patológicos, particularmente en el cáncer. Los conjugados que contienen proteínas de unión frecuentemente contienen PEG.

En la literatura se ha informado de muchos métodos de conjugación de proteínas y péptidos. El procedimiento probablemente más conocido implica la utilización de reactivos de conjugación a base de maleimidias. Dichos reactivos se describen en muchas publicaciones, por ejemplo, en el documento n.º WO 2004/060965. Un enfoque alternativo que conduce a productos más homogéneos ha sido descrito por Liberatore et al., Bioconj. Chem. 1990, 1, 36-50, y por del Rosario et al., Bioconj. Chem. 1990, 1, 51-59, que describen el uso de reactivos que pueden utilizarse para entrecruzar a través de los enlaces disulfuro en proteínas, incluyendo anticuerpos. El documento n.º WO 2005/007197 describe un procedimiento para la conjugación de polímeros con proteínas, utilizando nuevos reactivos de conjugación que presentan la capacidad de conjugarse con ambos átomos de azufre derivados de un enlace disulfuro en una proteína, proporcionando nuevos conjugados tioéter, mientras que el documento n.º WO 2009/047500 describe la utilización de los mismos reactivos de conjugación para la unión a etiquetas de polihistidina unidas a la proteína. El documento n.º WO 2010/000393 describe reactivos capaces de formar un puente de un solo carbono a través del enlace disulfuro en una proteína. Entre otros documentos relacionados con la conjugación de proteínas se incluyen los documentos n.º WO 2014/064423, n.º WO 2013/190292, n.º WO 2013/190272, n.º EP 2260873, n.º US 2013/338231 y n.º WO 2011/077067.

El documento n.º WO 2014/064424 describe CAF específicos en los que el fármaco es una maitansina y el anticuerpo se une mediante entrecruzamiento a través de un enlace disulfuro. El documento n.º WO 2014/064423 describe CAF específicos en los que el fármaco es una auristatina y el anticuerpo se une mediante entrecruzamiento a través de un enlace disulfuro. Los conectores ilustrados en los Ejemplos de dichos documentos contienen una parte PEG en la que un extremo de la cadena de PEG se une mediante una porción adicional del conector al fármaco, mientras que el otro extremo de la cadena de PEG se une mediante una porción adicional del conector al anticuerpo. Este es un patrón estructural habitual de los CAF.

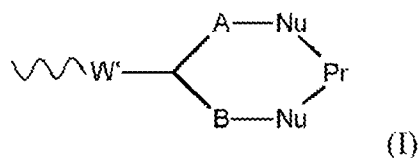
En los últimos años, se ha puesto de manifiesto la importancia del conector que une una carga a la proteína o péptido en un conjugado. Con frecuencia, la decisión clave que debe tomarse es si se desea disponer de un conector escindible, es decir, un conector que, al administrar el conjugado, se degrada, liberando la carga libre, o un conector no escindible. Otra decisión clave es si incluir PEG o no en el conector. A partir de dichas consideraciones en principio

puede utilizarse cualquier conector. Sin embargo, en la práctica, los cambios en la estructura del conector pueden comportar diferencias en las propiedades del reactivo de conjugación o del conjugado resultante.

Un problema observado frecuentemente es que los conjugados pueden ser menos estables durante el almacenamiento de lo deseado. Lo anterior es particularmente cierto en el caso de que se utilice un conector escindible, cuando se desea que el conjugado posea una vida útil prolongada antes de la administración, pero después se escinda rápidamente en la aplicación, aunque puede ser cierto de cualquier conector. Existe una necesidad de incrementar la estabilidad de almacenamiento de los conjugados. Además, es deseable una estabilidad *in vivo* mejorada, ya que ello puede conducir a una actividad biológica incrementada. Los presentes inventores ahora han encontrado que, para una clase particular de conjugado, la utilización de conectores que contienen PEG de una estructura particular proporciona una estabilidad de almacenamiento incrementada. Además, y muy inesperadamente, los conjugados presentan una actividad biológica incrementada.

### Sumario de la invención

La invención proporciona un conjugado de una proteína o péptido con un agente terapéutico, en el que dicho conjugado contiene una parte de unión a la proteína o péptido y presenta un conector que conecta el agente terapéutico con la parte de unión de proteína o péptido, en el que dicho conector incluye una parte de polietilenglicol, en la que dicha parte de unión de proteína o péptido presenta la fórmula general siguiente:



en la que:

Pr representa dicha proteína o péptido,

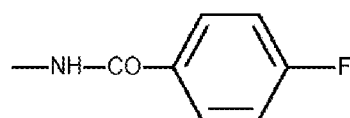
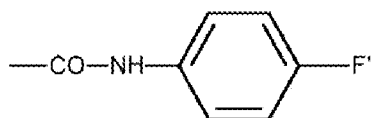
cada Nu representa un átomo de azufre o un grupo de amina proporcionado por un residuo de cisteína, lisina o histidina presente en la proteína o péptido Pr, o cada Nu representa un grupo imidazol presente en una etiqueta de polihistidina unida a la proteína o péptido Pr,

cada uno de A y B representa independientemente una cadena de alquileo o alquenileno C<sub>1-4</sub>, y

W' representa un grupo ceto o un grupo CH-OH,

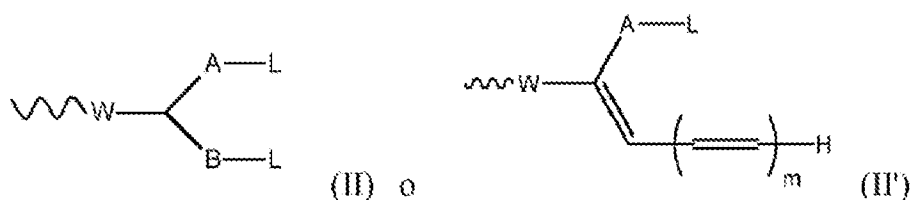
dicha parte de polietilenglicol es o incluye una cadena de polietilenglicol colgante que presenta un grupo terminal de fórmula -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR, en la que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un grupo arilo sustituido opcionalmente, y en el que dicha cadena de polietilenglicol colgante presenta un peso molecular medio en número de hasta 75.000 g/mol,

el conector incluye la agrupación:



en la que F' representa dicha parte de unión de proteína o péptido de fórmula I, y la proteína o péptido es una proteína de unión a receptor o ligando, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

La invención proporciona, además, un reactivo de conjugación capaz de reaccionar con una proteína o péptido y que incluye un agente terapéutico, en el que dicho reactivo presenta un conector que conecta el agente terapéutico con una agrupación funcional, en el que dicho conector incluye una parte de polietilenglicol; dicha agrupación funcional presenta la fórmula siguiente:



en la que:

W' representa un grupo ceto o un grupo CH-OH,

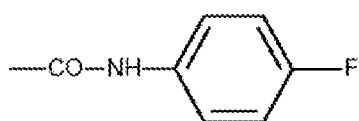
cada uno de A y B representa independientemente una cadena de alquileo o alquenileno C<sub>1-4</sub>,

cada L representa independientemente un grupo saliente,

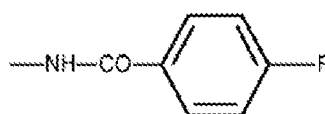
dicha parte polietilenglicol es o incluye una cadena de polietilenglicol colgante que presenta un grupo terminal de fórmula -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR, en la que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un grupo arilo sustituido opcionalmente, y en el que

dicha cadena de polietilenglicol colgante presenta un peso molecular medio en número de hasta 75.000 g/mol,

el conector incluye la agrupación:



(VIa) o



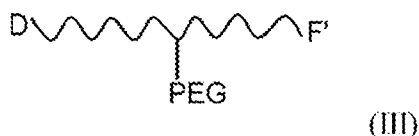
(VIb)

en la que F representa la agrupación funcional de fórmula II o II'.

La invención proporciona, además, un procedimiento para la preparación de un conjugado según la invención, que comprende hacer reaccionar una proteína o péptido con un reactivo de conjugación según la invención.

## Descripción detallada de la invención

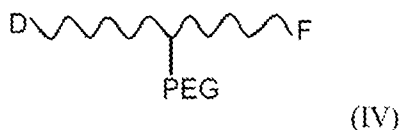
El conjugado de la invención puede representarse esquemáticamente mediante la fórmula siguiente:



(III)

en la que D representa el agente terapéutico, de diagnóstico o de marcaje; F' representa el grupo de fórmula I, y PEG representa la cadena de polietilenglicol colgante que presenta un grupo terminal de fórmula -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR.

El reactivo de la invención puede representarse esquemáticamente mediante la fórmula siguiente:



(IV)

en la que D representa el agente terapéutico, de diagnóstico o de marcaje; F representa el grupo de fórmula II o II', y PEG representa una cadena de polietilenglicol colgante que presenta un grupo terminal de fórmula -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR. La agrupación funcional F es capaz de reaccionar con dos nucleófilos presentes en una proteína o péptido, tal como se explica posteriormente.

## La parte polietilenglicol

Una parte polietilenglicol (PEG) de los conjugados y reactivos de la invención es o incluye una cadena de PEG colgante que presenta un grupo terminal de fórmula -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR, en la que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>, especialmente un grupo metilo, o un grupo arilo sustituido opcionalmente, especialmente un grupo fenilo, especialmente un grupo fenilo no sustituido. Preferentemente, R es un grupo metilo o un átomo de hidrógeno.

La parte PEG puede incluir una única cadena de PEG colgante tal como se ha definido anteriormente, o puede incluir dos o más, por ejemplo, dos o tres, cadenas de PEG colgantes.

El tamaño total de la parte PEG evidentemente dependerá de la aplicación deseada. Para algunas aplicaciones, pueden utilizarse PEG de alto peso molecular, por ejemplo, el peso molecular medio en número puede ser de hasta aproximadamente 75.000, por ejemplo, de hasta 50.000, 40.000 o 30.000 g/mol. Por ejemplo, el peso molecular medio en número puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre 500 g/mol y aproximadamente 75.000. Sin embargo, pueden resultar preferentes partes PEG más pequeñas para algunas aplicaciones.

En una realización preferente, la totalidad del PEG en la parte PEG se encuentra presente en una o más cadenas de PEG colgantes. En otra realización, PEG también puede estar presente en el esqueleto de la molécula, y esto se comenta en mayor detalle posteriormente.

Al igual que con la parte de PEG, el tamaño de la cadena o cadenas de PEG colgantes dependerán de la aplicación deseada. Para algunas aplicaciones, pueden utilizarse cadenas de PEG de alto peso molecular, por ejemplo, el peso molecular medio en número puede ser de hasta aproximadamente 75.000, por ejemplo, de hasta 50.000, 40.000 o 30.000 g/mol. Por ejemplo, el peso molecular medio en número puede encontrarse comprendida en el intervalo de entre 500 g/mol y aproximadamente 75.000. Sin embargo, para muchas aplicaciones, pueden utilizarse cadenas de PEG colgantes más pequeñas. Por ejemplo, dicha cadena de PEG puede presentar un peso molecular de hasta 3.000 g/mol. Sin embargo, los oligómeros muy pequeños, que consisten en cadenas de PEG discretas con, por ejemplo, tan solo 2 unidades repetidas, por ejemplo, entre 2 y 50 unidades repetidas, resultan útiles para algunas aplicaciones y se encuentran presentes en forma de una cadena de PEG colgante en una realización preferente de la invención. Una cadena de PEG colgante puede ser de cadena lineal o ramificada. Por ejemplo, pueden utilizarse cadenas de PEG, por ejemplo, cadenas de cadena lineal o ramificada con 12, 20, 24, 36, 40 o 48 unidades repetidas.

#### La carga

Los conjugados y reactivos dados a conocer en la presente memoria portan una carga que es un agente terapéutico, de diagnóstico o de marcaje. Puede encontrarse presente una sola molécula de un agente terapéutico, de diagnóstico o de marcaje, o pueden encontrarse presentes dos o más moléculas. La inclusión de una o más moléculas de fármaco, por ejemplo, un agente citotóxico o una toxina, resulta preferente. Las auristatinas y los maitansinoides son fármacos citotóxicos habituales. Con frecuencia resulta preferente que los conjugados de fármaco, particularmente los conjugados de fármaco de anticuerpos, contengan múltiples copias del fármaco. Entre los agentes de marcaje (que debe entenderse que incluyen los agentes de obtención de imágenes) se pueden incluir, por ejemplo, un radionucleido, un agente fluorescente (por ejemplo, una sonda fluorescente derivatizada con amina, tal como 5-dimetilaminonaftalén-1-(N-(2-aminoetil)sulfonamida-dansil-etilendiamina, cadaverina Oregon Green® 488 (número de catálogo 0-10465, Molecular Probes), dansil-cadaverina, N-(2-aminoetil)-4-amino-3,6-disulfuro-1,8-naftalimida, sal dipotásica (dietilendiamina de amarillo Lucifer) o etilendiamina de rodamina B (número de catálogo L 2424, Molecular Probes) o una sonda fluorescente derivatizada con tiol, por ejemplo, L-cistina BODIPY® FL (número de catálogo B-20340, Molecular Probes). También puede utilizarse biotina.

La solicitud copendiente de los presentes inventores n.º GB 1418984 proporciona un conjugado que comprende una proteína, péptido y/o polímero unido a una carga que contiene maitansina mediante un conector, un reactivo de conjugación útil para formar dichos conjugados y un compuesto que contiene maitansina para la utilización como carga. Las cargas y compuestos que contienen maitansina consisten en por lo menos dos fracciones de maitansina unidas entre sí mediante un grupo puente no degradable. Dichas maitansinas pueden utilizarse como cargas en la presente invención, y los reactivos y conjugados forman un aspecto de la presente invención. La solicitud copendiente de los presentes inventores da a conocer lo siguiente:

"La presente invención proporciona en un primer aspecto un compuesto que contiene maitansina, en la que por lo menos dos fracciones de maitansina (D) se unen entre sí mediante un grupo puente (Bd). El grupo puente (Bd) es no degradable bajo condiciones fisiológicas. Ventajosamente, el grupo puente (Bd) presenta por lo menos 3 átomos de carbono de cadena y opcionalmente contiene espaciadores de polietilenglicol además de los 3 átomos de carbono de cadena. Ventajosamente, no hay ninguna contigüidad de heteroátomos en el grupo puente. Ventajosamente, el grupo puente no incluye la fracción siguiente: -C(O)-CH(NR<sup>1</sup>X)-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-C(O)-, en la que b es 1, 2 o 3, R<sup>1</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y X es cualquier grupo. El compuesto que contiene maitansina del primer aspecto, en el que están presentes dos fracciones de maitansina, puede representarse mediante la fórmula (I) a continuación:



En un segundo aspecto, la invención proporciona un reactivo de conjugación, que contiene un grupo funcional capaz de reacción con un péptido o proteína y/o un grupo funcional capaz de reaccionar con un polímero, en el que la carga se une al grupo o grupos funcionales mediante uno o más conectores, caracterizado porque el reactivo de conjugación comprende una carga que contiene maitansina que consiste en por lo menos dos fracciones de maitansina unidas entre sí mediante un grupo puente no degradable, con la condición de que, en el caso de que el reactivo de conjugación comprenda un grupo funcional capaz de reacción con un péptido o proteína, el conector que une la carga al grupo funcional capaz de reacción con un péptido o proteína es degradable. En el caso de que el reactivo de conjugación contenga un grupo funcional capaz de reacción con por lo menos un nucleófilo presente en un péptido o proteína, en el que el grupo funcional incluye por lo menos un grupo saliente que se pierde en la

reacción con dicho nucleófilo, la carga que contiene maitansina que consiste en por lo menos dos fracciones de maitansina unidas entre sí mediante un grupo puente no degradable se une ventajosamente al grupo funcional capaz de reacción con por lo menos un nucleófilo presente en el péptido o proteína mediante un conector degradable. El reactivo de conjugación opcionalmente contiene un grupo funcional capaz de reacción con por lo menos un nucleófilo presente en un péptido o proteína, en el que el grupo funcional incluye ventajosamente por lo menos un grupo saliente que se pierde en la reacción con dicho nucleófilo, caracterizado porque el reactivo de conjugación comprende una carga que contiene maitansina que consiste en por lo menos dos fracciones de maitansina, especialmente dos fracciones de maitansina, unidas entre sí mediante un grupo puente no degradable y en que la carga se une al grupo funcional capaz de reacción con por lo menos un nucleófilo presente en el péptido o proteína mediante un conector, especialmente un conector degradable. El conector resulta adecuado para unir el grupo puente a una proteína o péptido capaz de unión a una pareja o diana. Preferentemente, el grupo puente (Bd) de la carga que contiene maitansina (D<sub>2</sub>Bd) está conectado a un conector degradable (Lk<sup>d</sup>) que incluye un grupo degradable que se rompe bajo condiciones fisiológicas. El grupo degradable puede, por ejemplo, ser sensible a condiciones hidrolíticas, especialmente condiciones ácidas, ser susceptible de degradación bajo condiciones reductoras, o ser susceptible de degradación enzimática.

El reactivo que contiene maitansina del segundo aspecto, en el que están presentes dos fracciones de maitansina, puede representarse mediante la fórmula (II) a continuación:



en la que D<sub>2</sub>Bd representa una carga que contiene maitansina que consiste en dos fracciones de maitansina unidas entre sí mediante un grupo puente no degradable, Lk es un conector, especialmente un conector degradable (Ld) y F representa un grupo funcional capaz de reaccionar con un péptido o proteína y/o un grupo funcional capaz de reaccionar con un polímero.

La presente invención proporciona, además, un procedimiento para la conjugación de un péptido, proteína y/o un polímero, que comprende hacer reaccionar dicho péptido, proteína y/o polímero con un reactivo de conjugación del segundo aspecto de la invención. Al hacer reaccionar el reactivo de conjugación con un péptido o polímero, dicho reactivo de conjugación es ventajosamente capaz de reaccionar con por lo menos un nucleófilo presente en dicho péptido o proteína, en el que dicho reactivo ventajosamente contiene por lo menos un grupo saliente que se pierde en la reacción con dicho nucleófilo.

La invención proporciona, además, en un tercer aspecto, un conjugado que comprende una proteína, péptido y/o polímero unido a una carga que contiene maitansina mediante un conector, caracterizado porque la carga que contiene maitansina consiste en por lo menos dos fracciones de maitansina unidas entre sí mediante un grupo puente no degradable. En el caso de que el conjugado comprenda una proteína o péptido, el conector que une la carga a la proteína o péptido ventajosamente es degradable. El conjugado del tercer aspecto de la invención puede, por ejemplo, comprender una fracción de fármaco que contiene maitansina (D<sub>2</sub>Bd) unida mediante un conector (Lk), especialmente un conector degradable (Lk<sup>d</sup>), a una proteína o péptido (Ab) capaz de unirse a una pareja o diana, en el que la fracción de fármaco que contiene maitansina (D<sub>2</sub>Bd) comprende por lo menos dos fracciones de maitansina (D) unidas entre sí mediante un grupo puente no degradable (Bd). Un conjugado que contiene maitansina del tercer aspecto de la invención, en el que están presentes dos fracciones de maitansina (D), puede representarse mediante la fórmula (III) a continuación:



El conector (Lk) ventajosamente es un conector degradable (Lk<sup>d</sup>) que incluye un grupo degradable que se escinde bajo condiciones fisiológicas, separando la fracción de fármaco que contiene maitansina (D<sub>2</sub>Bd) que comprende por lo menos dos fracciones de maitansina (D) unidas entre sí mediante un grupo puente (Bd) de la proteína o péptido (Ab) capaz de unirse a una pareja o diana. El grupo degradable puede, por ejemplo, ser sensible a condiciones hidrolíticas, especialmente condiciones ácidas, ser susceptible de degradación bajo condiciones reductoras, o ser susceptible de degradación enzimática. El grupo puente no degradable (Bd) no contiene grupos que sean susceptibles de escindirse bajo las mismas condiciones que aquellas bajo las que se escinde el grupo degradable en el conector degradable.

El compuesto que contiene maitansina del primer aspecto de la invención puede, por ejemplo, comprender o consistir en por lo menos dos fracciones de maitansina (D), especialmente dos fracciones de maitansina, unidas entre sí mediante un grupo puente (Bd) que presenta por lo menos 3 átomos de carbono de cadena, especialmente por lo menos 7 átomos de carbono de cadena, y unidades opcionales de polietilenglicol además de los átomos de carbono de cadena, con la condición de que no haya contigüidad de los heteroátomos en el grupo puente y con la condición de que el grupo puente no incluya la fracción siguiente: -C(O)-CH(NR<sup>1</sup>X)-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-C(O)-, en la que b es 1, 2 o 3, R<sup>1</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub>, y X es cualquier grupo. Opcionalmente, el grupo puente incorpora entre 0 y 8 grupos carbonilo, especialmente entre 2 y 8 grupos carbonilo. El grupo puente opcionalmente incorpora entre 0 y 4 dobles enlaces carbono-carbono insaturados, y/o entre 0 y 4 grupos arilo o heteroarilo C<sub>3</sub> a C<sub>10</sub> en la cadena. Opcionalmente, la cadena presenta intercalados entre 0 y 11, especialmente entre 2 y 11,

heteroátomos de cadena seleccionados de entre N, O y S, con la condición de que no haya contigüidad de heteroátomos. Ventajosamente, se sustituye un átomo de carbono de cadena en el grupo puente por un grupo conector colgante seleccionado de entre amina, carboxi, alquino, azida, hidroxilo o tiol. Ventajosamente, el grupo puente incluye por lo menos un enlace amida en la cadena."

5

Preferentemente, la carga es un agente terapéutico, especialmente uno de los mencionados anteriormente.

### La proteína

10 Por conveniencia en la presente sección y en otros sitios, debe entenderse que el término "proteína" incluye "proteína y péptido", excepto en donde el contexto requiera lo contrario.

Entre las proteínas adecuadas que pueden estar presentes en los conjugados de la invención se incluyen, por ejemplo, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, enzimas, citoquinas, quimioquinas, receptores, factores sanguíneos, hormonas peptídicas, toxinas, proteínas de transcripción o proteínas multiméricas.

15

Entre los enzimas se incluyen enzimas específicos de carbohidratos, enzimas proteolíticos y similares, por ejemplo, las oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas dadas a conocer en la patente US n.º 4.179.337. Entre los enzimas específicos de interés se incluyen asparaginasa, arginasa, adenosina desaminasa, superóxido dismutasa, catalasa, quimiotripsina, lipasa, uricasa, bilirrubina oxidasa, glucosa oxidasa, glucuronidasa, galactosidasa, glucocerebrosidasa, glucuronidasa y glutaminasa.

20

Entre las proteínas sanguíneas se incluyen albúmina, transferrina, factor VII, factor VIII o factor IX, factor de von Willebrand, insulina, ACTH, glucógeno, somatostatina, somatotropinas, timosina, hormona paratiroidea, hormonas pigmentarias, somatomedinas, eritropoyetina, hormona luteinizante, factores liberadores hipotalámicos, hormonas antidiuréticas, prolactina, interleuquinas, interferones, por ejemplo, IFN- $\alpha$  o IFN- $\beta$ , factores estimulantes de colonias, hemoglobina, citoquinas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, gonadotropina coriónica, hormona foliculoestimulante, hormona estimulante de tiroides y activador del plasminógeno tisular.

25

Otras proteínas de interés son las proteínas alergénicas que dan a conocer Dreborg et al., Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst. (1990) 6 315-365 como de alergenicidad reducida al conjugarlas con un polímero, tal como poli(óxido de alquileño) y, en consecuencia, que resultan adecuadas para el uso como inductores de tolerancia. Entre los alérgenos dados a conocer se encuentran el antígeno E de ambrosia, veneno de abeja melífera, alérgeno de ácaro y similares.

30

Resultan de interés glucopéptidos tales como inmunoglobulinas, ovoalbúmina, lipasa, glucocerebrosidasa, lectinas, activador del plasminógeno tisular e interleuquinas glucosiladas, interferones y factores estimulantes de colonias, al igual que inmunoglobulinas tales como IgG, IgE, IgM, IgA, IgD y fragmentos de las mismas.

35

Resultan de particular interés las proteínas de unión a receptores y ligandos y los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se utilizan en medicina clínica con fines diagnósticos y terapéuticos. Los conjugados de anticuerpo-fármaco, especialmente en los que el fármaco es un fármaco citotóxico, por ejemplo, una auristatina o un maitansinoide, son una realización especialmente preferente de la invención.

40

La proteína puede derivatizarse o funcionalizarse si se desea. En particular, antes de la conjugación, la proteína, por ejemplo, una proteína nativa, puede haberse hecho reaccionar con diversos grupos de bloqueo para proteger grupos sensibles en la misma, o puede haberse conjugado previamente con uno o más polímeros u otras moléculas. Puede contener una etiqueta de polihistidina, que durante la reacción de conjugación puede ser la diana del reactivo de conjugación.

45

Unión de la proteína o péptido, y reactivos de conjugación

50

Los reactivos de conjugación de la invención son del tipo general dado a conocer en los documentos n.º WO 2005/007197 y n.º WO 2010/000393. Las agrupaciones funcionales II y II' son equivalentes químicos uno de otro. Al reaccionar un reactivo que contiene un grupo II con una proteína, se pierde un primer grupo saliente L, formando *in situ* un reactivo de conjugación que contiene un grupo II' que reacciona con un primer nucleófilo. A continuación, se pierde el segundo grupo saliente L y ocurre una reacción con un segundo nucleófilo. De esta manera, como alternativa a utilizar un reactivo que contiene la agrupación funcional II como material de partida, pueden utilizarse reactivos que contienen la agrupación funcional II' como material de partida.

55

Un grupo saliente L puede ser, por ejemplo, -SP, -OP, -SO<sub>2</sub>P, -OSO<sub>2</sub>P, -N+PR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, halógeno o -OØ, en los que P representa un átomo de hidrógeno o un alquilo (preferentemente un alquilo C<sub>1-6</sub>), arilo (preferentemente fenilo) o alquilarilo (preferentemente alquil C<sub>1-6</sub>-fenilo), o es un grupo que incluye una parte -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>- en la que n es un número igual a dos o superior, y cada uno de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> representa independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>, o un grupo P, y Ø representa un grupo de arilo sustituido, especialmente fenilo, que contiene por lo menos un sustituyente aceptor de electrones, por ejemplo, -CN, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -COH, -CH<sub>2</sub>OH, -COR<sup>a</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OCOR<sup>a</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NHCO R<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>, COR<sup>a</sup>, -NHCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NPCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NO, -NHOH, -NR<sup>a</sup> OH, -C=N-

65

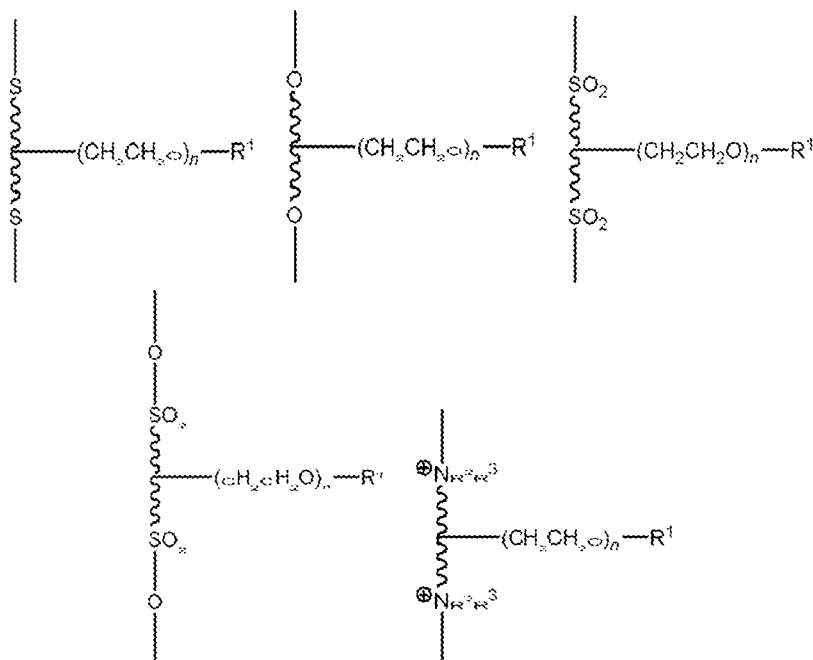
$\text{NHCOR}^a$ ,  $-\text{C}=\text{N}-\text{NR}^a$ ,  $\text{COR}^a$ ,  $-\text{N}+\text{R}^a_3$ ,  $-\text{N}+\text{HR}^a_2$ ,  $-\text{N}+\text{H}_2\text{R}^a$ , halógeno, especialmente cloro o, especialmente, flúor,  $-\text{C}\equiv\text{CR}^a$ ,  $-\text{C}=\text{CR}^a_2$  y  $-\text{C}=\text{CHR}^a$ , en los que cada  $\text{R}^a$  representa un átomo de hidrógeno o un alquilo (preferentemente un alquilo  $\text{C}_{1-6}$ ), arilo (preferentemente fenilo) o alquilarilo (preferentemente alquil  $\text{C}_{1-6}$ -fenilo).

- 5 Los reactivos e conjugación en los que P representa un grupo que incluye una parte  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ , en la que "n" es un número igual a dos o superior, son el objeto de la solicitud copendiente de los presentes inventores n.º GB 1418186. Dicha solicitud da a conocer lo siguiente:

10 "El grupo saliente puede incluir, por ejemplo,  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^1$ , en donde  $\text{R}^1$  es un grupo de bloqueo. Puede utilizarse un abanico muy amplio de grupos de bloqueo.  $\text{R}^1$  puede ser, por ejemplo, un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo, especialmente un grupo alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , particularmente un grupo metilo, o un grupo arilo sustituido opcionalmente, por ejemplo, un grupo fenilo sustituido opcionalmente, por ejemplo, un grupo toliilo. Alternativamente, el grupo de bloqueo puede incluir un grupo funcional, tal como un grupo carboxilo o un grupo amina. Dichos grupos de bloqueo pueden presentar, por ejemplo, la fórmula  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  o  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ , y pueden prepararse mediante funcionalización de la unidad terminal de una cadena  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ . Alternativamente, en lugar de estar terminados en un grupo de bloqueo, el grupo  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$  puede presentar dos puntos de unión dentro del reactor de conjugación, de manera que está presente el equivalente químico de dos grupos salientes, capaces de reaccionar con dos nucleófilos.

20 La parte  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$  del grupo saliente se basa en PEG, polietilenglicol. El PEG puede ser de cadena lineal o ramificada, y puede derivatizarse o funcionalizarse de cualquier manera. "n" es un número igual a 2 o superior, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Por ejemplo, "n" puede ser cualquier número entre 5 y 9. Alternativamente, "n" puede ser un número igual a 10 o superior. No hay un límite superior particular para "n". "n" puede ser, por ejemplo, 150 o inferior, por ejemplo 120 o inferior, por ejemplo 100 o inferior. Por ejemplo, "n" puede ser un número entre 2 y 150, por ejemplo, entre 7 y 150, por ejemplo, entre 7 y 120. La parte PEG  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$  de un grupo saliente puede presentar, por ejemplo, un peso molecular de entre 1 y 5 kDa; puede ser, por ejemplo, de 1 kDa, 2 kDa, 3 kDa, 4 kDa o 5 kDa. Un grupo saliente puede contener, si se desea, dos o más partes  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$  separadas por uno o más espaciadores.

30 Un grupo saliente en un reactivo de conjugación según la invención es convenientemente de fórmula  $-\text{SP}$ ,  $-\text{OP}$ ,  $-\text{SO}_2\text{P}$ ,  $-\text{OSO}_2\text{P}$ ,  $-\text{N}+\text{PR}^2\text{R}^3$ , en donde P es un grupo que incluye una parte  $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$  y cada uno de  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  representa independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , o un grupo P. Preferentemente, cada uno de  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  representa un grupo alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , especialmente un grupo metilo, o especialmente, un átomo de hidrógeno. Alternativamente, el reactivo de conjugación puede incluir un grupo de fórmula  $-\text{S-P-S-}$ ;  $-\text{O-P-O-}$ ;  $-\text{SO}_2-\text{P}-\text{SO}_2-$ ;  $-\text{OSO}_2-\text{P}-\text{OSO}_2-$  y  $-\text{N}+\text{R}^2\text{R}^3-\text{P}-\text{N}+\text{R}^2\text{R}^3-$ . Entre los grupos específicos de este tipo se incluyen  $-\text{S}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{S-}$ ,  $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{O-}$ ;  $-\text{SO}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{SO}_2-$ ;  $-\text{OSO}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{OSO}_2-$ ; o bien  $-\text{N}+\text{R}^2\text{R}^3-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{N}+\text{R}^2\text{R}^3-$ . También pueden incluir grupos del tipo:



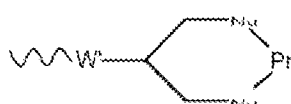


en donde el grupo  $-(CH_2CH_2O)_n-$  es portado por cualquier grupo de enlace adecuado, por ejemplo, un grupo alquilo. Dichos grupos divalentes son químicamente equivalentes a dos grupos salientes capaces de reaccionar con dos nucleófilos".

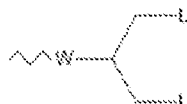
5 Un grupo saliente especialmente preferente L presente en un nuevo reactivo de conjugación según la presente invención es -SP o -SO<sub>2</sub>P, especialmente -SO<sub>2</sub>P. Dentro de dicho grupo, una realización preferente es una en que P representa un fenilo o, especialmente, un grupo tosilo. Otra realización preferente es una en que P representa un grupo que incluye una parte  $-(CH_2CH_2O)_n-$ .

10 Preferentemente, W representa un grupo ceto, y preferentemente W' representa un grupo ceto.

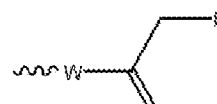
Preferentemente, las agrupaciones F' y F presentan la fórmula:



(Ia)

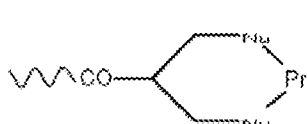


(IIa) o

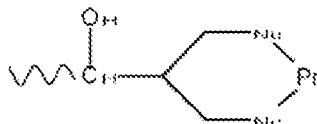


(II'a)

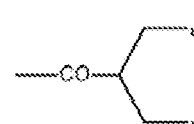
15 especialmente



(Ib)

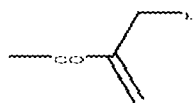


(Ic)



(IIb)

20 o



(II'b).

25 Los grupos nucleofílicos en las proteínas son proporcionados, por ejemplo, por residuos de cisteína, lisina o histidina, y Nu puede ser, por ejemplo, un átomo de azufre o un grupo amina. En una realización preferente de la invención, cada Nu representa un átomo de azufre presente en un residuo de cisteína presente en la proteína. Dichas estructuras pueden obtenerse mediante reducción de un enlace disulfuro presente en la proteína. En otra realización, cada Nu representa un grupo imidazol presente en un residuo de histidina presente en una etiqueta de polihistidina unida a dicha proteína.

### 30 Procedimientos de conjugación

Los reactivos de conjugación según la invención pueden hacerse reaccionar con una proteína o péptido para formar un conjugado según la invención, y dicha reacción forma un aspecto adicional de la invención. De esta manera, se hace reaccionar un reactivo de conjugación que incluye la agrupación funcional II o II' con una proteína o péptido para formar un conjugado que incluye la agrupación I. El producto inmediato del procedimiento de conjugación es un conjugado que contiene un grupo aceptor de electrones W. Sin embargo, el procedimiento de conjugación es reversible bajo condiciones adecuadas. Lo anterior puede resultar deseable para algunas aplicaciones, por ejemplo, en que se requiera la liberación rápida de la proteína, aunque para otras aplicaciones, puede resultar no deseable la liberación rápida de la proteína. Por lo tanto, puede resultar deseable estabilizar los conjugados mediante reducción de la fracción aceptora de electrones W, proporcionando una fracción que impida la liberación de la proteína. De acuerdo con lo anterior, el procedimiento descrito anteriormente puede comprender una etapa opcional adicional de reducción del grupo aceptor de electrones W en el conjugado. La utilización de un borohidruro, por ejemplo, borohidruro sódico, cianoborohidruro sódico, borohidruro potásico o triacetoxiborohidruro sódico, como agente reductor resulta particularmente preferente. Entre otros agentes reductores que pueden utilizarse se incluyen, por ejemplo, cloruro de estaño (II), alcóxidos tales como alcóxido de aluminio, e hidruro de litio y aluminio.

De esta manera, por ejemplo, una fracción W que contiene un grupo ceto puede reducirse a una fracción que contiene un grupo CH(OH); puede obtener un grupo éter CH.OR<sup>a</sup> mediante la reacción de un grupo hidroxilo con un agente eterificante; puede obtenerse un grupo éster CH.O.C(O)R<sup>a</sup> mediante la reacción de un grupo hidroxilo con un agente acilante; puede prepararse un grupo amina CH.NH<sub>2</sub>, CH.NHR<sup>a</sup> o CH.NR<sub>2</sub> a partir de una cetona mediante aminación reductiva; o puede formarse una amida CH.NHC(O)R<sup>a</sup> o CH.N(C(O)R<sup>a</sup>)<sub>2</sub> mediante acilación de una amina. Puede reducirse una sulfona a sulfóxido, sulfuro o éter de tiol.

Una característica clave de la utilización de reactivos de conjugación de la invención es que se conjugan cruzadamente un grupo saliente  $\alpha$ -metileno y un doble enlace con una función aceptora de electrones que sirve de fracción activadora de Michael. En el caso de que el grupo saliente sea propenso a la eliminación en el reactivo de funcionalidad cruzada y no al desplazamiento directo y el grupo aceptor de electrones sea una fracción activadora adecuada para la reacción de Michael, puede ocurrir en este caso la bis-alquilación intramolecular secuencial mediante reacciones consecutivas de Michael y de Michael inversa. La fracción saliente sirve para enmascarar un doble enlace conjugado latente que no resulta expuesto hasta después de ocurrir la primera alquilación, proporcionando un reactivo que incluye la agrupación funcional II' y resultados de bis-alquilación de las reacciones secuenciales e interactivas de Michael y Michael inversa. Los agentes alquilantes de funcionalidad cruzada pueden contener múltiples enlaces conjugados con el doble enlace o entre el grupo saliente y el grupo aceptor de electrones.

En el caso de que la unión a la proteína sea mediante dos átomos de azufre derivados de un enlace disulfuro en la proteína, el procedimiento puede llevarse a cabo mediante reducción del enlace disulfuro, seguido de que el producto reducido reaccione con el reactivo según la invención. Preferentemente, el enlace disulfuro se reduce y se elimina cualquier exceso de agente reductor, por ejemplo, mediante intercambio de tampones, antes de introducir el reactivo de conjugación. El enlace disulfuro puede reducirse, por ejemplo, con ditioneitol, mercaptoetanol o tris-carboxietilfosfina, utilizando métodos convencionales.

Las reacciones de conjugación pueden llevarse a cabo bajo condiciones similares a los procedimientos de conjugación conocidos, incluyendo las condiciones dadas a conocer en los documentos n.º WO 2005/007197, n.º WO 2009/047500, n.º WO 2014/064423 y n.º WO 2014/064424. El procedimiento, por ejemplo, puede llevarse a cabo en un solvente o mezcla de solventes en la que son solubles todos los reactivos. Por ejemplo, puede dejarse que la proteína reaccione directamente con el reactivo de conjugación de polímero, en un medio de reacción acuoso. Dicho medio de reacción también puede estar tamponado, según los requisitos de pH del nucleófilo. El pH óptimo para la reacción generalmente será de por lo menos 4,5, normalmente de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,5, preferentemente de entre aproximadamente 6,0 y 7,5. Las condiciones óptimas de reacción evidentemente dependerán de los reactivos específicos utilizados.

Las temperaturas de reacción de entre 3 °C y 40 °C generalmente resultan adecuadas al utilizar un medio de reacción acuoso. Las reacciones llevadas a cabo en medios orgánicos (por ejemplo, THF, acetato de etilo o acetona) habitualmente se llevan a cabo a temperaturas de hasta la temperatura ambiente. En una realización preferente, la reacción se lleva a cabo en tampón acuoso que puede contener una proporción de solvente orgánico, por ejemplo, hasta 20 % en volumen de solvente orgánico, habitualmente entre 5 % y 20 % en volumen de solvente orgánico.

La proteína puede conjugarse eficazmente utilizando un equivalente estequiométrico o un ligero exceso de reactivo de conjugación. Sin embargo, también resulta posible llevar a cabo la reacción de conjugación con una estequiometría en exceso de reactivo de conjugación, y esto puede resultar deseable para algunas proteínas. El reactivo en exceso puede eliminarse con facilidad, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico o HPLC durante la posterior purificación del conjugado.

Evidentemente resulta posible conjugar más de un reactivo de conjugación con una proteína, en la que la proteína contiene suficientes puntos de unión adecuados. Por ejemplo, en una proteína que contenga dos enlaces disulfuro diferentes, o en una proteína que contenga un enlace disulfuro y que porte, además, una etiqueta de polihistidina, resulta posible conjugar dos moléculas del reactivo por cada molécula de proteína, y dichos conjugados forman parte de la presente invención.

#### El conector

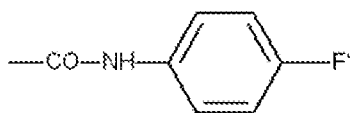
El conector que conecta el agente terapéutico, diagnóstico o de marcaje con la parte de unión de la proteína o péptido en los conjugados dados a conocer en la presente memoria o con la agrupación funcional en reactivos de conjugación dados a conocer en la presente memoria, debe incluir una o más partes PEG tal como se ha indicado anteriormente. Puede contener, además, cualesquiera otros grupos deseados, particularmente cualesquiera de los grupos convencionales que se encuentran comúnmente en este campo.

Subsección (i). En la presente memoria se da a conocer que el conector entre la carga y la agrupación de fórmula F'IP, y particularmente esa parte del conector inmediatamente contigua a la agrupación de fórmula F'/F, puede incluir un grupo alquileo (preferentemente, un grupo alquileo C<sub>1-10</sub>), o un grupo arilo o heteroarilo sustituido opcionalmente, cualquiera de los cuales puede estar terminado o interrumpido por uno o más átomos de oxígeno, átomos de azufre, grupos -NR<sup>a</sup> (en los que R<sup>a</sup> representa un átomo de hidrógeno o un alquilo (preferentemente alquilo C<sub>1-6</sub>), arilo (preferentemente fenilo), o alquilarilo (preferentemente el grupo alquil C<sub>1-6</sub>-fenilo), grupos ceto, grupos -O-CO-, grupos -CO-O-, -O-CO-O-, -O-CO-NR<sup>a</sup>-, -NR-CO-O-, -CO-NR<sup>a</sup>- y/o NR<sup>a</sup>.CO-. Entre los grupos arilo adecuados se incluyen grupos fenilo y naftilo, mientras que entre los grupos heteroarilo adecuados se incluyen piridina, pirrol, furano, pirano, imidazol, pirazol, oxazol, piridazina, pirimidina y purina. Son grupos de enlace especialmente adecuados, los grupos heteroarilo o, especialmente, los grupos arilo, especialmente los grupos fenilo. Estos pueden ser contiguos a una parte adicional del grupo de enlace que es, o que contiene, un grupo -NR<sup>a</sup>.CO- o -CO.NR<sup>a</sup>-, por ejemplo, un grupo -NH.CO-

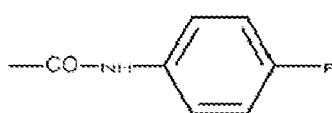
o -CO.NH-. Aquí y en otros sitios a lo largo de la presente especificación, en donde está presente un grupo  $R^a$ , preferentemente es un alquilo  $C_{1-4}$ , especialmente un grupo metilo o, especialmente, un átomo de hidrógeno.

Entre los sustituyentes que pueden estar presentes en un arilo sustituido opcionalmente, especialmente fenilo, o grupo heteroarilo, se incluyen, por ejemplo, uno o más de los sustituyentes iguales o diferentes seleccionados de entre alquilo (preferentemente alquilo  $C_{1-4}$ , especialmente metilo, opcionalmente sustituido con OH o  $CO_2H$ ), -CN, -NO<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -COH, -CH<sub>2</sub>OH, -COR<sup>a</sup>, -OR<sup>a</sup>, -OCOR<sup>a</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -SR<sup>a</sup>, -SOR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NHCOR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>COR<sup>a</sup>, -NHCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>.CO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -NO, -NHOH, -NR<sup>a</sup>.OH, -C=N-NHCOR<sup>a</sup>, -C=N-NR<sup>a</sup>.COR<sup>a</sup>, -N<sup>+</sup>R<sup>a</sup><sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>, -N<sup>+</sup>HR<sup>a</sup><sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, halógeno, por ejemplo flúor o cloro, -C≡CR<sup>a</sup>, -C=CR<sup>a</sup><sub>2</sub> y -C=CHR<sup>a</sup>, en los que R<sup>a</sup> representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (preferentemente alquilo  $C_{1-6}$ ), arilo (preferentemente fenilo) o alquilarilo (preferentemente alquilo  $C_{1-6}$ -fenilo). Se da a conocer especialmente la presencia de sustituyentes aceptores de electrones. Entre los sustituyentes dados a conocer se incluyen, por ejemplo, CN, NO<sub>2</sub>, -OR<sup>a</sup>, -OCOR<sup>a</sup>, -SR<sup>a</sup>, -NHCOR<sup>a</sup>, -NR<sup>a</sup>.COR<sup>a</sup>, -NHOH y -NR<sup>a</sup>.COR<sup>a</sup>.

Se da a conocer que el conector incluye, por ejemplo, uno de los grupos anteriormente indicados contiguos a la agrupación F'/F. Resultan especialmente preferentes los conjugados y reactivos de conjugación que incluyen la agrupación:

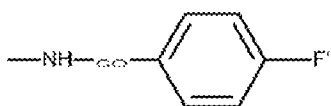


(Va) o

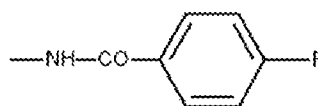


(VIa)

o, especialmente:



(Vb) o

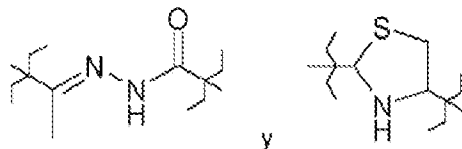


(VIb).

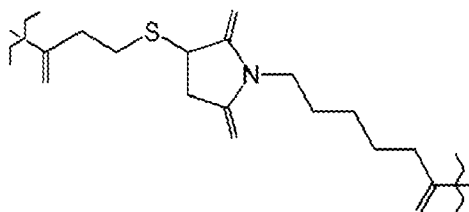
En las fórmulas anteriormente indicadas, se da a conocer que F' presenta la fórmula Ia o Ib, anteriormente, y preferentemente F presenta la fórmula IIa, II'a, IIb o II'b, anteriormente.

Subsección (ii). En la presente memoria se da a conocer que el conector puede contener un grupo degradable, es decir, puede contener un grupo que se escinde bajo condiciones fisiológicas, separando la carga de la proteína a la que está unida o a la que estará unida. Alternativamente, puede ser un conector que no sea escindible bajo condiciones fisiológicas. En el caso de un conector que se escinde bajo condiciones fisiológicas, preferentemente es escindible bajo las condiciones intracelulares. En el caso de que la diana sea intracelular, se da a conocer que el conector es sustancialmente insensible a las condiciones extracelulares (es decir, de manera que no impida la entrega en la diana intracelular de una dosis suficiente del agente terapéutico).

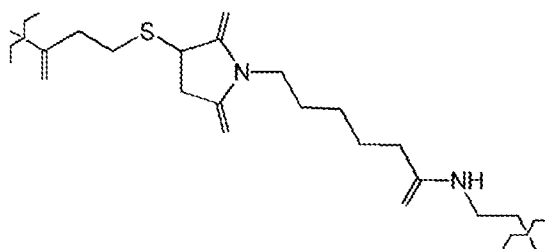
En el caso de que el conector contenga un grupo degradable, este es generalmente sensible a condiciones hidrolíticas, por ejemplo, puede ser un grupo que se degrade a determinados valores de pH (p. ej., condiciones ácidas). Pueden encontrarse condiciones hidrolíticas/ácidas, por ejemplo, en los endosomas o lisosomas. Entre los ejemplos de grupos susceptibles de hidrólisis bajo condiciones ácidas se incluyen hidrazonas, semicarbazonas, tiosemicarbazonas, amidas cis-aconíticas, ortoésteres y cetales. Entre los ejemplos de grupos susceptibles a las condiciones hidrolíticas se incluyen:



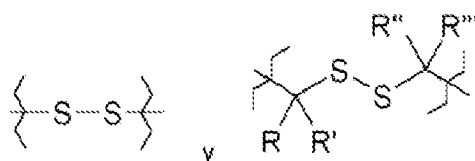
En una realización preferente, el conector incluye:



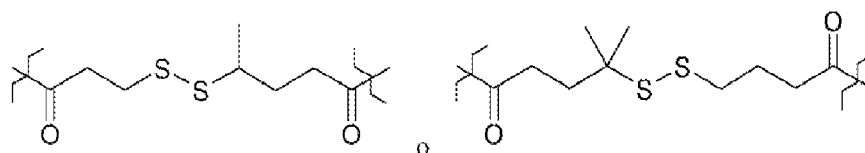
Por ejemplo, puede incluir:



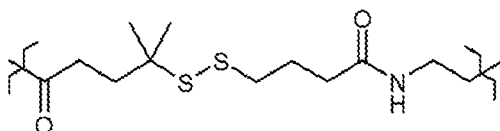
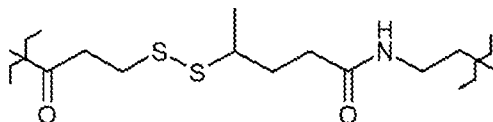
El conector también puede ser susceptible de degradación bajo condiciones reductoras. Por ejemplo, puede contener un grupo disulfuro que sea escindible al exponerlo a agentes reductores biológicos, tales como tioles. Entre los ejemplos de grupos disulfuro se incluyen:



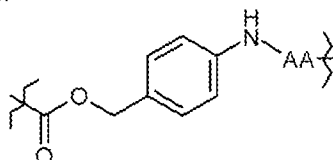
en los que R, R', R'' y R''' son, cada uno independientemente, hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub>. En una realización dada a conocer, el conector incluye:



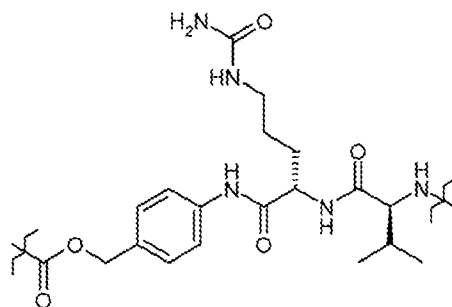
Por ejemplo, puede incluir:



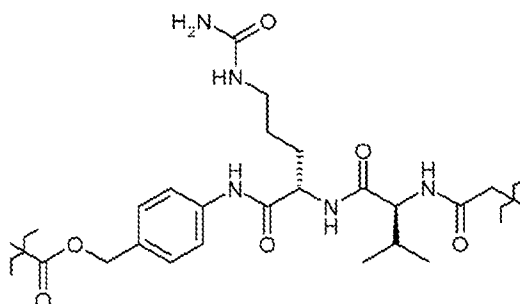
El conector puede contener, además, un grupo que es susceptible de degradación enzimática, por ejemplo, puede ser susceptible de escisión por una proteasa (p. ej., una proteasa lisosómica o endosómica) o peptidasa. Por ejemplo, puede contener un grupo peptídico que comprende por lo menos un, por ejemplo, por lo menos dos, o por lo menos tres residuos aminoácidos (p. ej., Phc-Lcu, Gly-Phc-Lcu-Gly, Val-Ala, Val-Cit, Phe-Lys). Por ejemplo, puede incluir una cadena de aminoácidos que presente entre 1 y 5, por ejemplo, entre 2 y 4 aminoácidos. Otro ejemplo de un grupo susceptible de degradación enzimática es:



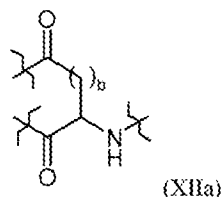
en el que AA representa una secuencia de aminoácidos específica de proteasa, tal como Val-Cit. En una realización preferente, el conector incluye:



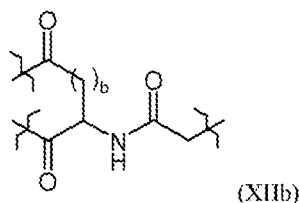
Por ejemplo, puede incluir:



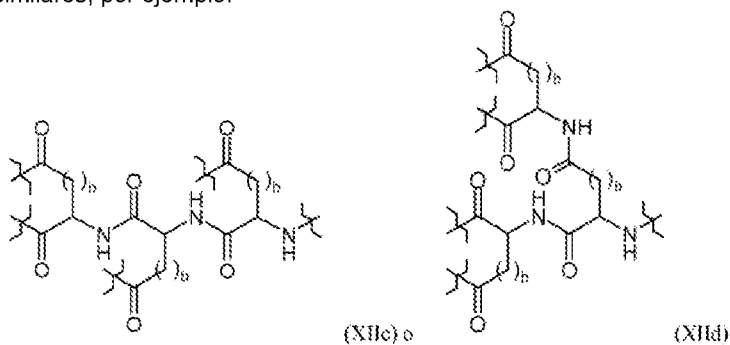
5 El conector puede portar una única carga D, o más de un grupo D. Pueden incorporarse múltiples grupos D mediante la utilización de un conector ramificado, que puede incorporar, por ejemplo, un aspartato, glutamato o residuo similar. Lo anterior introduce un elemento de ramificación de fórmula:



10 en la que "b" es 1, 2 o 3, en donde b=1 es aspartato y b=2 es glutamato; b=3 representa una realización preferente. Cada una de las fracciones acilo en la fórmula anteriormente proporcionada puede acoplarse con un grupo D. El grupo de ramificación puede incorporar un grupo -CO.CH<sub>2</sub>; de esta manera:

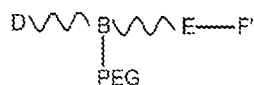


15 Si se desea, el aspartato, glutamato o residuo similar puede acoplarse con residuos adicionales de aspartato y/o glutamato y/o residuos similares, por ejemplo:

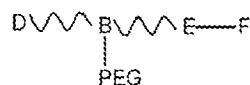


etc.

Tal como se pondrá de manifiesto, son posibles muchas configuraciones alternativas para el conector entre la agrupación F/F' y la carga. Una configuración preferente puede representarse esquemáticamente de la manera siguiente:



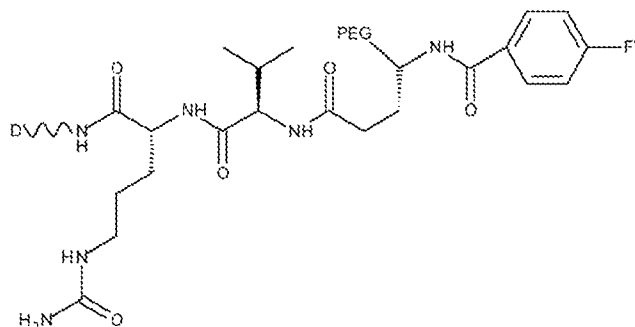
(VII)



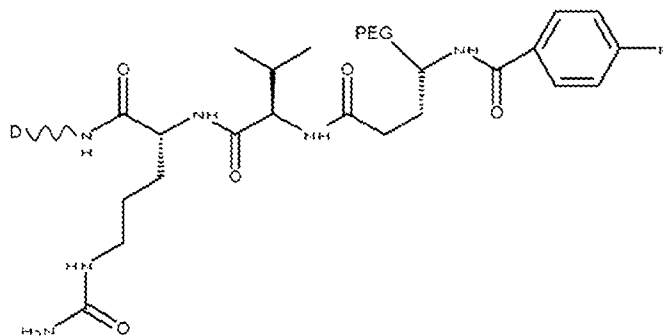
(VIII)

- 5 en la que E representa uno de los grupos mencionados en la subsección (i), anteriormente, y B representa uno de los grupos mencionados en dicha subsección (ii).

Se muestra a continuación una construcción particularmente preferente específica:



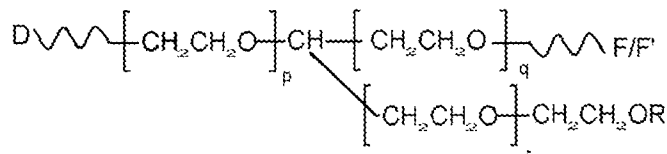
(VIIa)



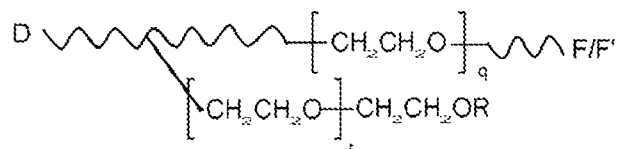
(VIIIa)

en las que F' y F presentan los significados proporcionados anteriormente.

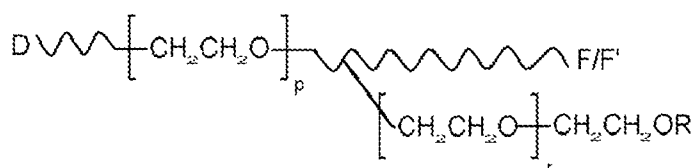
- 15 Subsección (ii). El conector que conecta el agente terapéutico, diagnóstico o de marcaje con la parte de unión de la proteína o péptido en los conjugados dados a conocer en la presente memoria o con la agrupación funcional en los reactivos de conjugación dados a conocer en la presente memoria, puede incluir PEG adicional, además de la cadena de PEG colgante que presenta un grupo terminal de fórmula  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OR}$ . Puede contener, por ejemplo, PEG en el esqueleto del conector, mostrado esquemáticamente de la manera siguiente:



(IX)



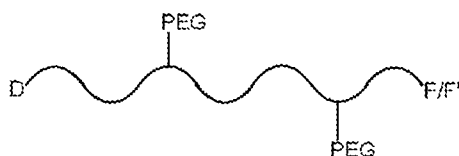
(X)



(XI)

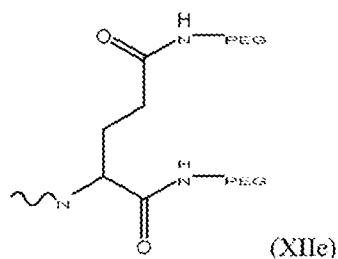
En dichas fórmulas, "p", "q" y "r" representan el número de unidades de PEG presentes en las diversas cadenas de PEG presentes en el conector del conjugado o del reactivo. En aras de la claridad, las unidades de PEG se muestran como unidades de cadena lineal, aunque se entenderá que cualquiera de las unidades puede incluir cadenas ramificadas.

Subsección (iv). El conector que conecta el agente terapéutico, diagnóstico o de marcaje con la parte de unión de la proteína o péptido en los conjugados dados a conocer en la presente memoria o con la agrupación funcional en los reactivos de conjugación dados a conocer en la presente memoria, puede contener dos o más cadenas de PEG colgantes. Lo anterior puede ilustrarse esquemáticamente para dos cadenas de PEG colgantes de la manera siguiente:



y de manera similar evidentemente pueden estar presentes más de dos cadenas de PEG colgantes. El conector puede contener o no PEG adicional además de las cadenas de PEG colgantes, tal como se indica en la subsección (iii), anteriormente.

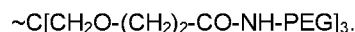
Pueden incorporarse múltiples cadenas de PEG colgantes en el conector utilizando cualquier método adecuado. Puede introducirse, por ejemplo, una cadena de PEG colgante mediante la reacción con cualquier agrupación reactiva presente en cualquiera de las partes de conector comentadas anteriormente. Pueden utilizarse grupos de ramificación de fórmulas (XIIa-d), tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, en una realización específica, pueden incorporarse dos partes de PEG colgantes mediante la utilización de una estructura (XIIa):



Alternativamente, puede introducirse ramificación mediante la utilización de una funcionalidad poliol, por ejemplo:



en la que "s" es 0, 1 o 2, y "t" es 1 a 4. Por ejemplo, en una realización específica, pueden incorporarse tres partes de PEG colgantes mediante la utilización de la estructura:

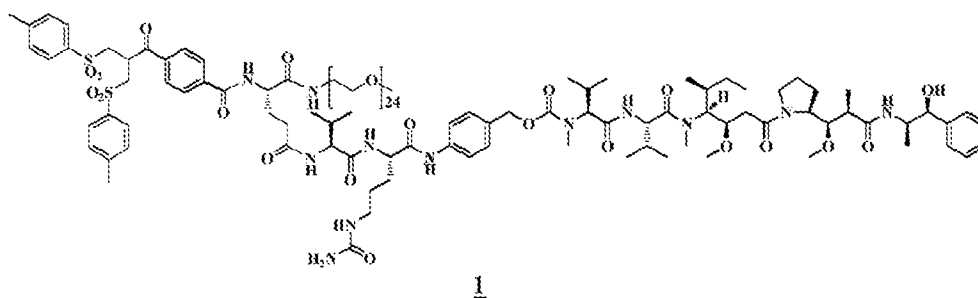


#### Breve descripción de los dibujos

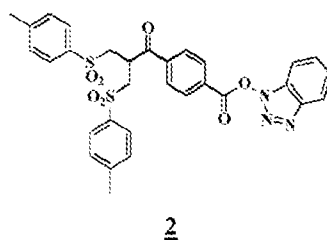
- Las figuras 1 y 2 muestran los resultados del Ejemplo 6.
- La figura 3 muestra los resultados del Ejemplo 7.
- Las figuras 4a, 4b y 4c muestran los resultados del Ejemplo 14.
- Las figuras 5a y 5b muestran los resultados del Ejemplo 15.
- Las figuras 6a, 6c y 6d muestran los resultados del Ejemplo 16.
- Las figuras 7a, 7b y 7c muestran los resultados del Ejemplo 17.
- Las figuras 8a y 8b muestran los resultados del Ejemplo 18.
- Las figuras 9a y 9b muestran los resultados del Ejemplo 19.
- La figura 10 muestra los resultados del Ejemplo 23.
- La figura 11 muestra los resultados del Ejemplo 25.

Los ejemplos a continuación son ilustrativos de la invención.

Ejemplo 1: Síntesis de reactivo de conjugación **1** que comprende una carga citotóxica de auristatina

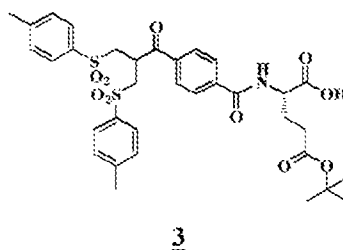


Etapa 1: Síntesis de compuesto **2**.



Se añadió una solución de ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzoico (1,0 g, Nature Protocols, 2006, 1(54), 2241-2252) a hidrato de N-hidroxibenzotriazol (306 mg) en THF anhidro (10 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno. La solución resultante se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota diisopropilcarbodiimida (310 µl). La mezcla de reacción se sometió a agitación durante 20 min a 0 °C antes de calentarla hasta la temperatura ambiente. Se añadió THF adicional (10 ml) a la mezcla de reacción tras 1 h. Transcurridas 18 h, el precipitado formado se filtró y se lavó con THF frío (2x5 ml) antes de secarlo al vacío. El sólido se sometió a agitación con MeOH (10 ml) durante 1 h a temperatura ambiente, se recogió mediante filtración y se lavó secuencialmente con MeOH (2x5 ml) y Et<sub>2</sub>O (5 ml). A continuación, el sólido se secó al vacío, proporcionando ácido bis-tolilsulfonil-propanoil-benzoico de éster de HOBT (compuesto **2**) en forma de un sólido blanco (1,1 g, 88 %). m/z [M+H]<sup>+</sup> (618, 100 %).

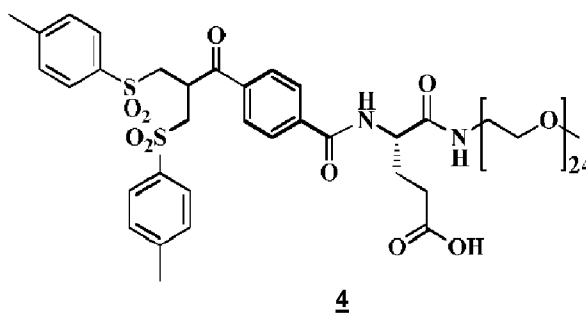
Etapa 2: Síntesis de compuesto **3**.



A una suspensión bajo agitación de (S)-Glu-5-(OtBu) (198 mg) en DMF anhidro (20 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno se añadió N-metilmorfolina (NMM) (107 µl). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C antes de añadir el compuesto **2** (603 mg). La suspensión resultante se sometió a agitación a 0 °C durante 1 h, y a continuación se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta la temperatura ambiente. Transcurridas 19 h, la solución resultante se concentró al v vacío y se purificó mediante cromatografía de columna de fase inversa en una columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido fórmico al 0,1 %, y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido fórmico al 0,1 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-tolilsulfonil-propanoil-benzamida-L-Glu-[OtBu]-[OH] (compuesto **3**) en forma de un sólido blanco (198 mg, 67 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,98 (1H, d), 7,86 (2H), 7,71 - 7,65 (6H, m), 7,36 (4H, d), 4,68 (1H, ddd), 4,34 (1H, q), 3,62 (2H, ddd), 3,50 (2H, ddd), 2,69 (1H ddd), 2,55 - 2,45 (1H, m), 2,48 (6H, s), 2,34-2,16 (2H, m), 1,46 (9H, s); m/z [2M+H]<sup>+</sup> (1371,74 %), [2M-tBu]<sup>+</sup> (1315, 70 %), [M-tBu]<sup>+</sup> (630, 100 %).

Etapa 3: Síntesis de compuesto **4**.



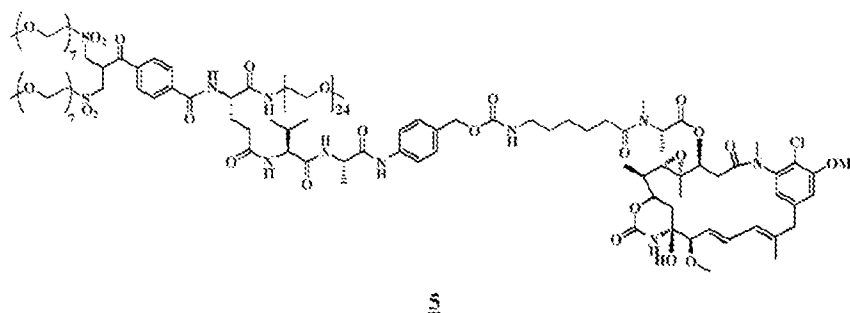


Se disolvió el compuesto **3** (50 mg) y hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris-(dimetilamino)fosfonio (BOP) (40 mg) en DMF anhidro (3 ml), enfriados a 0 °C, y se añadieron a una solución de NH<sub>2</sub>-PEG(24u)-OMe (99 mg) y NMM (10 µl) en DMF anhidro (2 ml). La mezcla de reacción se sometió a agitación a 0 °C y tras 4 h, se añadieron cantidades adicionales de BOP (10 mg) y NMM (2,5 µl) a la mezcla de reacción y se incubaron durante 15 minutos adicionales, antes de almacenarlo a -20 °C durante 18 h. La mezcla de reacción resultante se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía de columna de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido fórmico al 0,1 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido fórmico al 0,1 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-tolilsulfonil-propanoíl-benzamida-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe] en forma de un aceite incoloro (128 mg, 100 %). m/z [M+H]<sup>+</sup> (1757, 100 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (879, 100 %). Se disolvió bis-tolilsulfonil-propanoíl-benzamida-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe] (126,5 mg) en ácido fórmico (2,5 ml) y se sometió a agitación bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Tras 20 h, la mezcla de reacción se concentró al vacío y se secó bajo alto vacío durante 18 h, proporcionando bis-tolilsulfonil-propanoíl-benzamida-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe] (compuesto **4**) en forma de un aceite incoloro (122 mg, suponiendo rendimiento cuantitativo). m/z [M+Na]<sup>+</sup> (1723, 15 %), [M+H]<sup>+</sup> (1700, 100 %). Se utilizó este material sin ninguna purificación adicional.

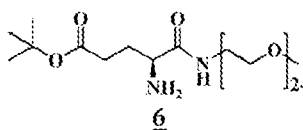
#### Etapa 4: Síntesis de reactivo **1**.

Una solución de compuesto **4** (13,0 mg), HATU (4,1 mg), sal TFA de val-cit-PAB-MMAE (9,0 mg) en DMF (1,0 ml) bajo una atmósfera de argón se enfrió a 0 °C. A lo anterior se añadió NMM (2,0 µl). Tras 1 h, se añadió una cantidad adicional de HATU (4,1 mg) y NMM (2 µl), y tras 1,5 h adicionales, la solución se almacenó a -20 °C durante 72 h. La solución de reacción se concentró al vacío, se disolvió en acetonitrilo (1,0 ml) y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en una columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-tolilsulfonil-propanoíl-benzamida-L-Glu-[NH-PEG(24u)-OMe]-[val-cit-PAB-MMAE] (reactivo **1**) en forma de un aceite incoloro transparente denso (11,4 mg, 56 %). m/z [M+H]<sup>+</sup> (2805, 20 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (1403, 75 %), [M+3H]<sup>3+</sup> (936, 100 %).

#### Ejemplo 2: Síntesis de reactivo de conjugación **5** que comprende una carga citotóxica de maitansinoide



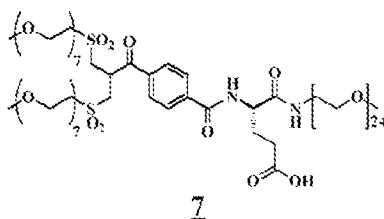
#### Etapa 1: Síntesis de compuesto **6**.



Una solución de Fmoc-L-Glu-(OtBu)-OH (36 mg) en DMF (2 ml) se enfrió a 0 °C bajo una atmósfera de argón y se añadió hexafluorofosfato de (benzotriazol-a-iloxi)tris-(dimetilamino)fosfonio BOP (41 mg), seguido de NH<sub>2</sub>-PEG(24u)-OMe (100 mg) y N,N-diisopropiletilamina (19 µl). Se dejó que la solución se calentase hasta la temperatura ambiente y tras 22 h, se eliminaron los volátiles al vacío. El residuo resultante se disolvió en diclorometano (1 ml) y se purificó mediante cromatografía de columna de fase normal, eluyendo con diclorometano-metanol (100:0 v/v a 80:20 v/v). El

solvente orgánico se eliminó al vacío, proporcionando Fmoc-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe] en forma de un aceite incoloro (84 mg, 67 %). Se añadió piperidina (49  $\mu$ l) a una solución de compuesto Fmoc-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe] (74 mg) en DMF (2 ml) bajo una atmósfera de argón y la solución resultante se sometió a agitación a temperatura ambiente durante 22 h, transcurridas las cuales, se eliminaron los volátiles al vacío. El residuo resultante se trituró con hexano (3x0,7 ml). Se decantó el solvente orgánico cada vez y el residuo resultante se secó al vacío, proporcionando L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe] (compuesto **6**) en forma de un sólido blanco (61 mg, 97 %). m/z [M+H]<sup>+</sup> (1097, 10 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (1035, 100 %).

Etapas 2: Síntesis de compuesto **7**.

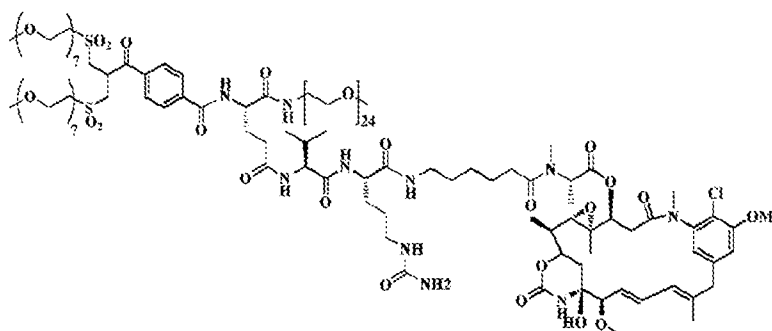


Una solución de compuesto **6** (26,6 mg) en DMF (550  $\mu$ l) se enfrió a 0 °C bajo una atmósfera de argón a la que se añadió HATU (10,5 mg) y la solución se sometió a agitación durante 0,5 h a 0 °C. A lo anterior se añadió una solución de ácido 4-[2,2-bis[alfa-metoxi-ometa-sulfonil hepta(etilenglicol)]acetil]benzoico (32 mg, preparados de manera análoga a ácido 4-[2,2-bis[(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzoico en Nature Protocols, 2006, 1(54), 2241-2252, aunque utilizando alfa-metoxi-omega-mercaptop hepta(etilenglicol) en lugar de 4-metilbencenotiol en DMF (550  $\mu$ l). La solución resultante se sometió a agitación durante 5 minutos a 0 °C antes de añadir NMM (2,9  $\mu$ l) y HATU (10,5 mg). La solución de reacción se dejó bajo agitación a 0 °C durante 2 h antes de calentarla hasta la temperatura ambiente y someterla a agitación durante 3,5 h adicionales. Transcurrido este tiempo, se eliminaron los volátiles al vacío. El residuo resultante se disolvió en agua y acetonitrilo (v/v; 1/1, 1,2 ml) y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido fórmico al 0,1 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido fórmico al 0,1 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-mPEG(7u)sulfona-propanoil-benzamida-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe] en forma de un aceite incoloro (30,5 mg, 55 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOH- $\delta_4$ ) 8,19 (2H, d), 8,04 (2H, d), 4,83 - 4,71 (1H, m), 4,58 (1H, dd, ), 3,92 - 3,83 (6H, m), 3,78 - 3,56 (140H, m), 3,57-3,51 (6H, m), 3,40 (4H, dd), 3,36 (3H, s), 3,35 (6H, s), 2,41 (2H, t), 2,24 - 2,13 (1H, m), 2,10 - 1,98 (1H, m), 1,45 (9H, s); m/z [M+Na]<sup>+</sup> (2243, 50 %), [M+H]<sup>+</sup> (2221, 40 %), [M+Na+2H]<sup>3+</sup> (747, 100 %). Una solución de bis-mPEG(7u)sulfona-propanoil-benzamida-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe] (30 mg) en diclorometano (2 ml) bajo una atmósfera de argón se enfrió a 0 °C a la que se añadió ácido trifluoroacético (500  $\mu$ l) y la solución resultante se sometió a agitación durante 1,5 h. Se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta la temperatura ambiente y se sometió a agitación durante 1 h adicional. Después de este tiempo se eliminaron los volátiles al vacío. La solución resultante se disolvió en agua y acetonitrilo (v/v, 1/1, 0,6 ml) y se purificó mediante cromatografía de columna de fase inversa en una columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-mPEG(7u)sulfona-propanoil-benzamida-L-Glu-[OtBu]-[PEG(24u)-OMe] (compuesto **7**) en forma de un aceite incoloro (20 mg, 68 %). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOH- $\delta_4$ ) 8,19 (2H, d), 8,04 (2H, d), 4,81 - 4,72 (1H, m), 4,59 (1H, dd), 3,92 - 3,84 (6H, m), 3,67 - 3,50 (146H, m), 3,40 (4H, dd), 3,36 (3H, s), 3,35 (6H, s), 2,48 (2H, t), 2,26 - 2,15 (1H, m), 2,15 - 2,03 (1H, m); m/z [M+H]<sup>+</sup> (2165, 55 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (1083, 60 %), [M+2H+Na]<sup>3+</sup> (729, 100 %).

Etapas 3: Síntesis de reactivo **5**

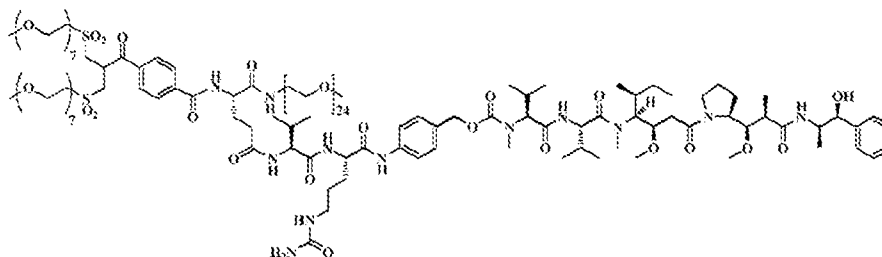
Una solución de compuesto **7** (15,0 mg) en DMF (600  $\mu$ l) se enfrió a 0 °C bajo una atmósfera de argón. Se añadió HATU (2,9 mg) y la solución se sometió a agitación durante 0,5 h a 0 °C. A lo anterior se añadió una solución de valala-PAB-AHX-DM1 (9,2 mg) y NMM (0,8  $\mu$ l) en DMF (600  $\mu$ l), que se había sometido a agitación a temperatura ambiente durante 0,5. Tras 5 minutos, se añadió una cantidad adicional de HATU (2,9 mg) y NMM (0,8  $\mu$ l) y la mezcla de reacción se sometió a agitación a 0 °C. Tras 3 h, se añadió una cantidad adicional de HATU (0,7 mg) y la mezcla de reacción se sometió a agitación a 0 °C. Tras 2 h adicionales, la reacción se almacenó a - 20°C durante 16 h. La solución de reacción se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en una columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-mPEG(7u)sulfona-propanoil-benzamida-L-Glu-[valala-PAB-AHX-DM1]-[PEG(24u)-OMe] (compuesto **5**) en forma de un aceite incoloro transparente denso (14,3 mg, 64 %). RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, MeOH  $\delta_4$ ) (señales características seleccionadas) 5,69 (1H, dd, ), 6,59 (1H, dd), 6,68 (1H, s), 6,69 (1H, d), 7,10 (1H, s), 7,28 (2H, d), 7,57 (2H, d), 8,01 (2H, d), 8,16 (2H, d); m/z [M-AHX-DM1]<sup>+</sup> (2422, 40 %).

Ejemplo 3: Síntesis del reactivo de conjugación **8** que comprende 7 unidades repetidas de grupos salientes poliméricos y una carga citotóxica de maitansinoide

**8**

Una solución de compuesto **7** (12,4 mg) en DMF (500  $\mu$ l) se enfrió a 0 °C bajo una atmósfera de argón. Se añadió HATU (2,4 mg) y la solución se sometió a agitación durante 0,5 h a 0 °C. A lo anterior se añadió una solución de val-cit-AHX-DM1 preparado de manera análoga al compuesto **10A** (6,4 mg), y NMM (0,7  $\mu$ l) en DMF (500  $\mu$ l), que se había sometido a agitación a temperatura ambiente durante 0,5 h. Tras 5 minutos, se añadió una cantidad adicional de HATU (1,2 mg) y NMM (0,4  $\mu$ l) y la mezcla de reacción se sometió a agitación a temperatura ambiente. Tras 2 h, se añadió una cantidad adicional de HATU (1,2 mg) y NMM (0,4  $\mu$ l) y la mezcla de reacción se sometió a agitación a temperatura ambiente. Tras 1 h adicional, la solución de reacción se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-mPEG(7)sulfona-propanoil-benzamida-L-Glu-[val-cit-AHX-DM1]-[PEG(24u)-OMe] **8** en forma de un aceite incoloro transparente denso (9,6 mg, 53 %). m/z [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (3148, 8 %), [M-H<sub>2</sub>O]<sup>2+</sup> (1575, 40 %), [M-H<sub>2</sub>O]<sup>3+</sup> (1050, 100 %), 1036 [M-NHCO-H<sub>2</sub>O]<sup>3+</sup>.

**Ejemplo 4:** Síntesis de reactivo de conjugación **9** que comprende una carga citotóxica de auristatina

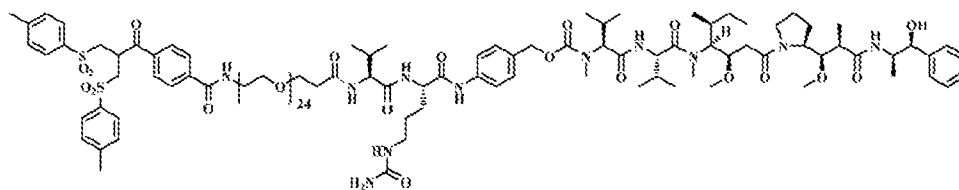
**9**

Se sintetizó el reactivo **9** de manera análoga al reactivo **8** del Ejemplo 3 a partir de compuesto **7** y sal TFA de val-cit-PAB-MMAE. Se aisló bis-mPEG(7u)sulfona-propanoil-benzamida-L-Glu-[val-cit-PAB-MMAE]-[PEG(24u)-OMe] **9** en forma de un aceite incoloro. m/z [M+H]<sup>+</sup> (3270, 12 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (1636, 50 %), [M+3H]<sup>3+</sup> (1091, 100 %).

**Ejemplo 5.** Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

Se prepararon conjugados de fármaco y anticuerpo mediante métodos análogos a los descritos en los documentos n.º WO2014/064423 y n.º WO2014/064424. En resumen, se redujo un anticuerpo (trastuzumab o brentuximab) utilizando tris(2-carboxietil)fosfina a 40 °C durante 1 h. A continuación, se llevó a cabo la conjugación del anticuerpo con 1,5 equivalente molares de reactivo (es decir, **1**, **5**, **8**, **9**) por cada enlace disulfuro entre cadenas, mediante la disolución de los reactivos hasta una concentración final de 1,6 mM en acetonitrilo o en DMF. La solución de anticuerpo se diluyó a 4,21 mg/ml con tampón de fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 20 mM, pH 7,5. Se añadieron los reactivos al anticuerpo y se ajustó la concentración final de anticuerpo en la reacción a 4 mg/ml con tampón de fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 20 mM, pH 7,5. Cada solución se mezcló suavemente y se incubó a 22 °C. El producto de conjugado de fármaco y anticuerpo se purificó mediante cromatografía de interacción hidrofóbica para cada conjugado.

**Ejemplo 6:** Comparación de la citotoxicidad *in vitro* del conjugado de fármaco y brentuximab **10** preparado a partir de reactivo **9** con el conjugado de fármaco y brentuximab **11** producido utilizando el reactivo bis-tolilsulfonil-propanoil-benzamida-PEG(24u)-val-cit-PAB-MMAE, **12**, utilizando el método descrito en el documento n.º WO2014/064423.

12

Los conjugados de fármaco brentuximab purificados **10** y **11** con una proporción de fármaco a anticuerpo (PFA) de cuatro, tal como se indica en el Ejemplo 6, se evaluaron *in vitro* mediante la medición del efecto inhibitor sobre el crecimiento celular de la línea celular positiva para CD30, Karpas 299, utilizando el método descrito posteriormente.

La pérdida de la viabilidad de las células tumorales tras el tratamiento con fármacos citotóxicos o CAF *in vitro* puede medirse mediante el cultivo de líneas celulares en presencia de concentraciones crecientes de fármacos o CAF y la cuantificación de la proliferación o actividad metabólica utilizando el reactivo de luminiscencia CellTiter Glo® (boletín técnico de Promega Corp. n.º TB288; Lewis Phillips G.D, Cancer Res 2008; 68:9280-9290). El protocolo describe la siembra de células, el tratamiento con fármacos y la determinación de la viabilidad celular en referencia a células no tratadas, basándose en la síntesis del ATP, que está directamente relacionado con el número de células presentes en el pocillo.

La línea celular humana de linfoma de linfocitos T llamada Karpas 299 se obtuvo de Dr Abraham Karpas en la Universidad de Cambridge. Las células se cultivaron en medio RPMI (Life Technologies®), suero de feto bovino al 10 %, 100 u/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

Se realizó un recuento de las células Karpas 299 positivas para CD30 utilizando un hemocitómetro Neubauer y se ajustó a una densidad celular de  $5 \times 10^4$ /ml. Las células se sembraron (50 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos de paredes opacas y se incubaron durante 24 h a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.

Los métodos de cultivo celular se obtuvieron de la ficha informativa del producto procedente del proveedor y de las referencias citadas en la misma, por ejemplo, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney 3a edición, publicado por Alan R. Liss, N.Y. 1994, o la 5ª edición, publicada por Wiley-Liss, N.Y. 2005. Se llevaron a cabo diluciones en serie de CAF o fármaco libre (MMAE) por triplicado mediante pipeteo en una placa de 96 pocillos en las columnas 2 a 11 con diluciones de 2 veces utilizando el medio de cultivo celular relevante a modo de diluyente. Las células Karpas 299 positivas para CD30 se trataron con las concentraciones de fármaco mostradas en la Tabla 1. A continuación, se incubaron las células con el fármaco a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 h adicionales.

Tabla 1

Línea celular	Fármaco/conjugado de fármaco	Intervalo de concentraciones
Karpas 299	MMAE (fármaco libre)	2500 pM-4,9 pM
Karpas 299	Conjugado de fármaco brentuximab <b>10</b> , PFA 4	333 pM-0,65 pM
Karpas 299	Conjugado de fármaco brentuximab <b>11</b> , PFA 4	333 pM-0,65 pM

Se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular utilizando el reactivo de luminiscencia Cell-Titer Glo®, tal como se describe en las instrucciones del fabricante (boletín técnico de Promega Corp. n.º TB288; Lewis Phillips G.D, Cancer Res 2008; 68:9280-9290). Los tiempos de incubación, p. ej., la lisis e incubación celular con reactivo de luminiscencia, se ampliaron a 3 minutos y 20 minutos, respectivamente, para obtener una señal de luminiscencia óptima. Se registró la luminiscencia utilizando un lector de placas (p. ej., el lector de placas MD Spectramax M3) y los datos seguidamente se analizaron utilizando un modelo de regresión no lineal de cuatro parámetros.

Se muestran los resultados en las figuras 1 y 2, que ilustran las respuestas de viabilidad celular al tratamiento con los conjugados de anticuerpo **10** y **11** o fármaco libre en las células Karpas 299. La figura 1 muestra el efecto del conjugado de fármaco-brentuximab **10** (línea continua) y de fármaco libre, MMAE (línea discontinua), sobre la viabilidad celular de la línea celular Karpas 299 positiva para CD30, mientras que la figura 2 muestra el efecto del conjugado de fármaco-brentuximab **11** (línea continua) y de fármaco libre, MMAE (línea discontinua), sobre la viabilidad celular de la línea celular Karpas 299 positiva para CD30. La viabilidad se expresa en % de células no tratadas. El % de viabilidad (eje Y) se representa gráficamente frente al logaritmo de la concentración de fármaco (en pM) (eje x) para determinar los valores de IC<sub>50</sub> para todos los conjugados, así como del fármaco libre. Se muestran los valores de IC<sub>50</sub> en la Tabla 2.

Tabla 2

Nombre de la muestra	IC <sub>50</sub> [pM]	Desv. est.
Conjugado de fármaco brentuximab <b>10</b>	13,0	1,1
Conjugado de fármaco brentuximab <b>11</b>	19,3	2,6
MMAE	105,3	3,4

Tal como se muestra en las figuras 1 y 2 y en la Tabla 2, los conjugados de anticuerpo-fármaco **10** y **11** eran activos sobre las células Karpas 299 positivas para CD30.

**Ejemplo 7:** Estudio *in vivo* en xenoinjertos que compara el conjugado de brentuximab-fármaco **10** preparado a partir del reactivo **9**, con el conjugado de brentuximab-fármaco **11** producido utilizando el método descrito en el documento n.º WO2014/064423.

Se produjeron dos conjugados purificados de anticuerpo y fármaco (CAF), **10** y **11**, cada uno con una PFA=4, tal como se ha descrito en el Ejemplo 6. La pureza tras la purificación mediante CIH era superior a 95 % para ambos conjugados.

A continuación, se utilizó cada conjugado en estudios en xenoinjertos, del modo siguiente.

Se utilizaron ratones hembra sanas con inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por sus siglas en inglés) (C.B-17/lcr-Prkdcscid, Charles River Laboratories) con un peso corporal medio (PC) de 20,2 g (intervalo de 16,5 a 23,2 g) el día 1 del estudio. Los animales fueron mantenidos en estado de salud y libres de patógenos específicos (LPE) según las directrices FELASA en recintos de alojamiento bajo condiciones ambientales controladas. Los recintos animales estaban diseñados para proporcionar un espacio estéril y adecuado, con material de lecho, alimento y agua, y enriquecimiento ambiental y social.

Los xenoinjertos se iniciaron con la línea celular de linfoma anaplásico de linfocitos T grandes (LALTG) Karpas 299 mediante inyección subcutánea en los ratones SCID. El día de la inducción tumoral, cada ratón de ensayo recibió 10<sup>7</sup> células Karpas 299 en 200 µl de medio RPMI 1640 en el flanco derecho. Se midieron los tumores en dos dimensiones con un calibrador y se calculó el volumen utilizando la fórmula siguiente:

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

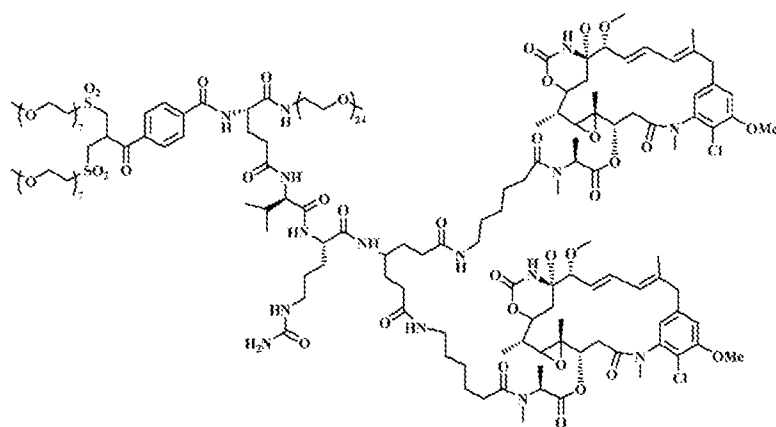
en la que w=anchura y l=longitud, en mm, del tumor.

Doce a catorce días después de la implantación tumoral, designado día 1 del estudio, los animales se clasificaron en grupos cada uno de los cuales constaba de cinco o diez ratones, con volúmenes tumorales medios de grupo de entre 111 y 115 mm<sup>3</sup> o de entre 148 y 162 mm<sup>3</sup>. El tratamiento se inició el día 1 en todos los grupos. Un grupo de tratamiento recibió una inyección intravenosa (i.v.) el día 1 de conjugado de brentuximab-fármaco **11** a una dosis de 1 mg/kg y otro grupo de tratamiento recibió conjugado de brentuximab-fármaco **10** a una dosis de 1 mg/kg. Los ratones del grupo de control tratado con vehículo recibieron PBS.

Se realizó un seguimiento individual de los ratones y cada animal fue eutanizado cuando su tumor alcanzaba el criterio de valoración de volumen de 2000 mm<sup>3</sup>. Se evaluó la tolerabilidad del tratamiento mediante mediciones del peso corporal y observación frecuente para signos clínicos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento.

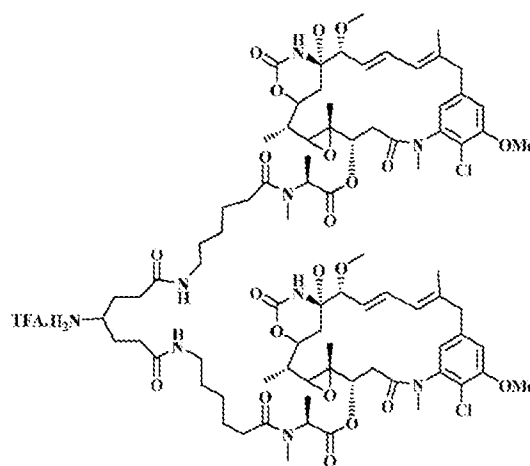
Se calculó el porcentaje de cambio de volumen tumoral para cada ratón el día 7 y se expresó como media en % ± error estándar. Todos los regímenes resultaron bien tolerados y pudieron ser evaluados para la eficacia. El cambio de volumen tumoral en porcentaje tras 7 días en el grupo tratado con brentuximab conjugado utilizando el conjugado de brentuximab-fármaco **11** fue de 212±43 %, indicando un incremento del volumen tumoral. En contraste, el cambio de volumen tumoral en porcentaje el día 9 en el grupo tratado con brentuximab conjugado utilizando el conjugado de brentuximab-fármaco **10** era significativamente más bajo (p=0,0043, prueba t de Student) con -2±6 %, indicando una reducción del volumen tumoral y un efecto antitumoral potenciado. Se muestran los resultados en la figura 3, que muestra el cambio en porcentaje del volumen tumoral para los conjugados de brentuximab-fármaco **10** y **11**. Los conjugados se administraron a una dosis de 1 mg/kg i.v. y se midió el volumen tumoral el día 7 después de la inyección. Los valores se expresan como medias en % ± error estándar.

**Ejemplo 8:** Síntesis de un reactivo de puente disulfuro **11A** que comprende la carga citotóxica **1A**.



**11A**

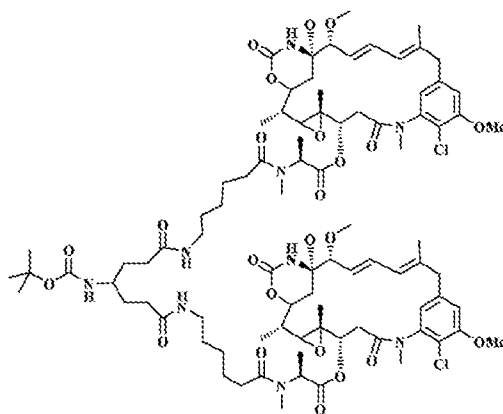
Síntesis de carga citotóxica **1A**.



**1A**

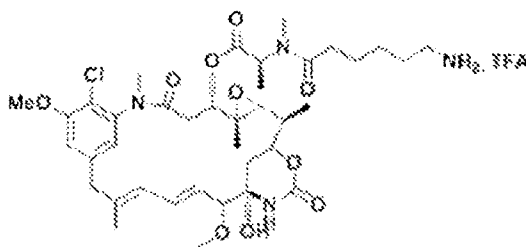
5

Etap 1: Síntesis de compuesto **2A**.



**2A**

10 A una solución bajo agitación de sal TFA de maitansina aminohexanoica (AHX-DM1) (29,4 mg) con la formula siguiente:

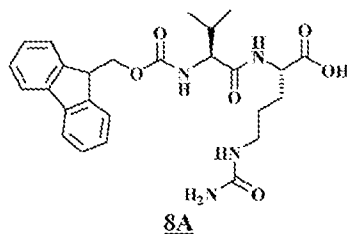


en dimetilformamida (DMF) (400  $\mu$ l) se añadió una solución de bis-pentafluorofenil éster de ácido 4-(N-Boc-amino)-1,6-heptanodioico (10,2 mg) en DMF (200  $\mu$ l). La solución se enfrió a 0 °C antes de añadir N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) (13,5  $\mu$ l). Se dejó que la solución se calentase hasta la temperatura ambiente y se sometió a agitación a 18,5 h. La solución de reacción se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente mediante liofilización, proporcionando bis-AHX-DM1 de 4-(N-boc-amino)-1,6-heptanodiamida (compuesto **2A**) (se supone rendimiento cuantitativo, 29,7 mg) en forma de un sólido blanco, m/z  $[M+2H-2(H_2O)-NHCO]^{2+}$  844 (100 %),  $[M+H]^+$  1767.

#### Etapas 2: Síntesis de carga citotóxica **1A**.

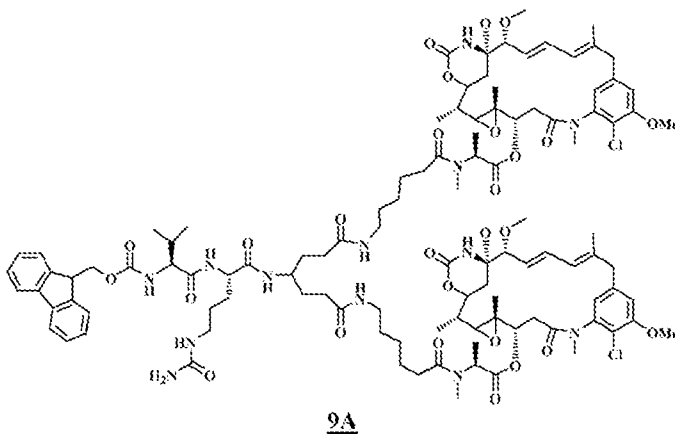
Se disolvió compuesto **2** (se supone rendimiento cuantitativo, 29,7 mg) en ácido fórmico (700  $\mu$ l) y la solución se sometió a agitación a temperatura ambiente durante 1,5 h. Se eliminaron los volátiles al vacío y el residuo se convirtió en la sal de ácido trifluoroacético mediante disolución en tampón A:tampón B 50:50 % v/v (1,5 ml, tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 %). La solución se sometió a agitación a temperatura ambiente durante 5 min antes de eliminar el solvente mediante liofilización. Se repitió el procedimiento, proporcionando bis-AHX-DM1 de 4-(amino)-1,6-heptanodiamida carga citotóxica **1A** en forma de un sólido blanquecino (18,0 mg, 60 % en 2 etapas) m/z  $[M+2H-2(H_2O)-NHCO]^{2+}$  794 (100 %),  $[M+H]^+$  1667.

#### Etapas 3: Síntesis de compuesto **8A**.



Se sintetizó el compuesto **8A** siguiendo el procedimiento descrito en la patente (EP 0 624 377 A2), proporcionando un sólido blanco con datos espectroscópicos de acuerdo con lo informado anteriormente.

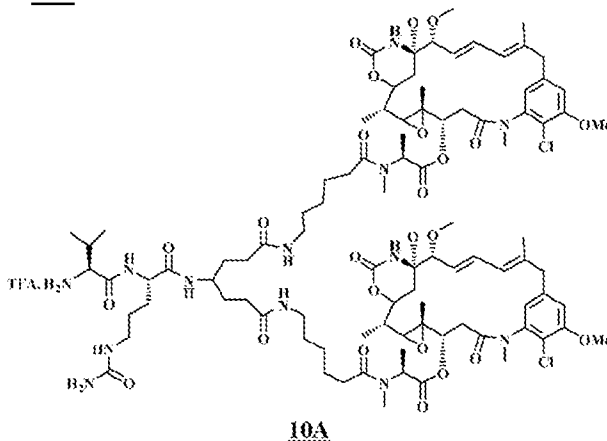
#### Etapas 4: Síntesis de compuesto **9A**.



Se prepararon soluciones madre de compuesto **8A** (20,0 mg) en DMF (500  $\mu$ l) y HATU (40,0 mg) en DMF (400  $\mu$ l). A una solución bajo agitación de compuesto **1A** (14,0 mg) en DMF (700  $\mu$ l) se añadieron alícuotas de solución madre de compuesto **8A** (126,9  $\mu$ l) y solución madre de HATU (77,8  $\mu$ l). La solución de reacción se enfrió a 0 °C antes de añadir

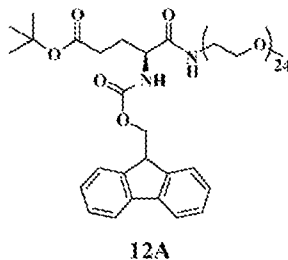
DIPEA (4,11 µl). La solución se sometió a agitación a 0 °C durante 50 min antes de añadir alícuotas adicionales de solución madre de compuesto **8A** (126,9 µl), solución madre de HATU (77,8 µl) y DIPEA (4,11 µl). La solución se sometió a agitación durante 40 min a 0 °C. La solución de reacción se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente mediante liofilización, proporcionando bis-AHX-DM1 de 4-(Fmoc-val-cit-amido)-1,6-heptanodiamida (compuesto **9A**) (se supone rendimiento cuantitativo, 16,9 mg) en forma de un sólido blanquecino, m/z  $[M+2H-2(H_2O)]^{2+}$  1055 (100 %).

Etapa 5: Síntesis de compuesto **10A**.



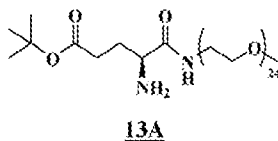
A una solución bajo agitación de compuesto **9A** (se supone rendimiento cuantitativo, 16,9 mg) en DMF (500 µl) se añadió piperidina (3,04 µl). La solución de reacción se sometió a agitación a temperatura ambiente durante 1,5 h antes de la purificación mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente mediante liofilización, proporcionando bis-AHX-DM1 de 4-(val-cit-amido)-1,6-heptanodiamida (compuesto **10A**) en forma de un sólido blanquecino (8,8 mg, 55 % en 2 etapas) m/z  $[M+2H]^{2+}$  962 (100 %).

Etapa 6: Síntesis de compuesto **12A**.



Una solución de Fmoc-L-Glu-(OtBu)-OH (36 mg) en DMF (2 ml) bajo una atmósfera de argón se enfrió a 0 °C y se añadió hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris-(dimetilamino)fosfonio BOP (41 mg), seguido de NH<sub>2</sub>-PEG(24u)-OMe (100 mg) y DIPEA (19 µl). Se dejó que la solución se calentase hasta la temperatura ambiente y tras 22 h, se eliminaron los volátiles al vacío. El residuo resultante se disolvió en diclorometano (1 ml) y se purificó mediante cromatografía de columna de fase normal, eluyendo con diclorometano-metanol (100:0 v/v a 80:20 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío, proporcionando Fmoc-Glu-(OtBu)-NH-PEG(24u)-OMe (compuesto **12A**) en forma de un aceite incoloro (84 mg, 67 %) m/z  $[M+H]^+$  (1097, 10 %),  $[M+2H]^{2+}$  (1035, 100 %).

Etapa 7: Síntesis de compuesto **13A**.

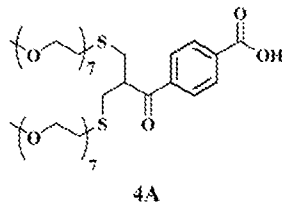


A una solución de compuesto **12A** (74 mg) en DMF (2 ml) bajo una atmósfera de argón se añadió piperidina (49 µl) y la solución resultante se sometió a agitación a temperatura ambiente. Transcurridas 22 h, se eliminaron los volátiles al vacío y el residuo resultante se trituró con hexano (3x0,7 ml). Se eliminó por decantación el solvente orgánico cada



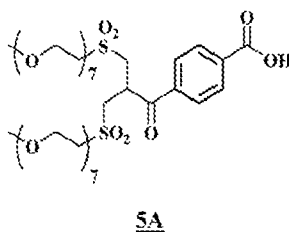
vez y el residuo resultante se secó al vacío, proporcionando Glu-(OtBu)-NH-PEG(24u)-OMe (compuesto **13A**) en forma de un sólido (61 mg, 97 %) m/z  $[M+H]^+$  (1097, 10 %),  $[M+2H]^{2+}$  (1035, 100 %).

Etapa 8: Síntesis de compuesto **4A**.



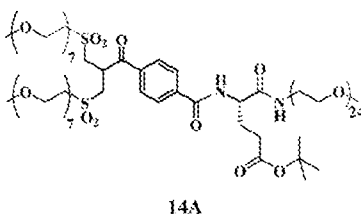
A una solución bajo agitación de ácido 4-[2,2-bis(p-tolilsulfonil)-metil]acetil]benzoico (1,50 g, Nature Protocols, 2006, 1(54), 2241-2252) en DMF (70 ml) se añadió alfa-metoxi-omega-mercapto hepta(etilenglicol) (3,20 g) y trietilamina (2,50 ml). La mezcla de reacción resultante se sometió a agitación bajo una atmósfera inerte de nitrógeno a temperatura ambiente. Tras 19 h, los volátiles se eliminaron al vacío. El residuo resultante se disolvió en agua (2,4 ml) y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y el solvente acuoso se eliminó mediante liofilización, proporcionando ácido 4-[2,2-bis[alfa-metoxi-omega-tio-hepta(etilenglicol)]acetil]-benzoico (compuesto **4A**) en forma de un aceite incoloro transparente denso (1,77 g, 66 %) m/z  $[M+H]^+$  901.

Etapa 9: Síntesis de compuesto **5A**.



A una solución bajo agitación de **4A** (1,32 g) en metanol:agua (18 ml, 9:1 v/v) a temperatura ambiente se añadió Oxone® (2,70 g). Transcurridas 2,5 h, se eliminaron los volátiles al vacío y el agua se eliminó azeotrópicamente con acetonitrilo (2x15 ml). El residuo resultante se disolvió en diclorometano (3x10 ml), se filtró por una columna de sulfato de magnesio y se lavó con diclorometano (2x7 ml). Se agrupó el eluyente y los lavados y se eliminaron los volátiles al vacío, proporcionando un aceite amarillo pálido transparente denso (1,29 g, 92 %). Se disolvió una parte del residuo (700 mg) en agua:acetonitrilo (1,50 ml, 3:1 v/v) y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y el solvente acuoso se eliminó mediante liofilización, proporcionando ácido 4-[2,2-bis[alfa-metoxi-omega-omega-sulfonil-hepta(etilenglicol)]acetil]benzoico (reactivo **5A**) en forma de un aceite incoloro transparente denso (524 mg, 68 %) m/z  $[M+H]^+$  965.

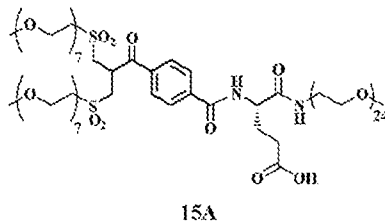
Etapa 10: Síntesis de compuesto **14A**.



Una solución de compuesto **5A** (26,6 mg) en DMF (550 µl) se enfrió a 0 °C bajo una atmósfera de argón al añadir HATU (10,5 mg) y la solución resultante se sometió a agitación durante 0,5 h a 0 °C. A lo anterior se añadió una solución de **13A** (32 mg) en DMF (550 µl) y la solución resultante se sometió a agitación durante 5 minutos a 0 °C antes de añadir NMM (2,9 µl) y HATU (10,5 mg). Se dejó la solución de reacción bajo agitación a 0 °C durante 2 h antes de calentarla a temperatura ambiente, y se sometió a agitación durante 3,5 h adicionales. Después de este tiempo, se eliminaron los volátiles al vacío; se disolvió el residuo resultante en agua y acetonitrilo (v/v 1/1, 1,2 ml) y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido fórmico al 0,1 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido fórmico al 0,1 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-mPEG(7u)sulfona-

propanoil-benzamida-Glu-(OtBu)-NH-PEG(24u)-OMe (compuesto **14A**) en forma de un aceite incoloro (30,5 mg, 55 %) m/z  $[M+Na]^+$  (2243, 50 %),  $[M+H]^+$  (2221, 40 %),  $[M+Na+2H]^{3+}$  (747, 100 %).

Etapla 11: Síntesis de compuesto **15A**.

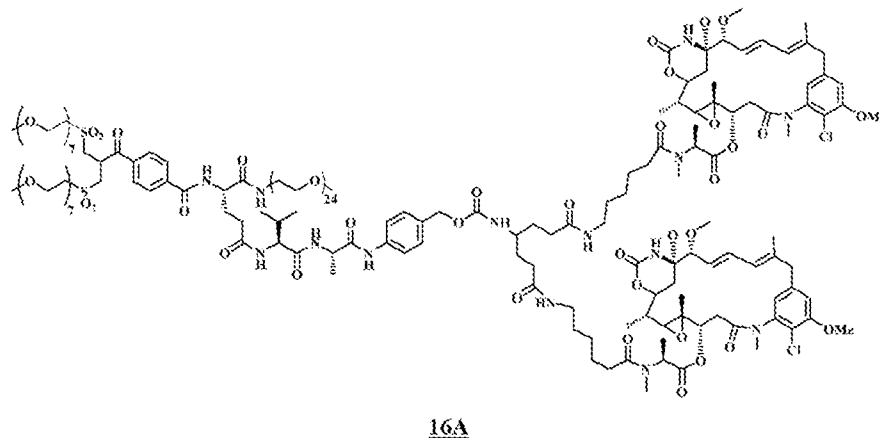


Una solución de compuesto **14A** (30 mg) en diclorometano (2 ml) bajo una atmósfera de argón se enfrió a 0 °C, seguido de la adición de ácido trifluoroacético (500 µl), y la solución resultante se sometió a agitación durante 1,5 h. Se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta la temperatura ambiente y se sometió a agitación durante 1 h adicional. Después de este tiempo se eliminaron los volátiles al vacío. El residuo resultante se disolvió en agua y acetonitrilo (v/v 1/1, 0,6 ml) y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-mPEG(7u)sulfona-propanoil-benzamida-Glu-NH-PEG(24u)-OMe (compuesto **15A**) en forma de un aceite incoloro (20 mg, 68 %) m/z  $[M+H]^+$  (2165, 55 %),  $[M+2H]^{2+}$  (1083, 60 %),  $[M+2H+Na]^{3+}$  (729, 100 %).

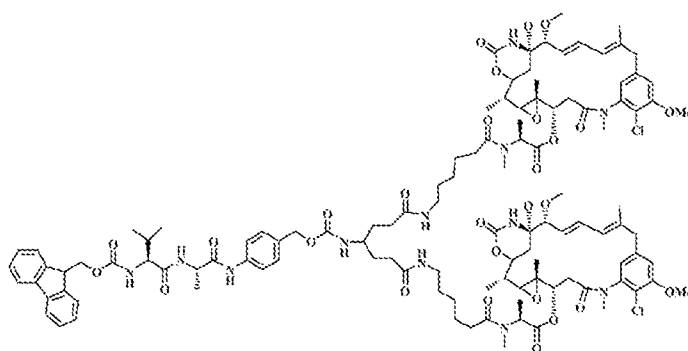
Etapla 12: Síntesis de reactivo **11A**.

Se prepararon soluciones madre de HATU (10 mg) en DMF (200 µl) y NMM (5,83 µl) en DMF (94,2 µl). Se disolvió compuesto **15A** (5,4 mg) en una solución de compuesto **10A** (3,6 mg) en DMF (153,7 µl) bajo agitación. A la solución bajo agitación se añadió una alícuota de solución madre de HATU (40 µl). La solución se enfrió a 0 °C antes de añadir una alícuota de solución madre de NMM (10 µl). Tras 50 min, se añadieron alícuotas adicionales de solución madre de HATU (6,67 µl) y solución madre de NMM (1,67 µl). La solución de reacción se sometió a agitación a 0° C durante 30 min adicionales y se purificó directamente mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). El solvente se eliminó mediante liofilización, proporcionando el reactivo **11A** en forma de un sólido blanquecino (3,8 mg, 53 %) m/z  $[M+4H-(H_2O)-NHCO]^{4+}$  1003 (100 %),  $[M+3H-2(H_2O)-NHCO]^{3+}$  1331,  $[M+2H-2(H_2O)]^{2+}$  2017.

**Ejemplo 9:** Síntesis de un reactivo de puente disulfuro **16A** que comprende la carga citotóxica **1A**.

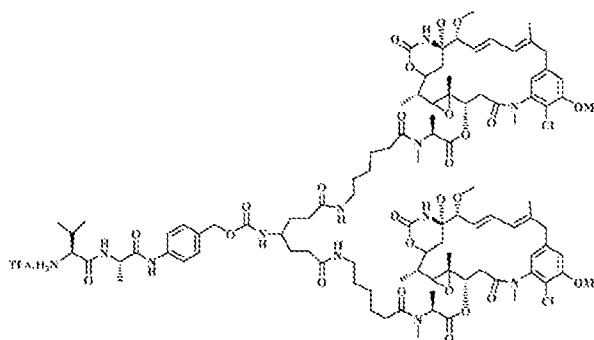


Etapla 1: Síntesis de compuesto **17A**.

**17A**

Se preparó una solución madre de hidroxibenzotriazol (HOBt, 6,6 mg) en DMF (200  $\mu$ l). A una solución bajo agitación de carga citotóxica **1A** (10 mg) en DMF (500  $\mu$ l) se añadió Fmoc-val-ala-PAB-PNP (3,7 mg) y una alícuota de solución madre de HOBt (2  $\mu$ l). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C antes de añadir DIPEA (2,14  $\mu$ l). A continuación, la solución de reacción se sometió a agitación a temperatura ambiente durante 18 h antes de la purificación mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). El solvente se eliminó mediante liofilización, proporcionando bis-AHX-DM1 de Fmoc-val-ala-PAB-amido-1,6-heptanodiamida (reactivo **17A**).

Etapas 2: Síntesis de compuesto **18A**.

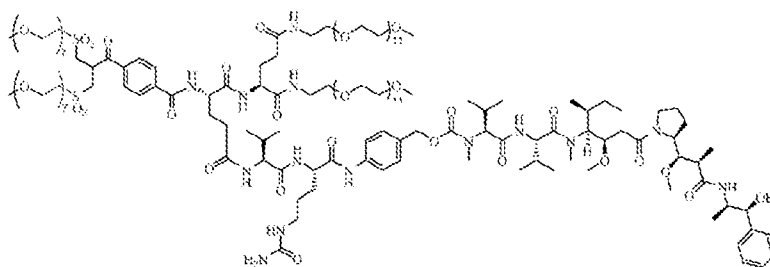
**18A**

Se sintetizó el compuesto bis-maitansinoide bis-AHX-DM1 de amina-val-ala-PAB-amido-1,6-heptanodiamida **18A** de una manera análoga a la descrita para el compuesto **10A**, utilizando el compuesto 17A en lugar del compuesto **9A**.

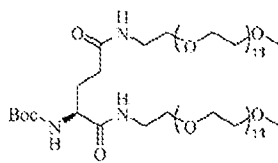
Etapas 3: Síntesis de reactivo **16A**.

Se sintetizó el reactivo bis-maitansinoide bis-mPEG(7u)sulfona-propanoil-benzamida-Glu-[NH-PEG(24u)-OMe]-[bis-AHD-DM1 de val-ala-PAB-amido-1,6-heptanodiamida] **16A** de una manera análoga a la descrita para el reactivo **11A**, utilizando el compuesto **18A** en lugar del compuesto **10A**.

**Ejemplo 10:** Síntesis de reactivo de conjugación **13** que comprende una carga citotóxica de auristatina

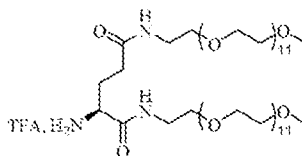
**13**

Etapas 1: Síntesis de compuesto **14**.

**14**

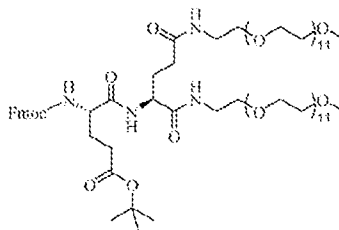
Se disolvió Boc-L-Glu (134,9 mg) y hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris-(dimetilamino)fosfonio (BOP) (724 mg) en DMF anhidro (4 ml) y se sometieron a agitación a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1,25 h. A continuación, esta solución se añadió a una solución de H<sub>2</sub>N-PEG(12u)-Me (685 mg) y NMM (179,8 µl) en DMF (3 ml). A continuación, la solución se sometió a agitación bajo N<sub>2</sub> durante 4 h. Seguidamente, la solución se sometió a agitación a una temperatura de entre 0 °C y 4 °C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 4,5 h. Además, se añadió BOP (241 mg) y NMM (60 µl) y la mezcla de reacción se dejó durante 24 h a 4 °C. Se eliminaron los volátiles al vacío y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía flash de fase inversa en C18, eluyendo con el tampón A (v/v): agua: acetonitrilo al 5 %: ácido fórmico al 0,1 % y tampón B (v/v): acetonitrilo: ácido fórmico al 0,1 % (100:0 v/v a 65:35 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y el solvente acuoso se eliminó mediante liofilización. El material se purificó nuevamente mediante cromatografía flash de fase normal, eluyendo con acetato de etilo: metanol (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando Boc-Glu-[PEG(12u)-Me]<sub>2</sub> (compuesto **14**) en forma de un aceite incoloro (450 mg). m/z [M+H]<sup>+</sup> (1331, 100 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (665, 100 %)

Etapas 2: Síntesis de compuesto **15**.

**15**

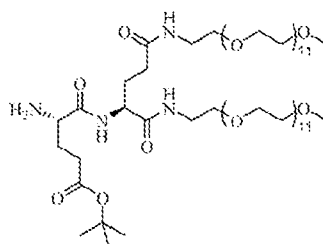
Se disolvió el compuesto **14** (450 mg) en DCM (25 ml), a lo que se añadió TFA (2,5 ml). La solución se sometió a agitación a temperatura ambiente durante 5 h. A continuación, se eliminaron los volátiles al vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía flash de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua: acetonitrilo al 5 %: ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo: ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 60:40 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando Glu-[HN-PEG(12u)-Me]<sub>2</sub> TFA (compuesto **15**) en forma de una goma incolora transparente (320 mg) m/z [M+Na]<sup>1+</sup> (1253,0, 10 %) [M+H]<sup>2+</sup> (616,8, 100 %)

Etapas 3: Síntesis de compuesto **16**

**16**

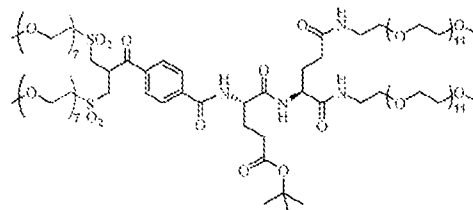
A una solución bajo agitación de Fmoc-L-Glu-(OtBu)-OH (36,6 mg) en DMF anhidro (2 ml) se añadió HATU (37,30 mg). La mezcla de reacción se sometió a agitación a 0 °C bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1 h y después se añadió a una solución de compuesto **15** (103,5 mg) y NMM (19,2 µl) en DMF (1 ml). Se añadió DMF adicional (1 ml). La reacción sometida a agitación se dejó que se calentase hasta la temperatura ambiente durante 5 h. Se eliminaron los volátiles al vacío. El aceite amarillo pálido resultante se purificó mediante cromatografía flash de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua: acetonitrilo al 5 %: ácido fórmico al 0,1 % y tampón B (v/v): acetonitrilo: ácido fórmico al 0,1 % (100:0 v/v a 50:50 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando Fmoc-L-Glu-(OtBu)-Glu-[HN-PEG(12u)-Me]<sub>2</sub> (compuesto **16**) (173 mg) en forma de una pasta blanca. m/z [M+1]<sup>+</sup> (1638, 100 %) y [M+Na]<sup>+</sup> (1660, 57 %).

Etapas 4: Síntesis de compuesto **17**

**17**

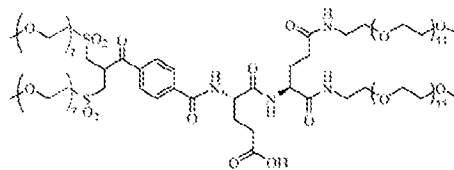
A una solución bajo agitación de compuesto **16** (173 mg) en DMF anhidro (3,2 ml) se añadió piperidina (104,4  $\mu$ l). La solución se sometió a agitación a temperatura ambiente bajo argón durante 1,5 h. Se eliminaron los volátiles al vacío y el residuo se trituró repetidamente con hexano. El producto se secó al vacío, proporcionando L-Glu-(OtBu)-L-Glu-[HN-PEG(12u)-Me]<sub>2</sub> (compuesto **17**) (152 mg) en forma de un aceite incoloro transparente. m/z [M+H]<sup>1+</sup> (1416,7, 85 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (708,5, 100 %), [M+Na]<sup>1+</sup> (1438,7, 30 %)

Etapas 5: Síntesis de compuesto **18**

**18**

A una solución bajo agitación de ácido 4-[2,2-bis]alfa-metoxi-ometa-sulfonil hepta(etilenglicol)]acetil]benzoico (114 mg) en DMF anhidro (3 ml) se añadió HATU (51,4 mg). La mezcla de reacción se sometió a agitación a 0 °C durante 0,5 h; a continuación, se añadió a una solución de L-Glu-(OtBu)-Glu-[HN-PEG(12u)-OMe]<sub>2</sub> (152,0 mg) en DMF (2 ml) y se lavó con DMF adicional (1 ml), seguido de NMM (14,8  $\mu$ l). La mezcla de reacción se sometió a agitación a una temperatura de entre 0 °C y 15 °C, seguido de la eliminación al vacío de los volátiles. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía flash de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,1% y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido fórmico al 0,1% (100:0 v/v a 55:45 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando Bis-mPEG(7u)sulfona-propanoíl-benzamida-L-Glu-(OtBu)-Glu-[HN-PEG(12u)-Me]<sub>2</sub> (compuesto **18**) (160,6 mg) en forma de un aceite incoloro transparente. m/z [M+H]<sup>1+</sup> (2366,7, 100 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (1184,0, 80 %) [M+H<sub>2</sub>O]<sup>3+</sup> (795,5, 100 %).

Etapas 6: Síntesis de compuesto **19**

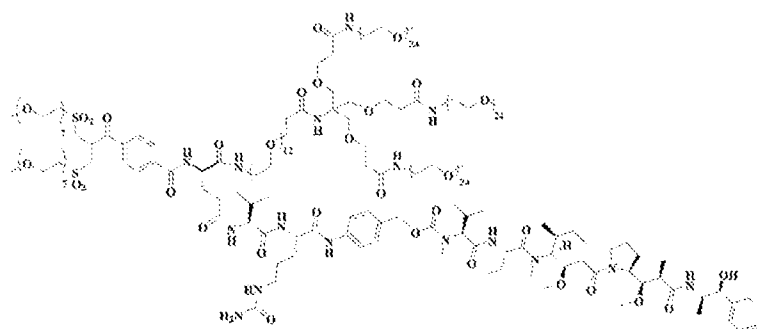
**19**

A una solución bajo agitación de compuesto **18** (58 mg) en DCM anhidro (6 ml) se añadió TFA (6,0 ml). La mezcla de reacción se sometió a agitación a temperatura ambiente durante 2 h, transcurridas las cuales se eliminaron los volátiles al vacío, se disolvieron en agua (25 ml) y se liofilizaron, proporcionando Bis-mPEG(7u)sulfona-propanoíl-benzamida-L-Glu-(OH)-Glu-[HN-PEG(12u)-OMe]<sub>2</sub> (compuesto **19**) (160,6 mg) en forma de un aceite incoloro transparente. m/z [M+H]<sup>1+</sup> (2306,8, 90 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (1153,0, 100 %).

Etapas 7: Síntesis de reactivo **13**

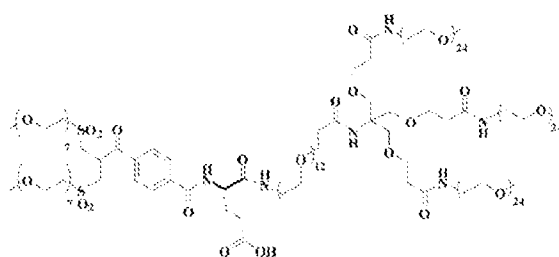
Se sintetizó el reactivo **13** de manera análoga al reactivo **8** del Ejemplo 3 a partir de compuesto **7** y sal TFA de val-cit-PAB-MMAE. Se aisló bis-mPEG(7u)sulfona-propanoíl-benzamida-L-Glu-(val-cit-PAB-MMAE)-Glu-[HN-PEG(12u)-Me]<sub>2</sub> **13** en forma de un aceite incoloro (69 %). m/z [M+H]<sup>1+</sup> (3410,4, 90 %), [M+2H]<sup>2+</sup> (1706,2, 60 %), [M+3H]<sup>3+</sup> (1137,2, 85 %), [M+4H]<sup>4+</sup> (852,8, 70 %).

Ejemplo 11: Síntesis de reactivo de conjugación **20** que comprende una carga citotóxica de auristatina

**20**

Se sintetizó el reactivo **20** de manera análoga al reactivo 8 del Ejemplo 3 utilizando el compuesto **20B** en lugar de compuesto **7** y sal TFA de val-cit-PAB-MMAE.

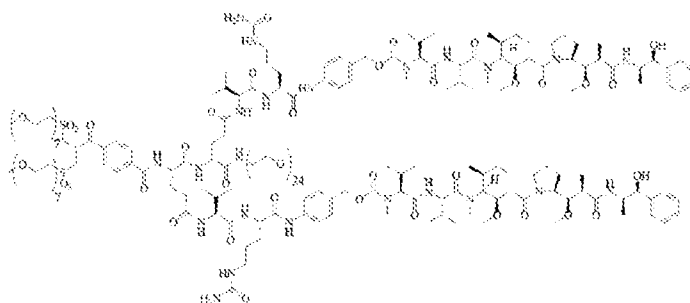
5

**20B**

Se preparó el compuesto **20B** de manera análoga al compuesto **7** en el Ejemplo 3, utilizando H<sub>2</sub>N-PEG(12u)-tri(m-dPEG(24u)) en lugar de H<sub>2</sub>N-PEG(24u). Se aisló bis-mPEG(7u)sulfona-propanoic acid-benzamide-L-Glu-[val-cit-PAB-MMAE]-[PEG(12u)-tri(m-dPEG(24u))] **20** en forma de un aceite incoloro. m/z [M+2H]<sup>2+</sup> (3166, 20 %), [M+3H]<sup>3+</sup> (2111, 50 %), [M+4H]<sup>4+</sup> (1583, 100 %).

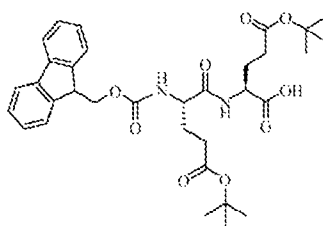
10

**Ejemplo 12:** Síntesis de reactivo de conjugación **21** que comprende una carga citotóxica de auristatina

**21**

15

Etapa 1: Síntesis de compuesto **22**.

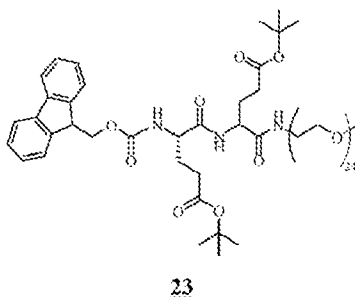
**22**

20

A una solución bajo agitación de Fmoc-L-Glu-(OtBu)-OH (2000 mg) en DMF anhidro (18 ml) se añadió HOBt (666 mg) y DIC (768 µl). La mezcla de reacción se sometió a agitación a 0 °C durante 10 min y posteriormente durante 2,5 h a temperatura ambiente. Se añadió H-L-Glu-(OtBu)-OH (1194 mg) y DIPEA (2464 µl) y la mezcla de reacción se sometió a agitación durante 18 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con agua (100 ml) y se acidificó a

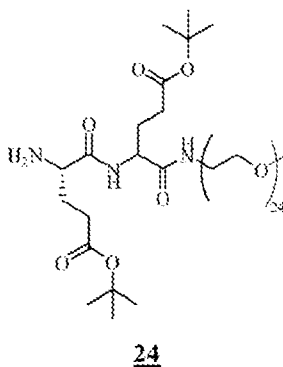
pH 2,0 mediante la adición de HCl diluido. La capa acuosa se extrajo con EtOAc (3x100 ml) y se agruparon las fases orgánicas y se lavaron con agua (2x50 ml) y solución hipersalina saturada (1x50 ml). La capa de EtOAc se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  durante 2 h y después se concentró en un evaporador rotatorio. El producto se purificó mediante cromatografía flash de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua: acetonitrilo al 5 %: ácido fórmico al 0,1 % y tampón B (v/v): acetonitrilo: ácido fórmico al 0,1 % (100:0 v/v a 80:20 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando el compuesto Fmoc-L-Glu-(OtBu)-L-Glu-(OtBu)-OH **22** (875 mg) en forma de un sólido blanco. m/z  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  (610,8, 85 %),  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  (633,1, 55 %),  $[\text{2M}+\text{Na}]^{+}$  (1243,2, 55 %).

10 Etapa 2: Síntesis de compuesto **23**.



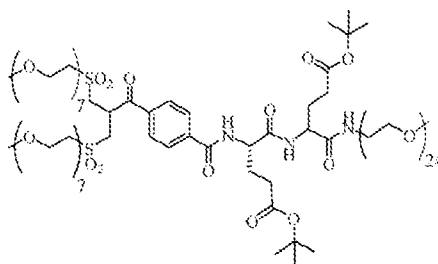
15 A una solución bajo agitación de Fmoc-L-Glu-(OtBu)-L-Glu-(OtBu)-OH (510 mg) y  $\text{NH}_2\text{-PEG}(24\text{u})\text{-OMe}$  (1000 mg) en DMF anhidro (5 ml) se añadió N,N-diisopropiletilamina (43,8  $\mu\text{l}$ ) y HATU (47,6 mg). La mezcla de reacción se sometió a agitación a 0 °C durante 10 min y posteriormente durante 16 h a temperatura ambiente. La solución se concentró al vacío a 2 ml y el residuo se purificó mediante cromatografía flash de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido fórmico al 0,1% y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido fórmico al 0,1% (100:0 v/v a 83:17 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando Fmoc-Glu-(OtBu)-Glu-(OtBu)-PEG(24u)-OMe (compuesto **23**) (644 mg) en forma de una pasta blanca. m/z  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  (1681,0, 40 %),  $[\text{M}+\text{Na}]^{1+}$  (1704,0, 30 %) y  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  (841,4, 55 %).

Etapa 3: Síntesis de compuesto **24**.



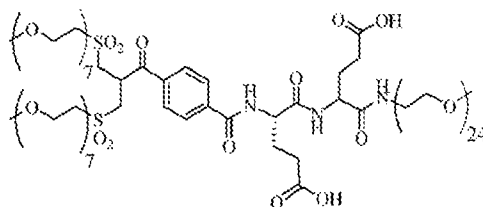
25 A una solución bajo agitación de Fmoc-Glu-(OtBu)-Glu-(OtBu)-PEG(24u)-OMe (193 mg) en DMF anhidro (900  $\mu\text{l}$ ) se añadió piperidina (34  $\mu\text{l}$ ) y la mezcla de reacción se sometió a agitación durante 1 h a temperatura ambiente. La solución se concentró al vacío a sequedad y el residuo se trituró con  $\text{Et}_2\text{O}$  (2x2,5 ml). El producto se secó al vacío, proporcionando H-L-Glu-(OtBu)-Glu-(OtBu)-PEG(24u)-OMe (compuesto **24**) (166 mg) en forma de un sólido blanquecino.

Etapa 4: Síntesis de compuesto **25**.

**25**

Se sintetizó reactivo **25** de manera análoga al reactivo **18** del Ejemplo 8, a partir de compuesto **24** y ácido 4-[2,2-bis[alfa-metoxi-omega-sulfonil hepta(etilenglicol)]acetil]benzoico. Se aisló bis-mPEG(7u)sulfona-propanoíl-benzamida-Glu-(OtBu)-Glu-(OtBu)-PEG(24u)-OMe **25** en forma de un aceite incoloro. m/z  $[M+H]^+$  (2407,2, 25 %),  $[M+Na]^+$  (2429,4, 70 %).

Etapas 5: Síntesis de compuesto **26**.

**26**

Se sintetizó el reactivo **26** de manera análoga al reactivo **19** del Ejemplo 8 a partir de compuesto **25**. Se aisló Bis-mPEG(7u)sulfona-propanoíl-benzamida-Glu-(OH)-Glu-(OH)-PEG(24u)-OMe **26** en forma de un aceite incoloro. m/z  $[M+H]^+$  (2294,2, 20 %),  $[M+Na]^+$  (2317,4, 10 %) y  $[M+2Na]^{2+}$  (1217,4, 100 %).

Etapas 6: Síntesis de reactivo **21**.

A una solución bajo agitación de compuesto **26** (28,1 mg), sal TFA de val-cit-PAB-MMAE (30,6 mg) y HATU (13,9 mg) en DMF anhidro (1,5 ml) se añadió N-metilmorfolina (6,7 µl) y la mezcla de reacción se sometió a agitación a 0 °C durante 5 h. La solución se diluyó con agua (1 ml) y se purificó mediante cromatografía flash de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:TFA al 0,1 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:TFA al 0,1 % (100:0 v/v a 60:40 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-mPEG(7u)sulfona-propanoíl-benzamida-bis-[Glu-(val-cit-PAB-MMAE)]-PEG(24u)-OMe (compuesto **21**) (36,1 mg) en forma de un sólido blanco. m/z  $[M+2H]^{2+}$  (2252,7, 20 %),  $[M+3H]^{3+}$  (1501,67, 40 %) y  $[M+4H]^{4+}$  (1126,6, 100 %).

**Ejemplo 13.** Análisis de conjugados de anticuerpo y fármaco (CAF) mediante ensayo *in vitro* de viabilidad celular

Se determinó la eficacia *in vitro* de los conjugados de anticuerpo y cargas libres preparados en el Ejemplo 5, mediante medición del efecto inhibitor sobre el crecimiento celular de líneas celulares de cáncer sobreexpresantes diana.

La pérdida de la viabilidad de las células tumorales tras el tratamiento con CAF o cargas libres *in vitro* puede medirse mediante el cultivo de líneas celulares en presencia de concentraciones crecientes de compuestos y la cuantificación de la proliferación o actividad metabólica utilizando el reactivo de luminiscencia Cell-Titer Glo® (Promega). El protocolo describe la siembra de células, el tratamiento con fármacos y la determinación de la viabilidad celular en referencia a células no tratadas, basándose en la síntesis del ATP, que está directamente correlacionado con el número de células presentes en el pocillo.

Las características de la línea celular, así como la densidad de siembra para el ensayo se proporcionan en la Tabla 3, posteriormente.

Se desprendieron las células JIMT-1 adherentes con TrypLE y se resuspendieron en medio completo. Se realizó un recuento de las células utilizando cámaras de recuento Neubauer desechables y la densidad celular se ajustó tal como se detalla en la Tabla 3, posteriormente. Se sembraron las células (células adherentes a razón de 100 µl/pocillo y Karpas-299 a razón de 50 µl/pocillo) en placas blancas de 96 pocillos con paredes opacas tratadas de cultivo de tejidos y se incubaron durante 24 h a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.



Tabla 3

Línea celular	Diana	Medio de cultivo	Densidad de siembra
JIMT-1	Her2 <sup>low</sup>	Medio DMEM (Life Technologies®), suero de feto bovino al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.	0,3x10 <sup>4</sup> células en cada pocillo

Se prepararon diluciones en serie de ocho puntos de los compuestos en el medio de cultivo relevante. Se ajustó el intervalo de valoración para cada combinación de compuesto/línea celular. En el caso de las células adherentes, se eliminó el medio de la placa que contenía las células y se sustituyó por 100 µl/pocillo de los compuestos diluidos en serie 1x.

El ensayo de viabilidad celular se llevó a cabo utilizando el reactivo de luminiscencia Cell-Titer Glo® (Promega), tal como describe el fabricante.

Se registró la luminiscencia utilizando un lector de placas SpectramaxM3 de Molecular Devices y los datos se analizaron posteriormente utilizando un modelo de regresión no lineal de cuatro parámetros en GraphPad Prism.

La viabilidad se expresó en % de células no tratadas y se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Viabilidad} = 100 \times \frac{\text{Luminiscencia}_{\text{muestra}} - \text{Luminiscencia}_{\text{control sin células}}}{\text{Luminiscencia}_{\text{sin tratar}} - \text{Luminiscencia}_{\text{control sin células}}}$$

Se representó gráficamente el % de viabilidad frente al logaritmo de la concentración de fármaco a fin de extrapolar los valores de IC<sub>50</sub> para todos los conjugados.

Ejemplo 14. Estudios con xenoinjertos de ratón Karpas-299 de comparación de conjugado de brentuximab-fármaco **10** con conjugado de brentuximab-fármaco **46** (comparativo), conjugado de trastuzumab-fármaco **32** (control negativo) y Adcetris® (comparativo).

En el presente ejemplo, como control negativo se utilizó el conjugado de trastuzumab-fármaco **32**. El trastuzumab se une a la diana HER-2 que no está presente, o lo está, pero a niveles muy bajos, sobre las células Karpas-299. De esta manera, el conjugado de trastuzumab-fármaco **32** no presenta como diana específica estas células y solo debería presentar un efecto citotóxico no específico. A la inversa, el conjugado de brentuximab-fármaco **10** reconoce el marcador de superficie celular CD30, que se expresa en las células Karpas-299, dirigiendo el CAF específicamente a estas células y dando como resultado un efecto citotóxico específico.

Se prepararon los conjugados de brentuximab-fármaco **10** y **46** a partir de los reactivos de conjugación **9** y **45**, respectivamente, mediante el método descrito en el Ejemplo 5. Se preparó el conjugado de trastuzumab-fármaco **32** a partir del reactivo de conjugación **1**, mediante el método descrito en el Ejemplo 5.

Se utilizaron ratones scID CB17 hembra sanas (CB17/lcr-Prkdcscid/Crl) con un peso corporal medio de 19,7 g para la inoculación celular. 24 a 72 horas antes de la inyección de células tumorales los ratones se sometieron a radiación y (1,44 Gy, <sup>60</sup>Co). Los animales fueron mantenidos en estado de salud libre de patógenos específicos (LPE) según las directrices FELASA en recintos de alojamiento bajo condiciones ambientales controladas.

Los tumores se indujeron mediante inyección subcutánea de 10<sup>7</sup> células Karpas-299 (linfoma anaplásico de linfocitos T grandes, LALTG) en 200 µl de medio RPMI 1640 en el flanco derecho. Se midieron los tumores dos veces a la semana con un calibrador y se calculó el volumen utilizando la fórmula siguiente:

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

Catorce días después de la implantación tumoral, los animales se asignaron aleatoriamente a grupos de cinco ratones utilizando el software Vivo manager® (152,9 mm<sup>3</sup>, de volumen tumoral medio) y se iniciaron los tratamientos (día 0). Todas las sustancias de ensayo se inyectaron por la vena de la cola (i.v., bolo). Se utilizaron cuatro dosis de 0,4 mg/kg de CAF cada 4 días (Q4Dx4) y se utilizó PBS para el grupo de vehículo (Q4Dx4).

Se registró la viabilidad y el comportamiento de los ratones cada día. Se midieron los pesos corporales dos veces a la semana. Se eutanizaron los animales al alcanzar un punto final compasivo (p. ej., 2.000 mm<sup>3</sup> de volumen tumoral) o después de un máximo de 6 semanas después de la administración de dosis.

Los volúmenes tumorales medios  $\pm$  errores estándares se representan en las figuras 4a a 4d para cada grupo de tratamiento. Todos los compuestos resultaron bien tolerados. Los resultados muestran que, además de una reducción inicial del volumen tumoral, el conjugado 10 mostró una inhibición más grande y más prolongada del crecimiento tumoral que el conjugado 46 o Adcetris®, mientras que el control negativo, 32, no presentó ningún efecto discernible sobre el control de vehículo (sin fármaco).

**Ejemplo 15:** Estudios con xenoinjertos de ratón JIMT-1 de comparación del conjugado de trastuzumab-fármaco 27 con Kadcyla® (comparativo).

Se preparó el conjugado de trastuzumab-fármaco 27 a partir del reactivo 9 mediante el método descrito en el Ejemplo 5.

Para la inoculación de células se utilizaron ratones desnudos NMRI hembra sanos (RjOrl:NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu) de 6 semanas de edad en el momento de la llegada. Los animales fueron mantenidos en estado de salud libre de patógenos específicos (LPE) según las directrices FELASA en recintos de alojamiento bajo condiciones ambientales controladas.

Los tumores se indujeron mediante la inyección subcutánea de  $5 \times 10^6$  células JIMT-1 (carcinoma mamario) en 200  $\mu$ l de suspensión celular en PBS en el flanco derecho. Se añadió Matrigel (40  $\mu$ l de Matrigel por cada 200  $\mu$ l de suspensión celular) poco antes de la inoculación de las células tumorales. Se midieron los tumores dos veces a la semana con un calibrador y se calculó el volumen utilizando la fórmula siguiente:

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

Una vez los volúmenes tumorales habían alcanzado un volumen tumoral medio de aproximadamente 150 mm<sup>3</sup>, los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de diez ratones (volumen tumoral medio de 128 mm<sup>3</sup>) y se inició el tratamiento (día 0). Todas las sustancias de ensayo se inyectaron por la vena de la cola (i.v., bolo). Se utilizó una única dosis de 5 mg/kg de CAF en 10 ml/kg y se utilizó PBS para el grupo de vehículo.

Se registró la viabilidad y el comportamiento de los ratones cada día. Se midieron los pesos corporales dos veces a la semana. Los animales se eutanizaron al alcanzar un punto final compasivo (p. ej., un peso tumoral estimado >10 % del peso corporal; pérdida de peso corporal del animal >20 % respecto al peso corporal en el momento de la distribución en grupos, ulceración de los tumores, falta de movilidad y signos generales de dolor) o en una fecha final predeterminada del estudio.

Los volúmenes tumorales medios  $\pm$  errores estándares se representan en las figuras 5a y 5b para cada grupo. Ambos compuestos resultaron bien tolerados. Los resultados muestran que el conjugado 27 mostraron una reducción completa del volumen tumoral, que mostraba una actividad superior a la del producto comercial, Kadcyla®, que presentó poco efecto en comparación con el control de vehículo.

**Ejemplo 16:** estudio de xenoinjerto de ratón de Karpas-299 de comparación de conjugados de brentuximab-fármaco 10, 28 y 29 con Adcetris® (comparativo).

Se prepararon los conjugados 28 y 29 a partir del reactivo de conjugación 21 del Ejemplo 12 y el reactivo de conjugación 13 del Ejemplo 10, respectivamente. Las conjugaciones se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 5.

Se utilizaron ratones CB17-SCID hembra sanos (CBySmn.CB17-Prkdcscid/J, Charles River Laboratories) con un peso corporal medio de 18,9 g para la inoculación de células (día 0). 24 a 72 horas antes de la inyección de células tumorales los ratones se sometieron a radiación y (1,44 Gy, <sup>60</sup>Co). Los animales fueron mantenidos en estado de salud y libres de patógenos específicos (LPE) según las directrices FELASA en recintos de alojamiento bajo condiciones ambientales controladas.

Los tumores se indujeron mediante inyección subcutánea de  $10^7$  células Karpas-299 (linfoma anaplásico de linfocitos T grandes, LALTG) en 200  $\mu$ l de medio RPMI 1640 en el flanco derecho. Se midieron los tumores dos veces a la semana con un calibrador y se calculó el volumen utilizando la fórmula siguiente:

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

Quince días después de la implantación tumoral (día 15), los animales se asignaron aleatoriamente a grupos de ocho ratones utilizando el software Vivo manager® (169 mm<sup>3</sup>, de volumen tumoral medio) y se iniciaron los tratamientos. Los animales del grupo de vehículo recibieron una única inyección intravenosa (i.v.) de PBS. Los grupos tratados recibieron la administración de una dosis de 1 mg/kg mediante una única inyección i.v. de CAF.

Se evaluó la tolerabilidad del tratamiento mediante mediciones bisemanales del peso corporal y la observación diaria para signos clínicos de efectos secundarios relacionados con el tratamiento. Se eutanizaron los ratones al alcanzar un punto final compasivo (p. ej., 1.600 mm<sup>3</sup> de volumen tumoral) o después de un máximo de 6 semanas después de la administración de dosis.

Los volúmenes tumorales medios  $\pm$  errores estándares se representan en las figuras 6a, 6b, 6c y 6d para cada grupo. Todos los compuestos resultaron bien tolerados. Los resultados muestran que todos los conjugados mostraban una actividad superior a la de Adcetris® y los conjugados **10** y **29** mostraron una reducción completa del volumen tumoral durante todo el estudio.

**Ejemplo 17:** Estudio de xenoinjerto de ratón de Karpas-299 de comparación de conjugados de brentuximab-fármaco **10** y **30** con Adcetris® (comparativo).

Se preparó el conjugado **30** a partir del reactivo de conjugación **20** del Ejemplo 11. Las conjugaciones se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 5.

Este estudio *in vivo* se llevó a cabo de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 16.

El peso corporal medio de los animales en el momento de la inducción tumoral (día 0) era de 19,9 g. La aleatorización y tratamiento se realizaron el día 15, una vez el volumen tumoral medio había alcanzado 205 mm<sup>3</sup>. Los animales del grupo de vehículo recibieron una única inyección intravenosa (i.v.) de PBS. Los grupos tratados recibieron la administración de una dosis de 1 mg/kg mediante una única inyección i.v. de CAF.

Los volúmenes tumorales medios  $\pm$  errores estándares se representan en las figuras 7a, 7b y 7c para cada grupo. Todos los compuestos resultaron bien tolerados. Los resultados muestran que ambos conjugados, **10** y **30**, mostraban una actividad reductora tumoral superior a la de Adcetris® y **10** mostró una reducción tumoral completa durante todo el estudio.

**Ejemplo 18:** Estudios con xenoinjertos de ratón JIMT-1 de comparación del conjugado de trastuzumab-fármaco **31** con Kadcyla® (comparativo).

Se preparó el conjugado **31** a partir del reactivo de conjugación **5** del Ejemplo 2. Las conjugaciones se llevaron a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 5.

El estudio se llevó a cabo de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 15.

Una vez los volúmenes tumorales habían alcanzado un volumen tumoral medio de aproximadamente 150 mm<sup>3</sup>, los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de diez ratones (volumen tumoral medio de 150 mm<sup>3</sup>) y se inició el tratamiento (día 0). Todas las sustancias de ensayo se inyectaron por la vena de la cola (i.v., bolo). Se utilizó una única dosis de 10 o 30 mg/kg de CAF a razón de 10 ml/kg y se utilizó PBS para el grupo de vehículo.

Los volúmenes tumorales medios  $\pm$  errores estándares se representan en las figuras 8a y 8b para cada grupo. Todos los compuestos resultaron bien tolerados. Los resultados muestran que el conjugado **31** reduce el volumen tumoral, mostrando una actividad superior a la de Kadcyla® a ambas dosis.

**Ejemplo 19:** Análisis farmacocinético de CAF que poseen un grupo PEG colgante, un grupo PEG en serie (es decir, un grupo PEG no colgante) y Adcetris®.

Se utilizó el conjugado de brentuximab **10** en el presente estudio como el CAF con un grupo PEG colgante. Se utilizó el conjugado de brentuximab **11** como comparador con un grupo PEG no colgante.

**Farmacocinética *in vivo* en ratas.** Se trataron ratas Sprague-Dawley (3 ratas en cada grupo) con un peso medio de 200 g con **10**, **11** o Adcetris®, por la vena de la cola (bolo i.v.) a una sola dosis de 7 mg/kg. Se llevó a cabo el muestreo en serie de 100  $\mu$ l de sangre antes de la administración de dosis y posteriormente a 30 min, 24 h, 48 h, 7 d, 14 d y 35 d después de la administración de dosis, respectivamente. Se preparó plasma a partir de muestras recientes de sangre y se congeló a -80 °C hasta el análisis.

**ELISA total (anticuerpo anti-CD30).** Se cuantificó el contenido total de anticuerpo brentuximab en muestras de plasma mediante tecnología ELISA. En resumen, se recubrieron placas de 96 pocillos Maxisorp™ con CD30 humano recombinante (Sino Biological Inc., 2,5  $\mu$ g/ml en diluyente) y se incubaron a 4 °C durante la noche. Se diluyeron las muestras de plasma para garantizar que los CAF desconocidos se encontraban dentro del intervalo lineal de la curva de calibración estándar sigmoidal. A continuación, se transfirieron 100  $\mu$ l de la muestra de plasma diluida sobre placas recubiertas con CD30 y se incubaron durante 3 h. Tras la incubación, las placas se lavaron 3x (200  $\mu$ l/pocillo) con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 % (PBST) utilizando un lavador de placas. Se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP (Promega) a la placa y las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente

en un agitador a 350 rpm. A continuación, se lavó la placa 3x con PBST y una vez con tampón de lavado utilizando un lavador de placas. Se añadieron 100 µl de TMB precalentado y se incubaron durante 7 minutos. Se detuvo el ensayo con 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M y se leyó a una λ UV=430 nm utilizando el lector de placas. Los datos se representaron gráficamente y se evaluaron en GraphPad Prism 5 y Microsoft Excel.

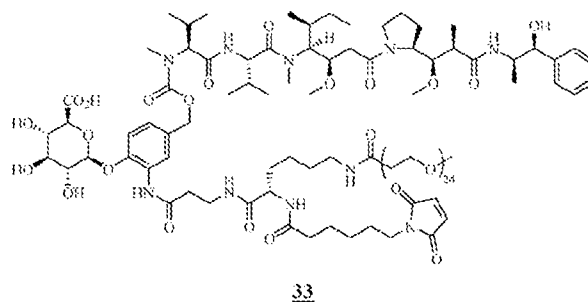
Se llevó a cabo la **captura por afinidad para CD30 para la determinación** de la proporción de fármaco a anticuerpo (PFA) media, la captura por afinidad se llevó a cabo utilizando perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads-estreptavidina T1, Life Technologies). Se biotiniló CD30 (CD30 humano recombinante, Sino Biological Inc.) y se inmovilizó en perlas mediante unión de estreptavidina-biotina y finalmente se bloqueó utilizando péptidos de leche desnatada. Se añadieron 500 µl de la muestra de plasma en PBS a las perlas recubiertas con CD30 y se incubaron durante la noche a 4 °C y finalmente se lavaron utilizando PBS. Los anticuerpos capturados se eluyeron utilizando un tampón de elución ácida durante 5 minutos a 4 °C. El eluido seguidamente se neutralizó a pH 7 utilizando tampón de acetato sódico, pH 8. Las muestras eluidas se mezclaron adicionalmente con tampón de carga de CIH y se analizaron utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica con detección de UV (CIH-UV).

**Cromatografía de interacción hidrofóbica para la determinación de la PFA media.** Las CAF capturadas por afinidad se analizaron utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica con el fin de determinar la proporción media de fármaco a anticuerpo (PFA). El método consistía en un gradiente lineal desde 100 % de tampón A (fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, sulfato amónico 1,5 M) hasta 100 % de tampón B (fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, isopropanol al 20 %) en 30 minutos utilizando una columna de separación de CIH TOSOH TSK gel Butyl-NPR con detección a 280 nm.

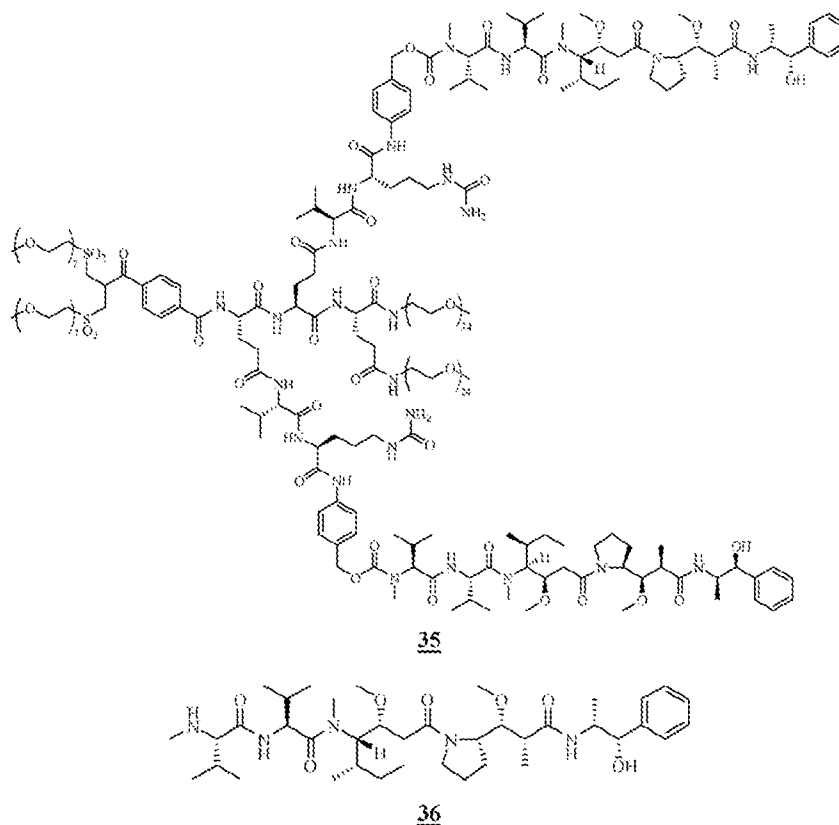
Las figuras 9a y 9b muestran los valores de anticuerpos totales (µg/ml) y de PFA media para las CAF **10** y **11** y Adcetris® en ratas durante un periodo de 850 h. Los resultados mostraban que el conjugado **10** presentaba la tasa más baja de pérdida de fármaco del conjugado y la tasa más baja de eliminación de la circulación a lo largo de este periodo. El conjugado **11** y Adcetris® (comparativos) mostraban una tasa mucho más rápida de disociación del fármaco y resultaron eliminados más rápidamente.

**Ejemplo 20:** síntesis de reactivo de conjugación **33** (comparativo) que comprendía una carga citotóxica de auristatina.

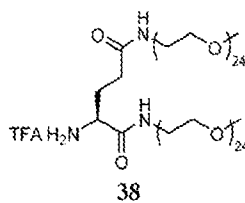
El reactivo de conjugación **33**, que contiene una agrupación funcional de maleimida, se sintetizó tal como se describe en el documento n.º WO2015/057699.



**Ejemplo 21:** Síntesis de reactivo de conjugación **35** que comprende una carga citotóxica **36**.

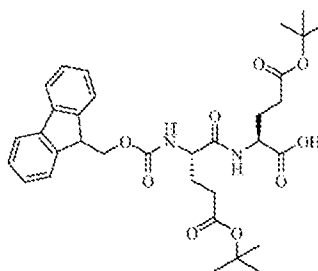


5 Etapa 1: Síntesis de compuesto **38**.



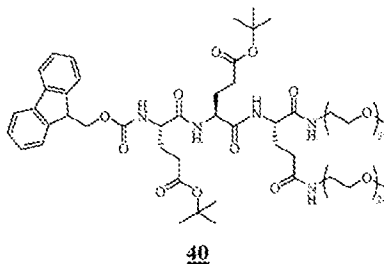
10 A una solución bajo agitación de Boc-L-Glu(OH)-OH (51,6 mg) en DMF anhidro (6 ml) se añadió BOP (277 mg). La solución se sometió a agitación a 0 °C durante 20 minutos antes de añadir MeO-PEG(24)-NH<sub>2</sub> (500 mg) seguido de NMM (68,9 µl). Tras 4 h, se añadieron cantidades adicionales de BOP (92 mg) y NMM (23,0 µl). Tras 2,5 h adicionales, la mezcla de reacción se almacenó a -20 °C durante 18 h antes de concentrarla al vacío y purificarla mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). El solvente orgánico se eliminó al vacío y el solvente acuoso se eliminó mediante liofilización, proporcionando un sólido blanco (373 mg). Se añadió ácido fórmico (6 ml) y la mezcla resultante se sometió a agitación bajo una atmósfera inerte durante 60 minutos antes de concentrarla al vacío. El residuo se disolvió en 95 % agua:5 % acetonitrilo:0,05 % ácido trifluoroacético (~6 ml) y liofilización durante la noche, proporcionando TFA·H<sub>2</sub>N-Glu(PEG(24)-OMe)-PEG(24)-OMe, compuesto **38**, en forma de un sólido blanquecino (330 mg). m/z [M+2H]<sup>2+</sup> (1144, 5 %), [M+3H]<sup>3+</sup> (763, 35 %), [M+4H]<sup>4+</sup> (573, 100 %).

20 Etapa 2: Síntesis de compuesto **39**.



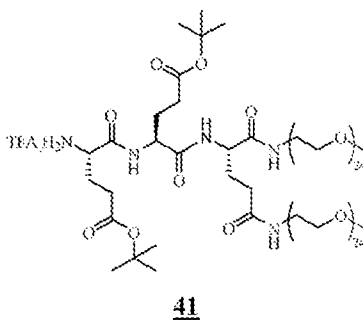
A una solución bajo agitación de Fmoc-Glu(OtBu)-OH (2,00 g) en DMF anhidro (18 ml) a 0 °C se añadió HOBt (666 mg) y DIC (768 µl). La mezcla de reacción se dejó que se calentase hasta la TA y tras 2 h, se añadió Glu(OtBu)-OH (1,19 g) y DIPEA (2,46 ml). Tras someterla a agitación durante 20 h, la mezcla de reacción se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). El solvente orgánico se eliminó al vacío y el solvente acuoso se eliminó mediante liofilización, proporcionando Fmoc-(L-Glu(OtBu))<sub>2</sub>-OH, compuesto 39, en forma de un sólido blanco (1,03 g). m/z [2M+H]<sup>+</sup> (1221, 15 %), [M+H]<sup>+</sup> (611, 60 %), [M-tBu+H]<sup>+</sup> (554, 65 %), [M-2tBu+H]<sup>+</sup> (499, 100 %).

Etapas 3: Síntesis de compuesto 40.



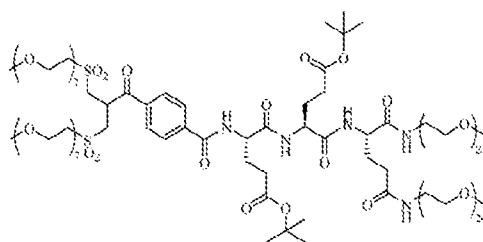
A una solución bajo agitación de compuesto 38 (330 mg) en DMF anhidro (10 ml) se añadió compuesto 39 (100 mg). A continuación, a 0 °C, se añadió HATU (156 mg) y NMM (45,3 µl) y la solución resultante se sometió a agitación durante 5 minutos antes de la adición ulterior de NMM (2,9 µl) y HATU (10,5 mg). Se dejó la solución de reacción bajo agitación durante 20 minutos adicionales antes de calentarla hasta la temperatura ambiente, después de lo cual se continuó la agitación durante 4 h adicionales. Transcurrido este tiempo, se añadieron cantidades adicionales de HATU (51,1 mg) y NMM (15,1 µl). Tras 1,5 h adicionales, la mezcla se almacenó a -20 °C durante 18 h antes de purificarla mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando Fmoc-(L-Glu(OtBu))<sub>2</sub>-L-Glu(PEG(24)-OMe)-PEG(24)-OMe, compuesto 40, en forma de un sólido blanco (193 mg). m/z [M+3H]<sup>3+</sup> (961, 20 %), [M-tBu+4H]<sup>4+</sup> (707, 100%), [M-2tBu+4H]<sup>4+</sup> (693, 85 %), [M+5H]<sup>5+</sup> (577, 75 %).

Etapas 4: Síntesis de compuesto 41.



A una solución bajo agitación de compuesto 41 (193 mg) en DMF anhidro (1,5 ml) se añadió piperidina (19,8 µl). Tras 90 min, se añadió una cantidad adicional de piperidina (13,2 µl) y la reacción se sometió a agitación durante 90 minutos adicionales antes de almacenarla a -20 °C durante 18 h. El solvente se eliminó bajo alto vacío y el residuo resultante se trituró en hexano. El residuo se secó adicionalmente bajo alto vacío durante 30 minutos antes de disolverlo en una mezcla 50:50 de tampón A: tampón B (2 ml, tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 %) y se liofilizó durante la noche, proporcionando TFA·H<sub>2</sub>N-(L-Glu(OtBu))<sub>2</sub>-L-Glu(PEG(24)-OMe)-PEG(24)-OMe, compuesto 41, en forma de un sólido azul pálido (186 mg). m/z [M+3H]<sup>3+</sup> (887, 20 %), [M+4H]<sup>4+</sup> (666, 100 %), [M+5H]<sup>5+</sup> (533, 30 %).

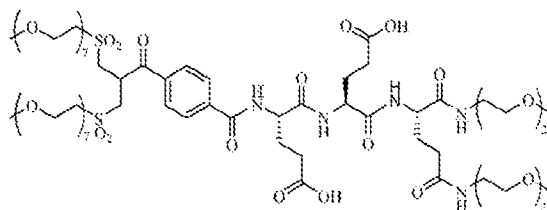
Etapas 5: Síntesis de compuesto 42.

**42**

A una solución bajo agitación de ácido 4-[2,2-bis[alfa-metoxi-omega-sulfonil hepta(etilenglicol)]acetil]benzoico (71,0 mg) en DMF anhidro (1,5 ml) se añadió HATU (27,9 mg). La mezcla se enfrió a 0 °C y se sometió a agitación bajo una atmósfera inerte durante 30 minutos. Se añadió una solución de **41** (186 mg) en DMF anhidro (2,5 ml), seguido de HATU (22,9 mg) y NMM (14,7 µl) y se dejó que la mezcla se calentase hasta la TA.

Tras 3 h, se añadieron cantidades adicionales de ácido 4-[2,2-bis[alfa-metoxi-omega-sulfonil hepta(etilenglicol)]acetil]benzoico (18,1 mg), HATU (50,8 mg) y NMM (15,1 µl). Tras 1,5 h adicionales, se añadieron cantidades adicionales de ácido 4-[2,2-bis[alfa-metoxi-omega-sulfonil hepta(etilenglicol)]acetil]benzoico (9,04 mg), HATU (50,8 mg) y NMM (15,1 µl). La mezcla de reacción se sometió a agitación durante 8 h adicionales y se purificó dos veces mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando **42**, en forma de un aceite amarillo pálido (se supuso cuantitativa), m/z [M+4H]<sup>4+</sup> (902, 60 %), [M-tBu+4H]<sup>4+</sup> (888, 60 %), [M-2tBu+4H]<sup>4+</sup> (874, 45 %), [M-tBu+5H]<sup>5+</sup> (711, 100 %).

Etapas 6: Síntesis de compuesto **43**.

**43**

Se añadió ácido fórmico (2 ml) a **42** bajo una atmósfera inerte. La mezcla de reacción se sometió a agitación durante 60 min antes de concentrarla al vacío. El material se purificó mediante cromatografía flash de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v).

Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando **43**, en forma de un aceite incoloro (28,1 mg), m/z [M+3H]<sup>3+</sup> (1165, 5 %), [M+4H]<sup>4+</sup> (874, 65 %), [M+5H]<sup>5+</sup> (699, 100 %).

Etapas 7: Síntesis de reactivo **35**.

A una solución bajo agitación de compuesto **43** (15,0 mg) en DMF anhidro (270 µl) se añadió HATU (4,08 mg). La mezcla se enfrió a 0 °C y se sometió a agitación bajo una atmósfera inerte durante 20 minutos. Se añadió val-Cit-PAB-MMAE (12,2 mg) en DMF anhidro (300 µl), seguido de HATU (2,45 mg) y NMM (1,89 µl), y se dejó que la mezcla se calentase hasta la TA. Tras 4 h 20 min, se añadieron cantidades adicionales de HATU (3,3 mg) y NMM (0,94 µl). La mezcla de reacción se sometió a agitación durante 2 h adicionales antes de almacenarla a -20 °C durante 18 h. Tras calentarla hasta la TA, se añadió HATU (3,26 mg) y NMM (0,94 µl) a la solución bajo agitación. Tras 4,5 h, se añadieron cantidades adicionales de HATU (1,63 mg) y NMM (0,472 µl) y se dejó la reacción bajo agitación durante 2,5 h adicionales antes de almacenarla a -20 °C durante 18 h. Se purificó el material mediante cromatografía de fase inversa en una columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando **35**, en forma de un sólido blanco (13,8 mg), m/z [M+4H]<sup>4+</sup> (1426, 5 %), [M+5H]<sup>5+</sup> (1141, 70 %), [M+6H]<sup>6+</sup> (951, 100 %), [M+7H]<sup>7+</sup> (815, 20 %).

**Ejemplo 22:** Conjugación de los reactivos **33** (comparativo) y **35** con brentuximab, proporcionando conjugados de anticuerpo-fármaco (CAF) **34** (comparativo) y **44**.

Se conjugó el reactivo de conjugación **33** con brentuximab, dando lugar a CAF **34** utilizando los métodos descritos en los documentos n.º WO2015/057699, n.º US7090843, Lyon et al., (2015) Nature Biotechnology, 33(7) páginas 733-

736 y Lyon et al., (2012), Methods in Enzymology, volumen 502, paginas 123-137. En resumen, se redujo el brentuximab en tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 6,5 (NaCl 150 mM, EDTA 20 mM) con TCEP (6 eq.) a 40 °C durante 1 h. A continuación, se llevó a cabo la conjugación del anticuerpo reducido con 2,0 equivalentes molares de reactivo **33** por cada tiol libre). Se añadió el reactivo **33** al anticuerpo monoclonal (mAb), proporcionando una concentración final de anticuerpo de 4 mg/ml. La solución se mezcló suavemente y se incubó a 22 °C durante 2 h. Transcurridas las 2 h, se añadió reactivo adicional **33** (0,2 equivalentes molares) y la mezcla se incubó durante 1 h adicional a 22 °C. El exceso de reactivo **33** se desactivó con N-acetil-L-cisteína (20 eq. sobre el reactivo) y la reacción en bruto se purificó utilizando una columna de CIH ToyoPearl Phenyl-650S de 1 ml equilibrada con fosfato sódico 50 mM, pH 7 (NaCl 2 M). El CAF se eluyó de la columna con un gradiente de fosfato sódico 50 mM, pH 7 (isopropanol al 20 %). Se agruparon las fracciones que contenían CAF y se concentraron (Vivaspin20, membrana de polietersulfona (PES)), proporcionando un producto de PFA media 8. Se intercambió el tampón de la muestra concentrada en DPBS, pH 7,1-7,5 y se filtró a esterilidad.

El CAF **34** resultó difícil de purificar y caracterizar debido a la heterogeneidad de los productos de reacción (número de variantes de PFA), comportando una resolución reducida de las especies de PFA individuales en la CIH preparativa. Los resultados muestran que el producto de reacción final contenía cantidades significativas de especies con PFA tanto superior como inferior a PFA 8. La purificación de especies de PFA 8 por completo a partir de dichas especies con PFA superior e inferior a PFA 8 resultaría en rendimientos significativamente más bajos de PFA 8 en el producto final.

El reactivo de conjugación **35** se conjugó con brentuximab, dando lugar a CAF **44** utilizando el procedimiento de conjugación descrito en el Ejemplo 5.

**Ejemplo 23:** Estudio de xenoinjerto de ratón de Karpas-299 de comparación de conjugados de brentuximab-fármaco **34** y **44**.

Este estudio *in vivo* se llevó a cabo de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 16. El peso corporal medio de los animales en el momento de la inducción tumoral (día 0) era de 18,8 g. El número de animales por grupo de tratamiento era de 5. La aleatorización y tratamiento se realizaron el día 17, una vez el volumen tumoral medio había alcanzado 167 mm<sup>3</sup>. Los animales del grupo de vehículo recibieron una única inyección intravenosa (i.v.) de PBS. Los grupos tratados recibieron la administración de una dosis de 0,5 mg/kg mediante una única inyección i.v. de CAF. Todos los compuestos resultaron bien tolerados.

La figura 10 muestra el % de cambio de volumen tumoral para los CAF **34** y **44** el día 28. Se definió 100 % como el volumen tumoral en el primer día de administración de dosis (día 17).

**Ejemplo 24:** Comparación de conjugados de PEG colgante **34** (comparativo) y **44** mediante ensayo de estrés térmico.

Se prepararon muestras de CAF **34** y **44** a una concentración de 0,5 mg/ml mediante dilución con DPBS, pH 7,1 a 7,5.

Se incubaron dos muestras de CAF a 65 °C durante 30 minutos, seguido de la incubación en un baño de hielo durante 5 minutos antes de la cromatografía de exclusión por tamaños (CET). La CET se llevó a cabo utilizando una columna TOSOH Bioscience TSK gel Super SW 3000. Se realizó un seguimiento de la absorbancia de UV a 280 nm durante una elución isocrática con un tampón de fosfato potásico 2 M, pH 6,8 (cloruro potásico 0,2 M e isopropanol al 15 %).

Las Tablas 4a y 4b, posteriormente, muestran las conformaciones de los CAF **34** y **44** antes y después del ensayo de estrés térmico, medido como la superficie bajo la curva de cada pico por la Abs 280 nm, tras la CET.

Los resultados en las Tablas 4a y 4b muestran que el CAF **44** se mantiene en un estado no agregado en mucha mayor medida que CAF **34** tras el ensayo de estrés térmico. Además, los resultados también muestran que **34** se disocia en componentes de peso molecular más ligero en mayor medida que el conjugado **44**.

Tabla 4a

Conformación de CAF antes del ensayo de estrés térmico (% del CAF total)	<b>34</b>	<b>44</b>
No agregado	97,4	100
Agregado	1,8	0
Disociado	0,7	0



Tabla 4b

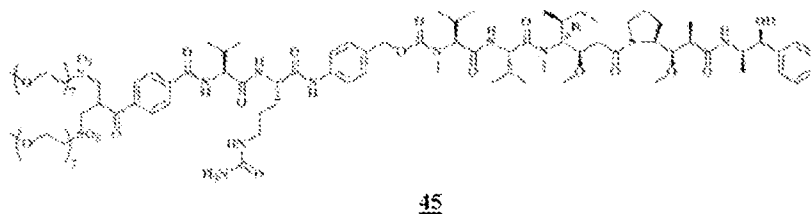
Conformación de CAF después del ensayo de estrés térmico (% del CAF total)	<b>34</b>	<b>44</b>
No agregado	11,1	69,4
Agregado	71	27,7
Disociado	17,9	1,2

**Ejemplo 25:** Comparación de las PFA medias para los conjugados con PEG colgante **34** y **44** tras la incubación en suero humano.

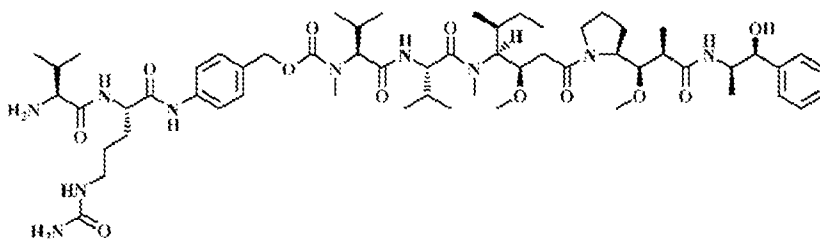
Los CAF **34** y **44** se diluyeron a 0,1 mg/ml en suero humano, contenido de suero de 88 % (v/v). Cada solución se dividió inmediatamente en subalícuotas en 4x tubos Eppendorf de baja adherencia de 0,5 ml. Dos de los tubos Eppendorf, correspondientes a los puntos temporales "0" se transfirieron inmediatamente al congelador de -80 °C, mientras que el resto de las muestras se incubó a 37 °C durante 6 días. Tras 6 días, se sacaron las muestras apropiadas del congelador y del incubador para la purificación mediante captura por afinidad (perlas magnéticas recubiertas con CD30), seguido del análisis utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH). Se llevó a cabo la captura por afinidad para CD30 y CIH para la determinación de la PFA media tal como se ha descrito en el Ejemplo 19.

La figura 11 muestra que, tras 6 días a 37 °C en suero humano, el conjugado **34** había perdido gran parte de su carga citotóxica, mientras que el conjugado **44** se mantuvo mayoritariamente sin cambios, tal como indica la reducción del valor medio de PFA de la muestra. Lo anterior indica que el conjugado de la invención presentaría una estabilidad *in vivo* mejorada.

**Ejemplo 26:** Síntesis de reactivo de conjugación **45** (comparativo) que comprende una carga citotóxica de auristatina



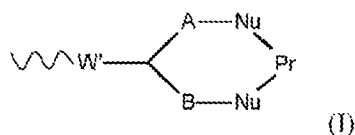
A la sal TFA de val-cit-PAB-MMAE que presenta la estructura a continuación:



(25,0 mg) se le añadió una solución de reactivo **5A** (15,6 mg) en DMF (1,5 ml) y se sometió a agitación bajo una atmósfera inerte de nitrógeno a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadieron alícuotas de HATU (6,1 mg) y NMM (1,8 µl) cada 20 minutos para un total de 5 adiciones. Tras 1,5 h, la mezcla de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente. Tras 2 h, los volátiles se eliminaron al vacío. El residuo resultante se disolvió en agua y acetonitrilo (v/v 1/1, 0,6 ml) y se purificó mediante cromatografía de fase inversa en columna C18, eluyendo con tampón A (v/v): agua:acetonitrilo al 5 %:ácido trifluoroacético al 0,05 % y tampón B (v/v): acetonitrilo:ácido trifluoroacético al 0,05 % (100:0 v/v a 0:100 v/v). Se eliminó el solvente orgánico al vacío y se eliminó el solvente acuoso mediante liofilización, proporcionando bis-mPEG(7u)sulfona-propanoíl-benzamida-val-cit-PAB-MMAE reactivo **45** en forma de unos polvos blancos (22,4 mg, 68 %) m/z [M+2H]<sup>2+</sup> 1035.

## REIVINDICACIONES

1. Conjugado de una proteína o péptido con un agente terapéutico, en el que dicho conjugado que contiene una parte de unión a la proteína o péptido y presenta un conector que conecta el agente terapéutico con la parte de unión de proteína o péptido, en el que dicho conector incluye una parte de polietilenglicol, en la que dicha parte de unión de proteína o péptido presenta la fórmula general siguiente:



en la que:

Pr representa dicha proteína o péptido;

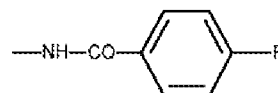
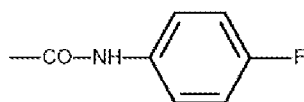
cada Nu representa un átomo de azufre o un grupo de amina proporcionado por un residuo de cisteína, lisina o histidina presente en la proteína o péptido Pr, o cada Nu representa un grupo imidazol presente en una etiqueta de polihistidina unida a la proteína o péptido Pr;

cada uno de A y B representa independientemente una cadena de alquileo o alquenileno C<sub>1-4</sub>, y

W' representa un grupo ceto o un grupo CH-OH;

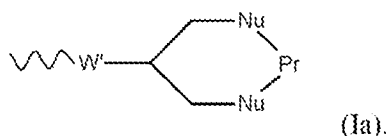
dicha parte de polietilenglicol es o incluye una cadena de polietilenglicol colgante que presenta un grupo terminal de fórmula -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR, en la que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un grupo arilo sustituido opcionalmente, y en el que dicha cadena de polietilenglicol colgante presenta un peso molecular medio en número de hasta 75.000 g/mol;

el conector incluye la agrupación:

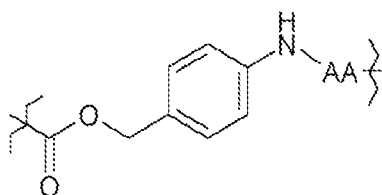


en la que F' representa dicha parte de unión de proteína o péptido de fórmula I, y la proteína o péptido es una proteína de unión a receptor o ligando, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

2. Conjugado según la reivindicación 1, en el que R representa un átomo de hidrógeno o un grupo de alquilo C<sub>1-4</sub>.
3. Conjugado según la reivindicación 1 o 12, en el que dicha cadena de polietilenglicol colgante contiene entre 2 y 50 unidades de polietilenglicol.
4. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada Nu representa un átomo de azufre presente en un residuo de cisteína en la proteína o péptido Pr.
5. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente terapéutico es un agente citotóxico o una toxina.
6. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.
7. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha parte de unión de proteína o péptido presenta la fórmula siguiente:

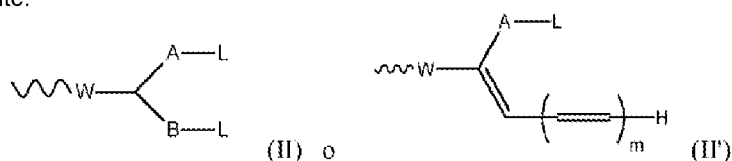


8. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el conector incluye un grupo que es susceptible de degradación enzimática.
9. Conjugado según la reivindicación 8, en el que el grupo susceptible de degradación enzimática es:



en el que AA representa una secuencia de aminoácidos específica de proteasa.

10. Conjugado según la reivindicación 9, en el que la secuencia de aminoácidos comprende 1 a 5 aminoácidos.
11. Reactivo de conjugación capaz de reaccionar con una proteína o péptido y que incluye un agente terapéutico, en el que dicho reactivo presenta un conector que conecta el agente terapéutico con una agrupación funcional, en el que dicho conector incluye una parte polietilenglicol y dicha agrupación funcional presenta la fórmula siguiente:



en la que:

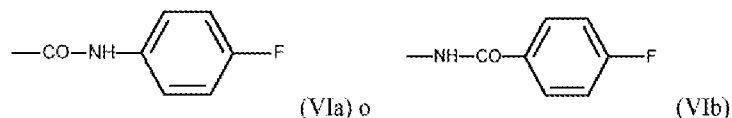
W representa un grupo ceto o un grupo CH-OH;

cada uno de A y B representa independientemente una cadena de alquileo o alquenileo C<sub>1-4</sub>;

cada L representa independientemente un grupo saliente;

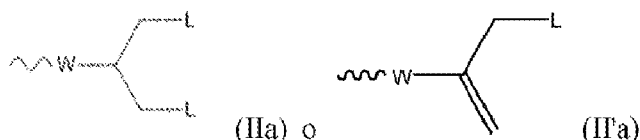
dicha parte de polietilenglicol es o incluye una cadena de polietilenglicol colgante que presenta un grupo terminal de fórmula -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR, en la que R representa un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un grupo arilo sustituido opcionalmente, y en el que dicha cadena de polietilenglicol colgante presenta un peso molecular medio en número de hasta 75.000 g/mol;

el conector incluye la agrupación:



en la que F representa la agrupación funcional de fórmula II o II'.

12. Reactivo de conjugación según la reivindicación 11, en el que R representa un átomo de hidrógeno o un grupo de alquilo C<sub>1-4</sub>.
13. Reactivo de conjugación según la reivindicación 11 o 12, en el que dicha cadena de polietilenglicol colgante contiene entre 2 y 50 unidades de polietilenglicol.
14. Reactivo de conjugación según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el agente terapéutico es un agente citotóxico o una toxina.
15. Reactivo de conjugación según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que dicha agrupación funcional presenta la fórmula siguiente:

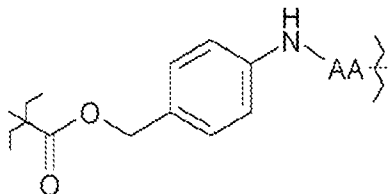


16. Reactivo de conjugación según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que W representa un grupo ceto.
17. Reactivo de conjugación según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que cada L representa -SP, -OP, -SO<sub>2</sub>P, -OSO<sub>2</sub>P, -N+PR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, halógeno, o -OØ, en los que P representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, arilo o alquilarilo, o es un grupo que incluye una parte -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>- en la que n es un número igual a 2 o superior, y cada uno de R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> representa independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo

alquilo C<sub>1-4</sub> o un grupo P, y Ø representa un grupo arilo sustituido que contiene por lo menos un sustituyente aceptor de electrones.

18. Reactivo de conjugación según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que el conector incluye un grupo que es susceptible de degradación enzimática.

19. Reactivo de conjugación según la reivindicación 18, en el que el grupo susceptible de degradación enzimática es:



en el que AA representa una secuencia de aminoácidos específica de proteasa.

20. Procedimiento para la preparación de un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende hacer reaccionar un reactivo de conjugación según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19 con una proteína o un péptido.

Figura 1

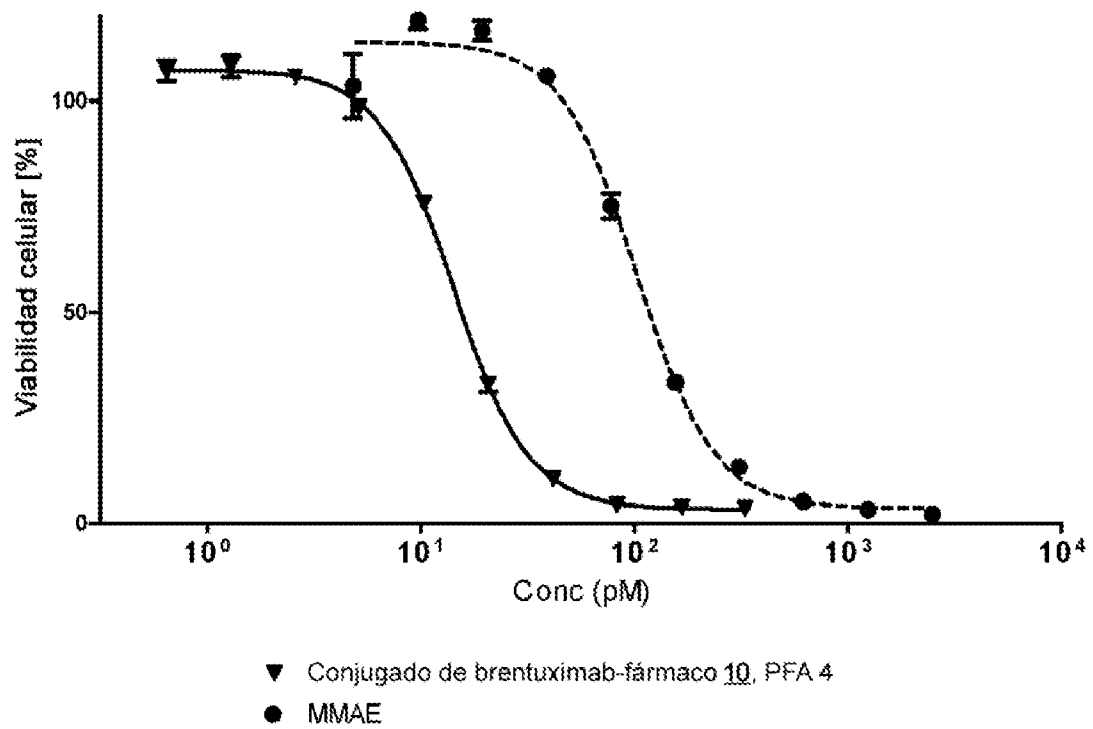


Figura 2

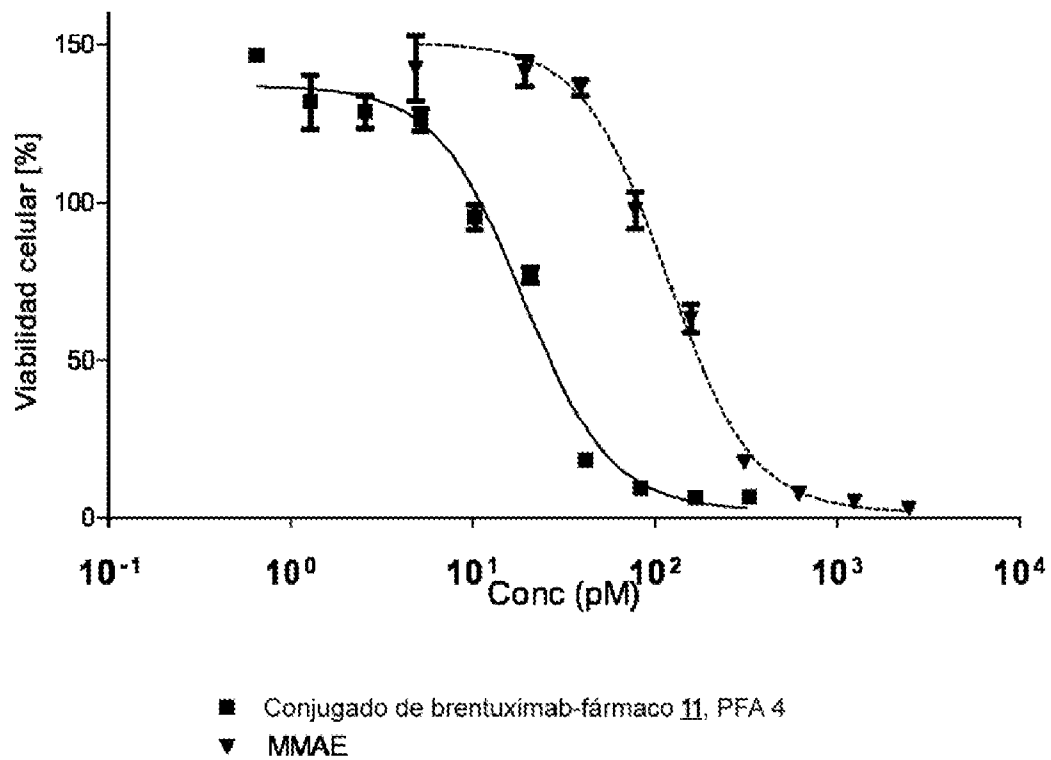


Figura 3

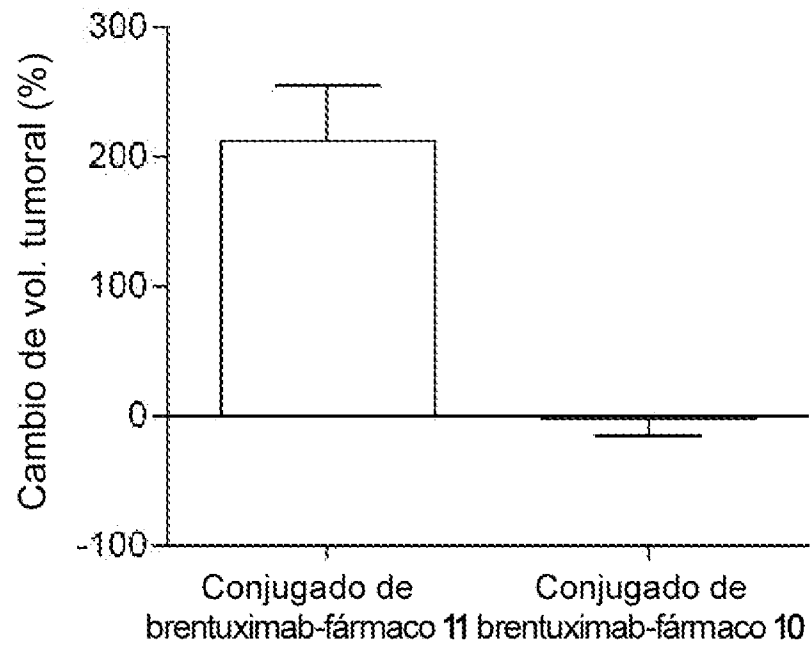


Figura 4a:

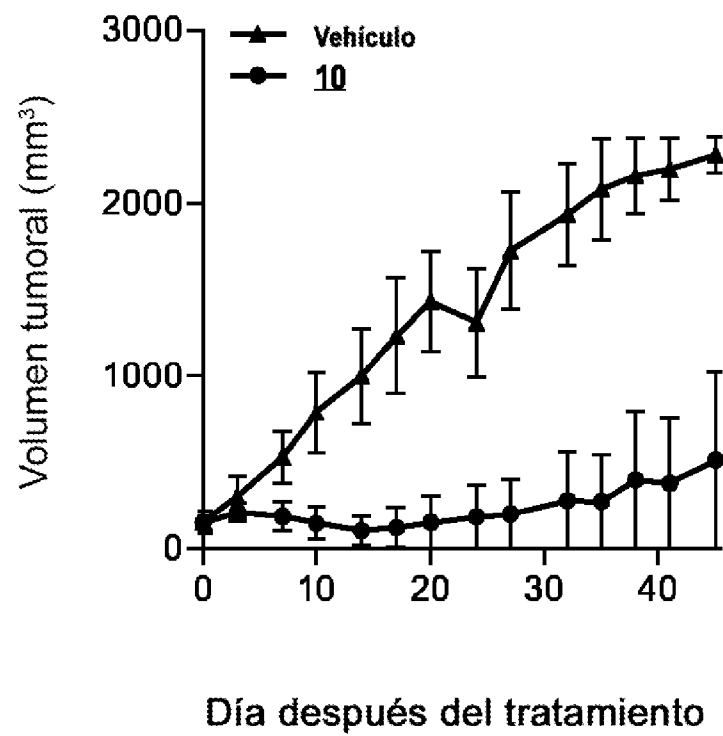


Figura 4b:

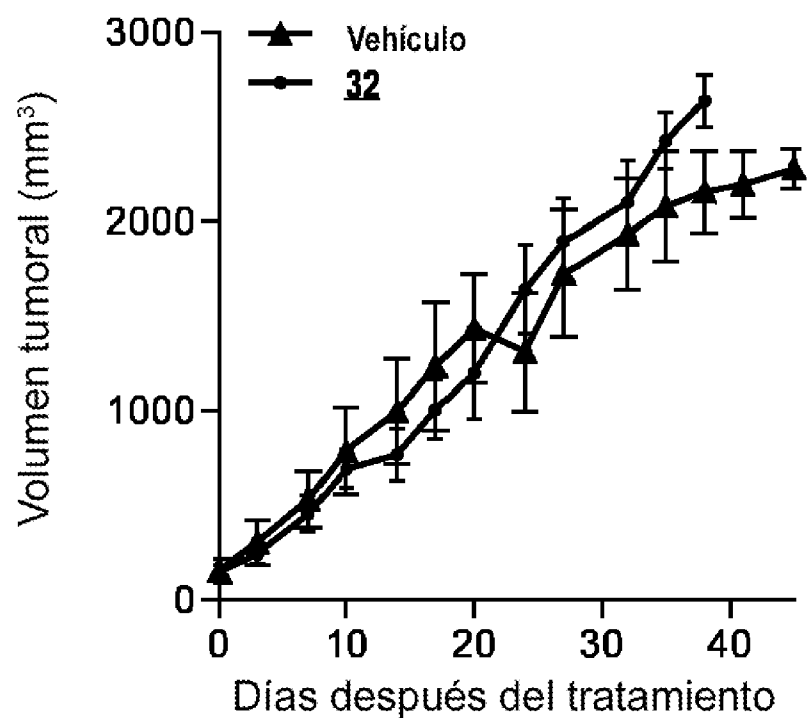


Figura 4c:

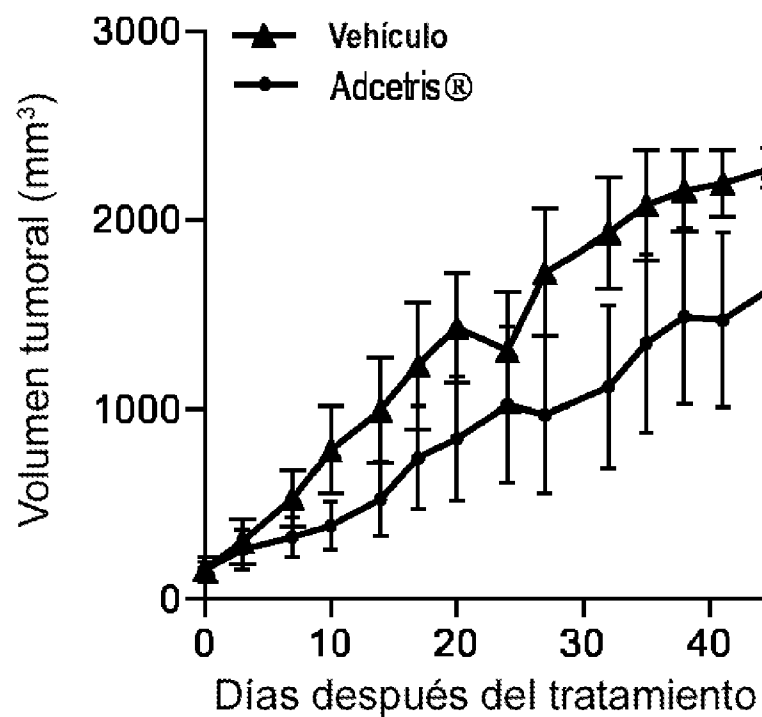


Figura 5a:

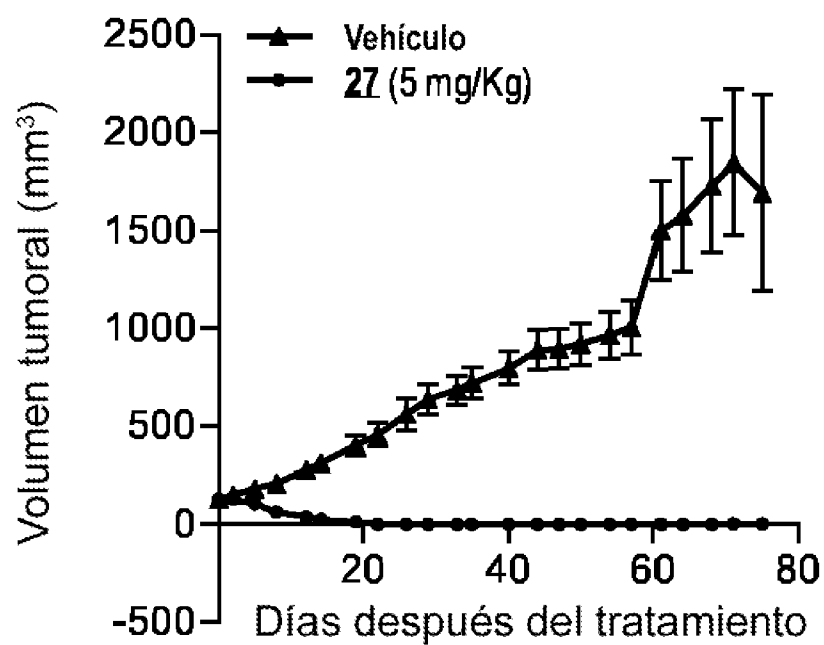


Figura 5b:

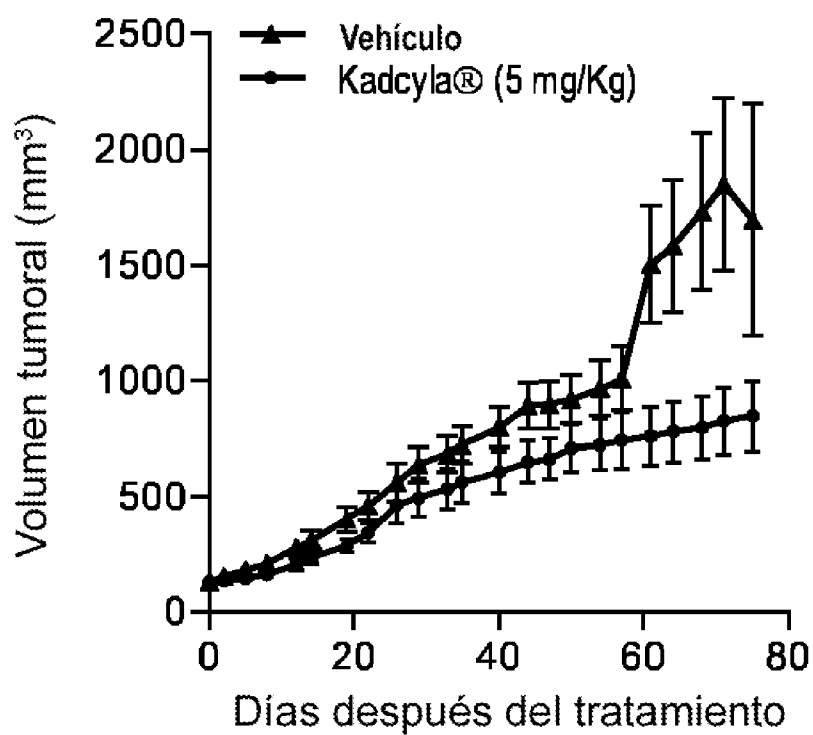




Figura 6a:

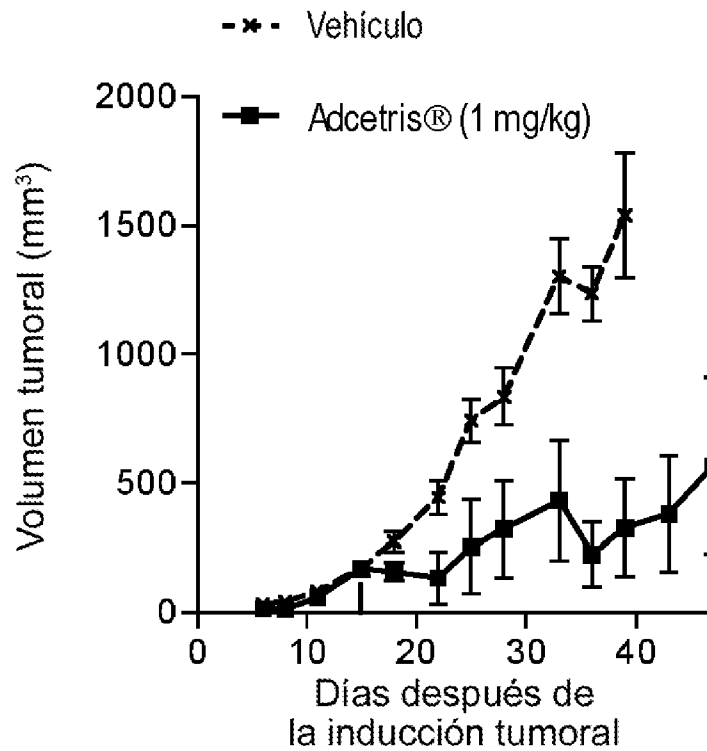


Figura 6b:

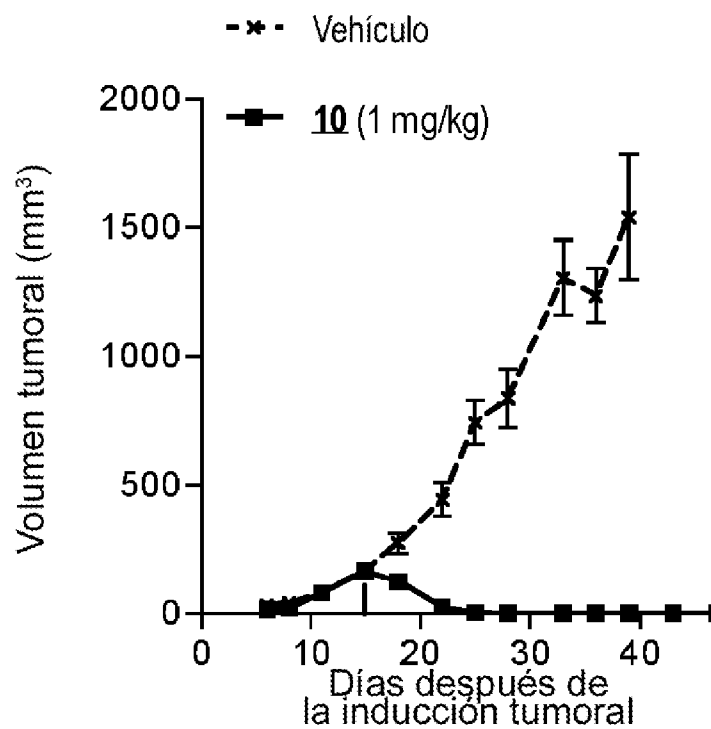


Figura 6c:

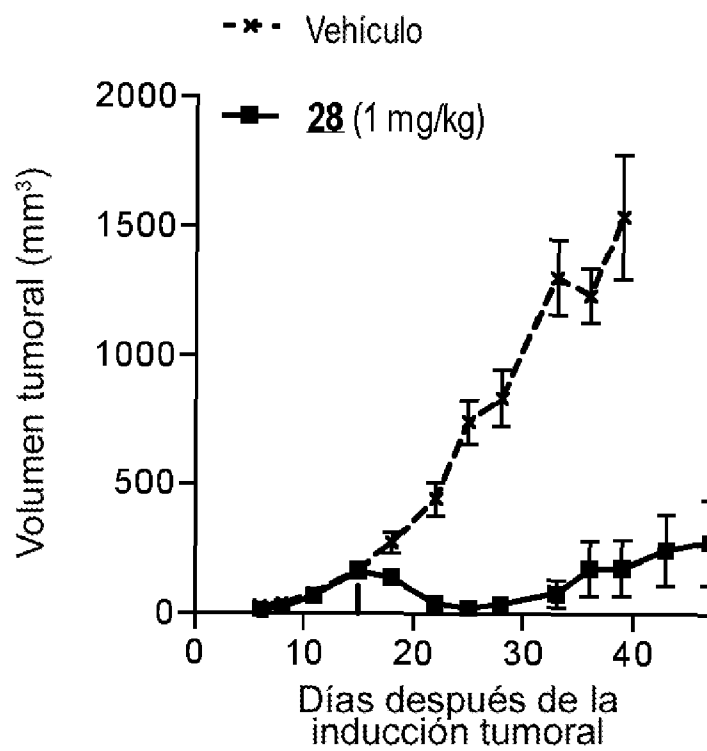


Figura 6d:

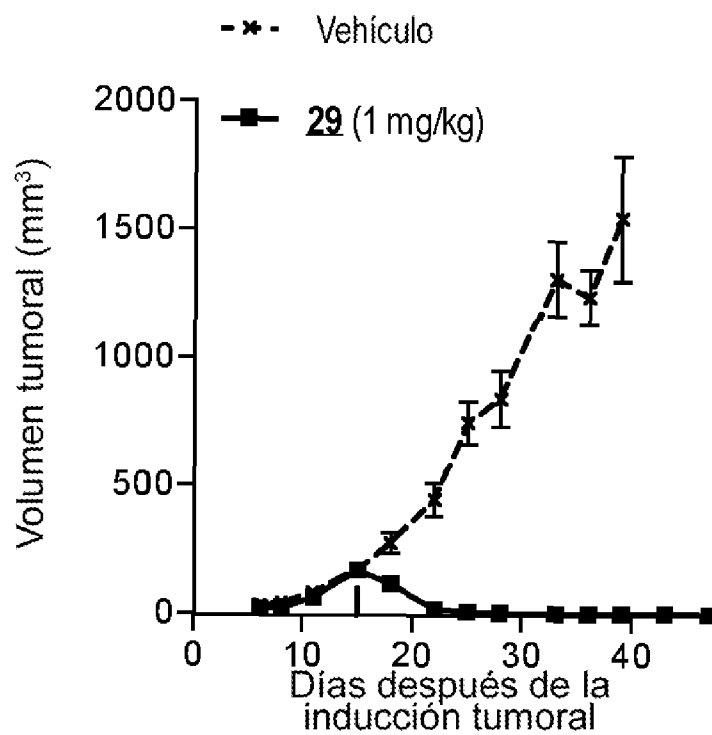


Figura 7a:

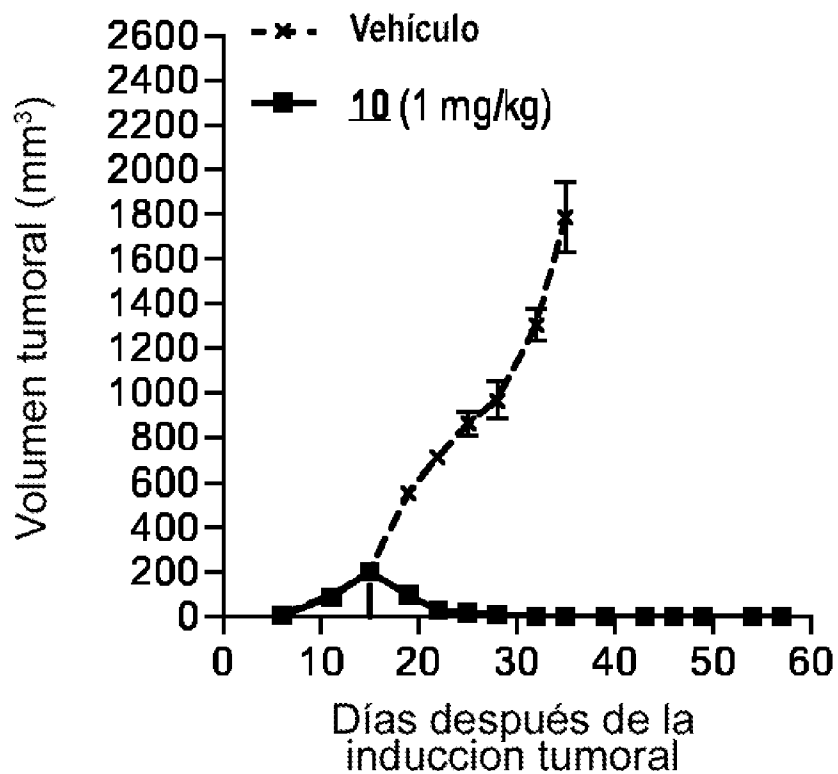


Figura 7b:

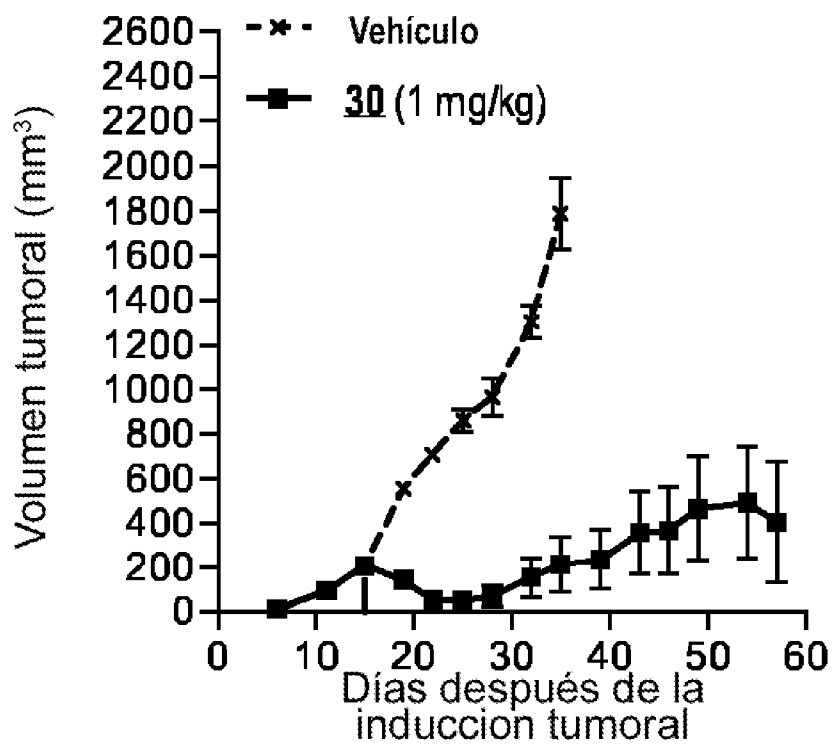


Figura 7c:

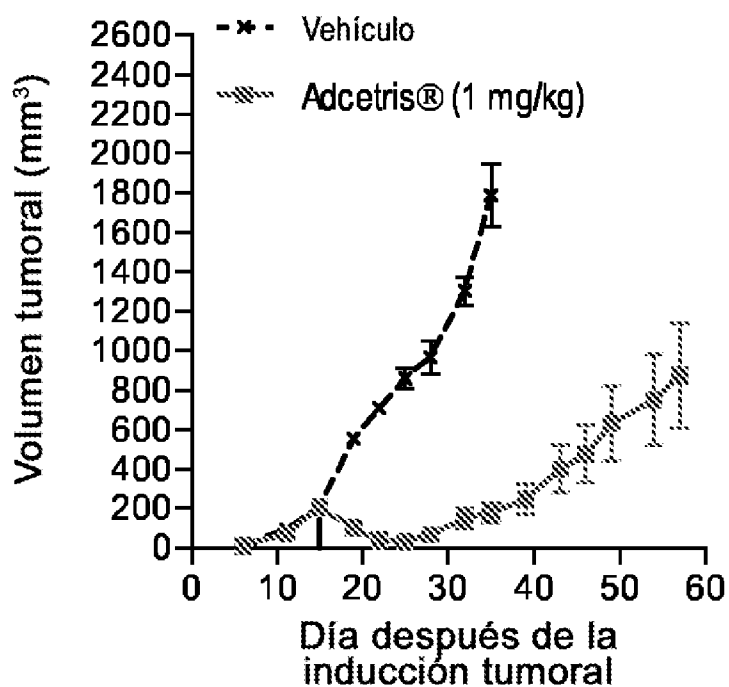


Figura 8a:

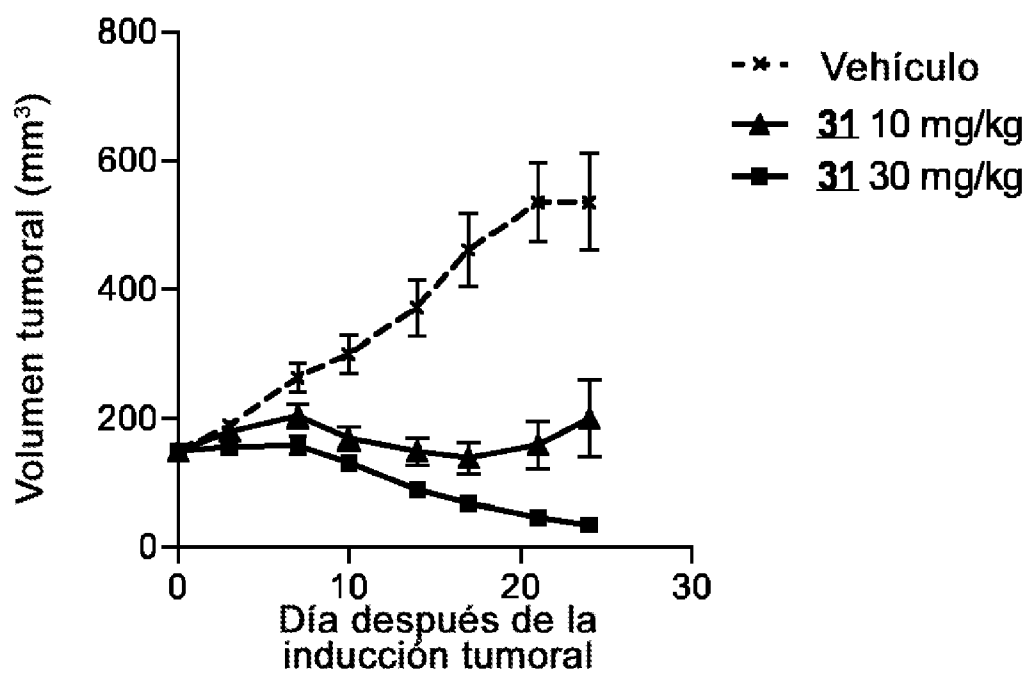


Figura 8b:

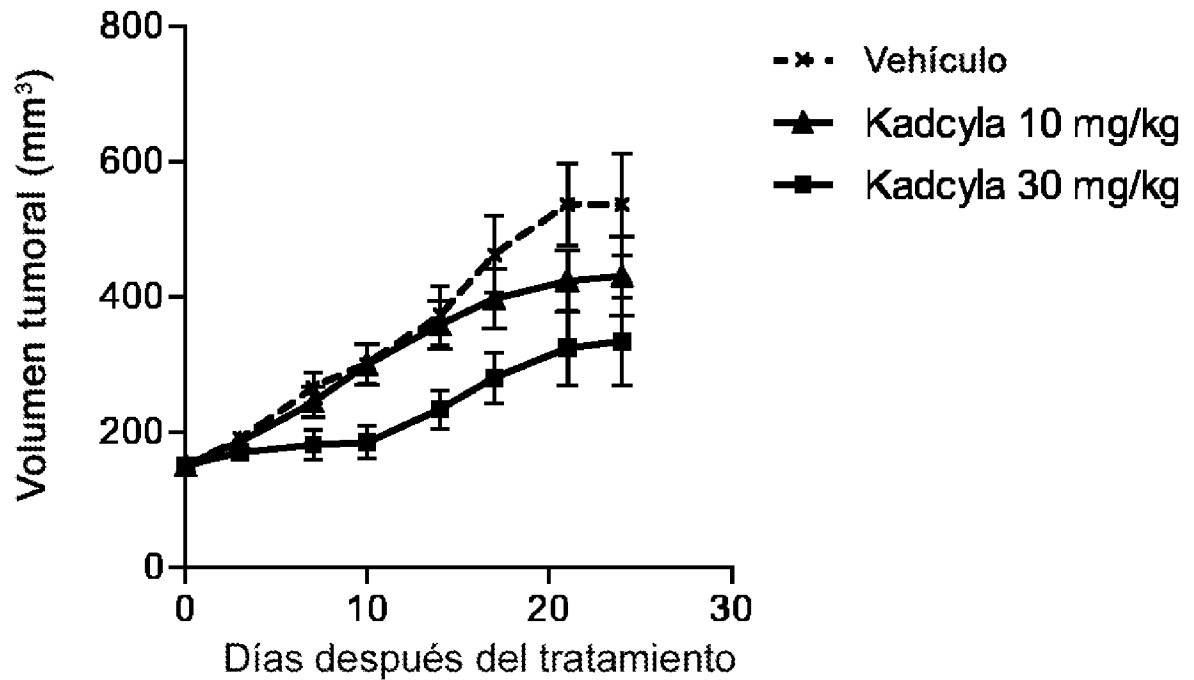


Figura 9a:

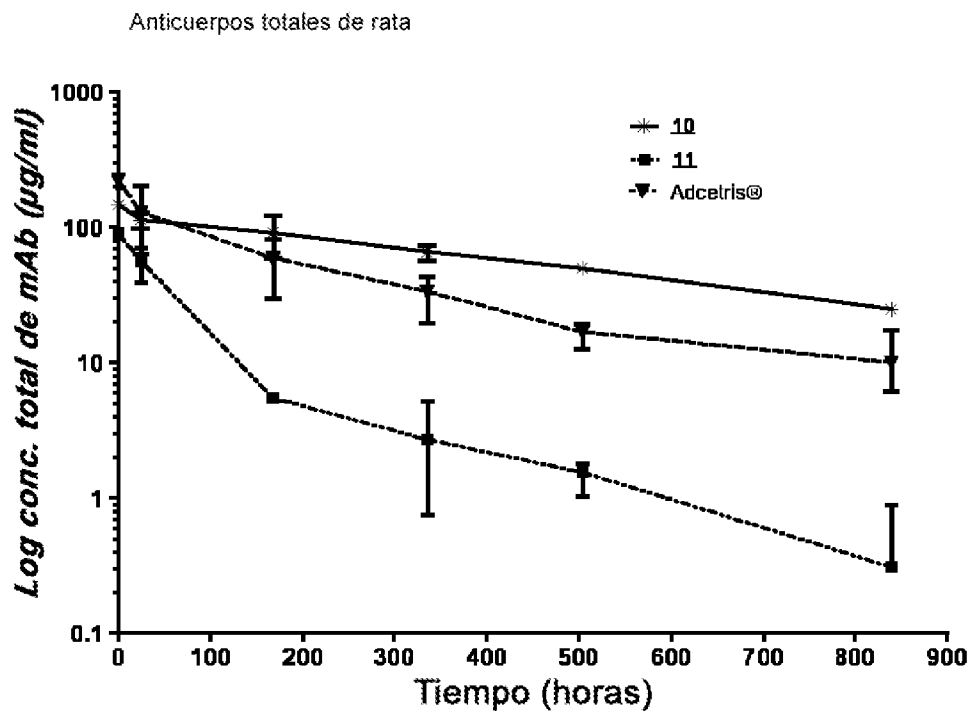


Figura 9b:

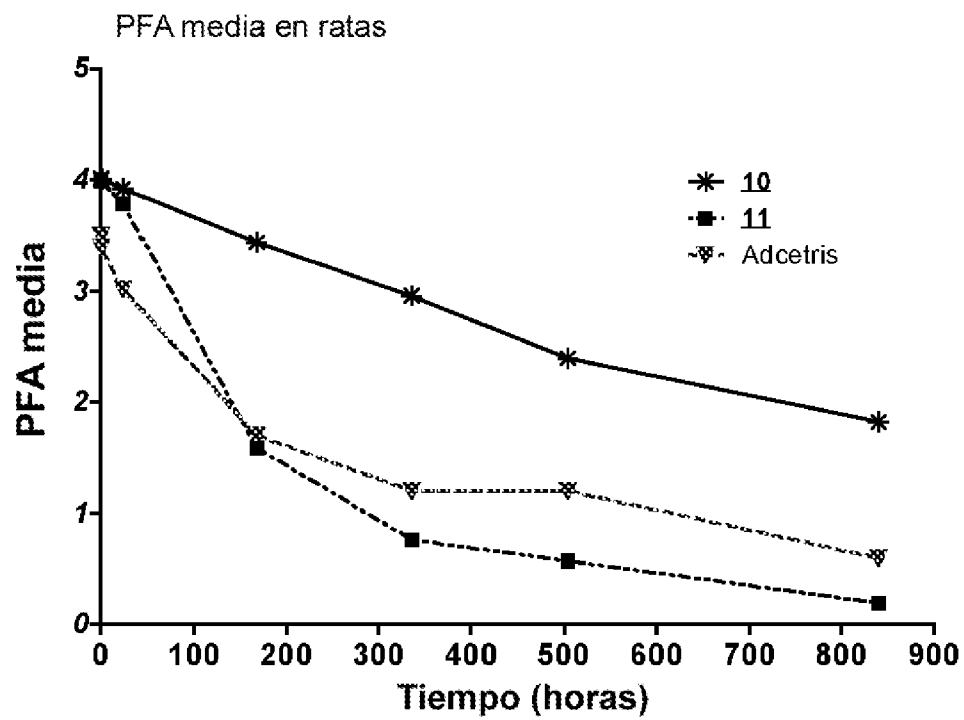


Figura 10:

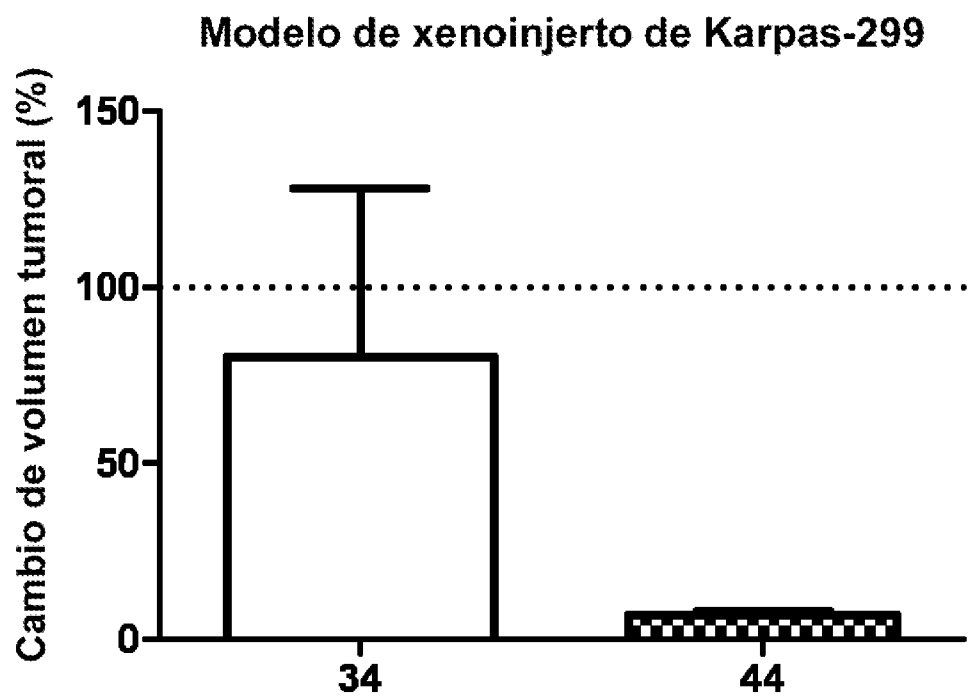


Figura 11

