

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 983 109**

(51) Int. Cl.:

**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: **14.05.2013 PCT/US2013/040951**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13173337**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2013 E 13791383 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 2850094**

---

(54) Título: **Conjugados enlazadores autoestabilizantes**

(30) Prioridad:

**15.05.2012 US 201261647373 P**  
**28.02.2013 US 201361770983 P**  
**05.03.2013 US 201361773067 P**  
**13.03.2013 US 201313799244**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.10.2024**

(73) Titular/es:

**SEAGEN INC. (100.0%)**  
**21823 30th Drive S.E.**  
**Bothell, WA 98021, US**

(72) Inventor/es:

**LYON, ROBERT;**  
**DORONINA, SVETLANA y**  
**BOVEE, TIMOTHY**

(74) Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 983 109 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

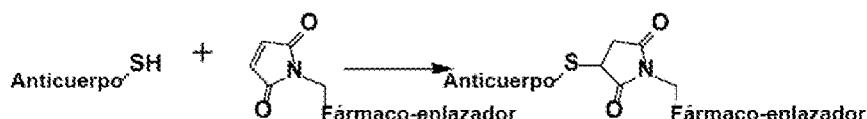
Conjugados enlazadores autoestabilizantes

5 **Continuidad**

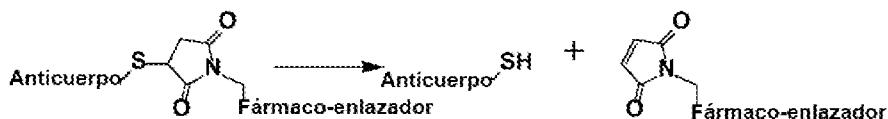
La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos N.º 61/647.373, presentada el 15 de mayo de 2012, y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/773.067, presentada el 5 de marzo de 2013, y también reivindica prioridad sobre la solicitud de Estados Unidos n.º de serie 13/799.244, 10 presentada el 13 de marzo de 2013.

**Antecedentes de la invención**

15 El campo de los conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) ha avanzado significativamente con la aprobación por la FDA de Brentuximab Vedotin para el tratamiento de un grupo selecto de pacientes y con el avance de muchos otros CAF en la clínica. El componente enlazador de los CAF es una característica importante en el desarrollo de agentes terapéuticos optimizados que sean altamente activos a dosis bien toleradas. El grupo funcional maleimida electrofílica ha demostrado ser muy útil en la preparación de CAF debido a su alto grado de especificidad para reaccionar con 20 grupos tiol y la cinética de adición tiol muy rápida en condiciones suaves.



Como han señalado múltiples investigadores en el campo de los bioconjugados, el producto tio-sustituido de la 25 reacción entre el grupo funcional maleimida electrofílica y el tiol libre del anticuerpo está sujeto a una eliminación lenta, invirtiendo así la reacción anterior:



30 Cuando se produce esta reacción reversible en una preparación purificada del CAF, la reacción es en gran medida indetectable porque la maleimida y el tiol que se regeneran mediante el proceso de eliminación simplemente reaccionan de nuevo, reformando así el conjugado intacto. Sin embargo, cuando hay otros tioles presentes, el efecto neto puede ser la transferencia de la maleimida del anticuerpo del CAF a cualquier otro tiol disponible. Se ha documentado que este proceso ocurre en el plasma, en el que la maleimida de un CAF se transfiere a la cisteína 34 de la seroalbúmina (Alley *et al.*, Bioconjugate Chem. 2008, 19, 759-765). Este proceso también se ha descrito cuando 35 se incuba un CAF en presencia de un exceso de cisteína o glutatión (Shen *et al.*, Nature Biotech, 30(2): 184-9, 2012). La presente invención proporciona, entre otras cosas, bioconjugados que no sufren esta reacción de transferencia. El documento EP0446071 A1 se refiere a compuestos de tris-maleimida como intermedios en la síntesis de anticuerpos trifuncionales. Stephen C. Alley *et al.*, Bioconjugate chemistry, vol. 19, n.º 3, 1 de marzo de 2008, 759-765 40 se refiere a la contribución de la estabilidad del enlazador a la actividad de los inmunoconjugados contra el cáncer.

**Breve sumario de la invención**

45 La invención proporciona, entre otras cosas, Enlazadores, Fármaco-Enlazadores, Conjugados de Ligando-Fármaco, Conjugados de Ligando-Enlazador, Conjugados de Ligando-Agente Funcional y Enlazadores-Agente Funcional y métodos para prepararlos y utilizarlos. Los conjugados de ligando-fármaco son estables en la circulación, pero capaces de infiligr la muerte celular una vez liberado en las proximidades o dentro de las células tumorales.

**Breve descripción de los dibujos**

- 50 La **figura 1** muestra un esquema de reacción que ilustra la reducción de los disulfuros intracatenarios de una IgG1 humana, seguido de la conjugación de los tioles resultantes con un enlazador autoestabilizante y la posterior hidrólisis del anillo de succinimida (Arriba); y el uso de la espectrometría de masas para controlar el cambio en el peso molecular de los conjugados de anticuerpos debido a la hidrólisis (Abajo).
- 55 La **figura 2** ilustra el curso temporal de la hidrólisis del anillo de succinimida de un conjugado de anticuerpo autoestabilizante mediante espectrometría de masas por electropulverización. La conjugación del cAC10

- totalmente reducido con maleimido-DPR-val-cit-PAB-MMAE se realizó a pH 7,2 y 22 °C, a continuación, las muestras se sometieron a análisis por LC-MS a los tiempos indicados (Arriba). Los datos resultantes del % de hidrólisis se trazaron en función del tiempo y se ajustaron a una ecuación exponencial para determinar los parámetros cinéticos (abajo).
- 5 La **figura 3** muestra los perfiles cinéticos de hidrólisis de los bioconjugados preparados con un anticuerpo IgG1 y enlazadores autoestabilizantes con espaciado variable entre la maleimida y el grupo básico (una amina primaria). La conjugación se realizó a pH 8 y 37 °C, a continuación, la hidrólisis del conjugado de cadena ligera IgG1 se supervisó inmediatamente mediante espectrometría de masas, representada en función del tiempo y ajustada a una ecuación exponencial.
- 10 15 La **figura 4** muestra los perfiles cinéticos de hidrólisis de los bioconjugados preparados con un anticuerpo IgG1 y enlazadores autoestabilizantes de maleimida con espaciado variable entre la maleimida y el grupo básico (una amina primaria). La conjugación se realizó a pH 8 y 37 °C, a continuación, la hidrólisis del conjugado de cadena ligera IgG1 se supervisó inmediatamente mediante espectrometría de masas, representada en función del tiempo y ajustada a una ecuación exponencial.
- 20 25 La **figura 5** muestra los perfiles cinéticos de hidrólisis de bioconjugados preparados con un anticuerpo IgG1 y varias maleimidas N-sustituidas. La conjugación se realizó a pH 7,4 y 22 °C, a continuación, la hidrólisis del conjugado de cadena ligera IgG1 se supervisó inmediatamente mediante espectrometría de masas, representada en función del tiempo y ajustada a una ecuación exponencial. La hidrólisis del conjugado maleimido-caproilo (estructura inferior) es demasiado lenta para producir una hidrólisis detectable en 24 horas en estas condiciones. La presencia del grupo carboxamida acceptor electrones (GAE) o de la amina primaria (BASE) acelera la hidrólisis y la combinación de ambos (estructura superior) da lugar a un conjugado que se hidroliza con una semivida inferior a 20 minutos en estas condiciones suaves.
- 30 La **figura 6** muestra los perfiles cinéticos de hidrólisis de los fármacos maleimido autoestabilizantes preparados con ácido α-diaminopropiónico (α-DPR, círculos abiertos) y con ácido β-diaminopropiónico (β-DPR, círculos rellenos). Aunque son isómeros entre sí, la posición del grupo amino básico y de la carboxamida aceptora de electrones con respecto a la succinimida da lugar a una diferencia de 17 veces en la velocidad de hidrólisis de la succinimida.
- 35 40 La **Figura 7** ilustra el cambio en la carga de fármaco a lo largo del tiempo para un CAF preparado con un enlazador de fármaco maleimido-DPR autoestabilizante frente a uno preparado con un enlazador de fármaco maleimido-caproilo cuando se incuba en un tampón que contiene exceso de tiol. En el panel superior se muestran los cromatogramas en fase inversa de los dos CAF a tiempo cero y a tiempo de 14 días después de la incubación. La asignación de los picos cromatográficos L0, L1, H0, H1, H2 y H3 corresponden a la cadena ligera no conjugada, la cadena ligera con un fármaco, la cadena pesada no conjugada y la cadena pesada con 1, 2 o 3 fármacos, respectivamente. El enlazador maleimido-DPR autoestabilizante se representa con círculos abiertos frente al preparado con un enlazador maleimido-caproilo (cuadrados abiertos). La carga de fármaco se mantiene constante en 8 por anticuerpo para el enlazador autoestabilizante del fármaco (círculos abiertos), pero desciende a 4 fármacos por anticuerpo a lo largo de 14 días para el enlazador de fármacos maleimido-caproilo (cuadrados abiertos), lo que refleja la pérdida de fármaco por eliminación de maleimida.
- 45 La **Figura 8** ilustra el cambio en la carga de fármaco con el tiempo para CAF preparados con un enlazador de fármaco maleimido-DPR autoestabilizante y un enlazador de fármaco maleimido-caproilo, cuando se incuba en plasma de rata a 37 °C (R=val-cit-PAB-MMAE). Las muestras de CAF en cada punto de tiempo se purificaron mediante resina de afinidad Ig Select y su carga de fármaco se evaluó mediante análisis HPLC en fase inversa de los CAF.
- 50 55 La **figura 9** muestra el perfil de estabilidad de los fármacos conjugados con anticuerpos mediante un enlazador maleimido-caproil (cuadrados) o un enlazador maleimida autoestabilizante (círculos) durante la incubación en plasma de rata (símbolos abiertos) o humano (símbolos rellenos) (R=val-cit-PAB-MMAE). Los CAF se capturaron en resina de afinidad de proteína A en cada punto de tiempo y el fármaco se liberó enzimáticamente a través de su enlazador escindible por proteasa. A continuación, el fármaco liberado se cuantificó mediante LC-MS/MS y se normalizó con respecto al valor inicial. Cada punto de tiempo refleja el porcentaje del fármaco conjugado que se observó en t0.
- 60 65 La **Figura 10** ilustra la disminución de la carga de fármaco *in vivo* (ratas) para el enlazador de fármaco maleimido-DPR autoestabilizante y un enlazador de fármaco maleimido-caproilo (R=val-cit-PAB-MMAE). Los CAF se administraron i.v. y las muestras de plasma de cada punto de tiempo se purificaron mediante resina de afinidad Ig Select y su carga de fármaco se evaluó mediante análisis HPLC en fase inversa de los CAF.
- La **figura 11** ilustra la actividad antitumoral de los CAF en un modelo murino de xenoinjerto de ALCL (línea celular Karpas-299). Se prepararon CAF con el anticuerpo anti-CD30 cAC10 y enlazadores de fármaco que contenían la carga útil citotóxica val-cit-PAB-MMAE unida al anticuerpo mediante un grupo maleimido-caproilo (círculos

cerrados) o un grupo maleimido-DPR autoestabilizante (círculos abiertos). Se dejó que los tumores alcanzaran un volumen aproximado de 250 mm<sup>3</sup> antes de administrar dosis de 1 mg/kg semanal durante tres dosis (seis ratones por grupo de dosis). El grupo de dosis de CAF autoestabilizante experimentó respuestas completas (sin tumor detectable) en los seis animales, experimentando cinco animales regresiones duraderas, mientras que el CAF maleimido-caproilo no experimentó respuestas completas.

#### Descripción detallada

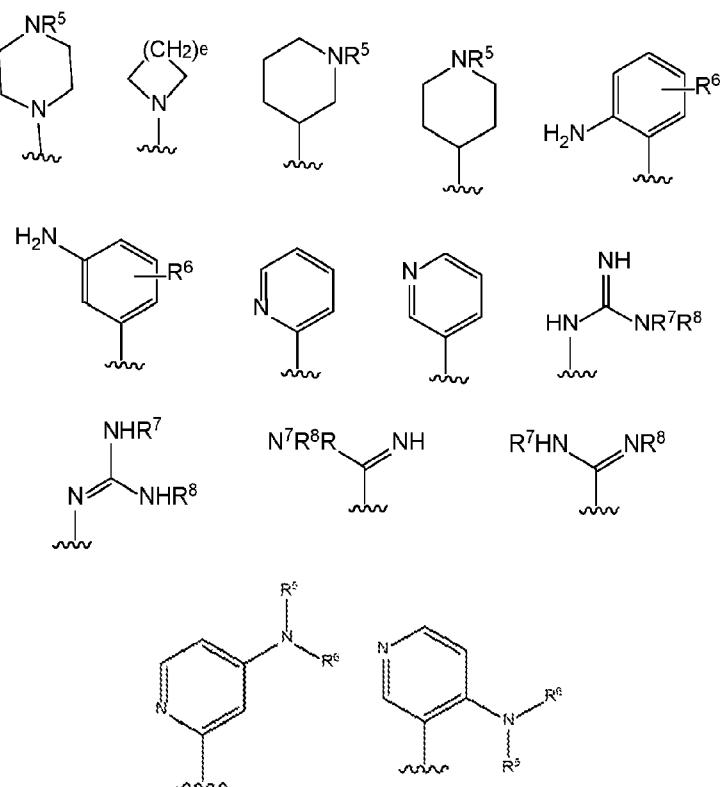
##### Abreviaturas y definiciones

A menos que se indique otra cosa, se pretende que los siguientes términos y expresiones según se usan en el presente documento, tengan los siguientes significados. Cuando en el presente documento se utilizan marcas registradas, el nombre comercial incluye la formulación del producto, el fármaco genérico y el principio o principios farmacéuticos activos del producto del nombre comercial, a menos que el contexto indique otra cosa.

La expresión "grupo aceptor de electrones" se refiere a un grupo funcional que aleja electrones de un centro de reacción. Entre los grupos aceptores de electrones ilustrativos se incluyen, aunque sin limitación, -C(=O), -CN, -NO<sub>2</sub>, -CX<sub>3</sub>, -X, -COOR, -CONR<sub>2</sub>, -COR, -COX, -SO<sub>2</sub>R, -SO<sub>2</sub>OR, -SO<sub>2</sub>NHR, -SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, -PO<sub>3</sub>R<sub>2</sub>, -P(O)(CH<sub>3</sub>)NHR, NO, -NR<sub>3</sub><sup>+</sup>, -CR=CR<sub>2</sub> y -C≡CR en donde X es F, Br, Cl o I y R es, en cada aparición, seleccionado independientemente entre el

grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>. Los grupos aceptores de electrones ilustrativos también pueden incluir grupos arilo (por ejemplo, fenilo) y ciertos grupos heteroarilo (por ejemplo, piridina). La expresión "grupos aceptores de electrones" incluye arilos o heteroarilos sustituidos con grupos aceptores de electrones. Los grupos aceptores de electrones preferidos son -C(=O), -CN, -NO<sub>2</sub>, -CX<sub>3</sub> y -X.

El término "base" se refiere a un grupo funcional que desprotona el agua para producir un ion hidróxido. Las bases ilustrativas son aminas y heterociclos que contienen nitrógeno. Las bases representativas incluyen -N(R<sup>3</sup>)(R<sup>4</sup>) en donde R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se seleccionan independientemente entre H o alquilo C<sub>1-6</sub>, preferentemente H o metilo,



en donde R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup> son, en cada aparición, seleccionados independientemente entre hidrógeno o alquilo C<sub>1-6</sub>, preferentemente H o metilo, y e es 0-4. En algunos aspectos, la base es una base nitrogenada.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y específicamente abarca anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada. Un anticuerpo intacto tiene principalmente dos regiones: una región variable y una región constante. La región variable se une a un antígeno diana e interacciona con él. La región variable incluye una región

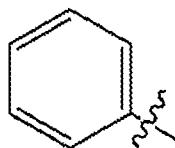
- determinante de la complementariedad (CDR) que reconoce y se une a un sitio de unión específico de un antígeno concreto. El sistema inmunitario puede reconocer e interaccionar con la región constante (véase, por ejemplo, Janeway *et al.*, 2001, Immuno. Biology, 5.<sup>a</sup> ed., Garland Publishing, Nueva York). Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase. El anticuerpo puede proceder de cualquier especie adecuada. En algunas realizaciones, el anticuerpo es de origen humano o murino. Un anticuerpo puede ser, por ejemplo, humano, humanizado o químico.
- La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son sumamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante un método particular.
- Un "anticuerpo intacto" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de la cadena ligera ( $C_l$ ) y dominios constantes de la cadena pesada,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y  $C_{H4}$ , según sea apropiado para la clase de anticuerpo. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencias naturales humanas) o las secuencias variantes de aminoácidos de los mismos.
- Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, que comprende la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario, scFv, scFv-Fc, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo, un fragmento o fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab o fragmentos de unión a epitopos de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno de células cancerosas, un antígeno vírico o un antígeno microbiano).
- Un "antígeno" es una entidad a la que se une específicamente un anticuerpo.
- Las expresiones "unión específica" y "se une específicamente" significan que el anticuerpo o derivado de anticuerpo se unirá, de una manera altamente selectiva, con su correspondiente antígeno diana y no con la multitud de otros antígenos. Normalmente, el anticuerpo o derivado de anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M y, preferentemente, de  $10^{-8}$  M a  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  M o  $10^{-12}$  M y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.
- El término "inhibir" o "inhibición de" significa reducir en una cantidad medible o impedir por completo.
- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en la que el fármaco puede inhibir el crecimiento de las células cancerosas existentes y/o su destrucción, este puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia, por ejemplo, puede medirse evaluando el tiempo de progresión de la enfermedad (TTP) y/o mediante la determinación de la tasa de respuesta (RR).
- El término "sustancial" o "sustancialmente" se refiere a una mayoría, es decir, >50 % de una población, de una mezcla o una muestra, preferentemente más del 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de una población.
- Las expresiones "escindido intracelularmente" y "escisión intracelular" se refieren a un proceso o reacción metabólica en el interior de una célula sobre un conjugado de fármaco-ligando (por ejemplo, un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF) o similar), mediante el cual la unión covalente, por ejemplo, el enlazador, entre la fracción del fármaco (D) y la unidad de ligando (por ejemplo, un anticuerpo (Ab)), da como resultado el fármaco libre, u otro metabolito del conjugado disociado del anticuerpo dentro de la célula. Las moléculas escindidas del conjugado Fármaco-Enlazador-Ligando son, por tanto, metabolitos intracelulares.
- La expresión "actividad citotóxica" se refiere la destrucción de células, un efecto citostático o antiproliferativo de un compuesto conjugado Fármaco-Enlazador-Ligando o un metabolito intracelular de un conjugado Fármaco-Enlazador-Ligando. La actividad citotóxica puede expresarse como el valor de  $IC_{50}$ , que es la concentración (molar o en masa) por unidad de volumen a la que la mitad de las células sobrevive.
- La expresión "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o

- impide la función de las células y/o produce la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya isótopos radiactivos (por ejemplo,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{60}\text{C}$ , e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluidos análogos sintéticos y derivados de los mismos.
- 5 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección o trastorno fisiológico en mamíferos que normalmente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas.
- 10 Una "enfermedad autoinmunitaria" en el presente documento es una enfermedad o trastorno que surge y se dirige contra los propios tejidos o proteínas de un individuo.
- 15 Los ejemplos de un "paciente" incluyen, aunque sin limitación, un ser humano, rata, ratón, cobaya, mono, cerdo, cabra, vaca, caballo, perro, gato, ave y ave de corral. En una realización ilustrativa, el paciente es un ser humano.
- 20 15 Los términos "tratar" o "tratamiento", a no ser que el contexto indique otra cosa, se refieren al tratamiento terapéutico y las medidas profilácticas para prevenir la recidiva, donde el objeto es inhibir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el desarrollo o la proliferación del cáncer. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, aunque sin limitación, el alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (es decir, no empeoramiento) del cuadro patológico, el retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o el alivio de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o trastorno así como aquellos propensos a padecer la afección o trastorno.
- 25 20 En el contexto del cáncer, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todos de entre: inhibición del crecimiento de células tumorales, células cancerosas, o de un tumor; inhibición de la replicación de células tumorales o células cancerosas, disminución de la carga tumoral total o disminución del número de células cancerosas, y mejora de uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad.
- 30 25 En el contexto de una enfermedad autoinmunitaria, el término "tratamiento" incluye cualquiera o todos de entre: inhibición de la replicación de células asociadas con una patología autoinmunitaria incluyendo, sin limitación, células que producen un anticuerpo autoinmunitario, disminución de la carga de anticuerpo autoinmunitario y mejora de uno o más síntomas de una enfermedad autoinmunitaria.
- 35 30 Como se usa en el presente documento, la expresión "unidad de detección" se refiere a cualquier molécula que produce o puede ser inducida a producir, una señal detectable. Las unidades de detección que tienen moléculas indicadoras que pueden detectarse mediante equipos de formación de imágenes incluyen, aunque sin limitación, entidades químicas radioactiva, paramagnéticas, fluorescentes o radiopacas. En algunas realizaciones, la unidad de detección será un compuesto radiactivo, un agente quimioluminiscente, un agente fluorescente o un cromógeno. En algunas realizaciones, la unidad de detección será una molécula fluorescente, tal como un fluoróforo.
- 40 35 Como se usa en el presente documento, la expresión "unidad de estabilidad" se refiere a un compuesto que promueve la estabilidad del conjugado, por ejemplo, aumentando la retención sistémica del Ligando cuando se administra a un paciente. Una unidad de Estabilidad también puede aumentar la solubilidad en agua del conjugado. Una unidad de estabilidad ilustrativa es polietilenglicol.
- 45 40 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto (por ejemplo, un Fármaco, Fármaco-Enlazador o conjugado Ligando-Fármaco). El compuesto puede contener al menos un grupo amino, y, por consiguiente, se pueden formar sales de adición de ácido con el grupo amino. Entre las sales ilustrativas se incluyen, aunque sin limitación, las sales sulfato, trifluoroacetato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato de ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato de ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisínato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, 50 45 metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contrión. El contrión puede ser cualquier fracción orgánica o inorgánica que estabilice la carga del compuesto precursor. Asimismo, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/ uno o más contraiones.
- 55 50 A menos que se indique otra cosa, el término "alquilo" por sí mismo o como parte de otro término se refiere a un carbohidrato de cadena lineal o ramificada, sustituida o no sustituida, saturada o insaturada que tiene el número indicado de átomos de carbono (por ejemplo, "-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" o "-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>" se refieren a un grupo alquilo que tiene de 1 a 8 o de 1 a 10 átomos de carbono, respectivamente). Cuando el número de átomos de carbono no está
- 65 55 60 65

indicado, el grupo alquilo utilizado tiene de 1 a 8 átomos de carbono. Los grupos "-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>" de cadena lineal representativos incluyen, aunque sin limitación, -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo, -n-pentilo, -n-hexilo, -n-heptilo y -n-octilo; mientras que los -alquilos C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> ramificados incluyen, aunque sin limitación, -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo y -2-metilbutilo; alquilos C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> insaturados incluyen, aunque sin limitación, -vinilo, -alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, -2,3-dimetil-2-butenilo, -1-hexilo, 2-hexilo, -3-hexilo, -acetilenilo, -propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo y -3-metil-1-butinilo. En algunas realizaciones, un grupo alquilo está sin sustituir. Un grupo alquilo puede estar sustituido por uno o más grupos. En algunos aspectos, un grupo alquilo estará saturado.

- 5 10 A menos que se indique otra cosa, "alquieno", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un radical hidrocarbono de cadena lineal o ramificado o cíclico, saturado sustituido o no sustituido del número indicado de átomos de carbono, normalmente 1-10 átomos de carbono, y que tiene dos centros radicales monovalentes obtenidos por la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono distintos de un alcano precursor. Los radicales de alquieno típicos incluyen, pero sin limitación: metileno (-CH<sub>2</sub>•), 1,2-etilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>•), 1,3-propilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>•), 1,4-butilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>•) y similares. En aspectos preferidos, un alquieno es un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada (es decir, no es un hidrocarburo cíclico).

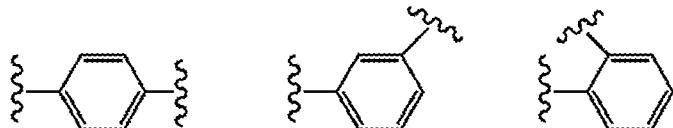
20 15 A menos que se indique otra cosa, "arilo", por sí mismo o como parte de otro término, significa un radical hidrocarbono aromático carbocíclico monovalente, sustituido o no sustituido, de 6-20 átomos de carbono derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono individual de un sistema de anillo aromático precursor. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras ilustrativas como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen, aunque sin limitación, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares. Un grupo arilo ilustrativo es un grupo fenilo del siguiente modo:



25

A menos que se indique otra cosa, un "arileno" por sí mismo o como parte de otro término, es un grupo arilo como se ha definido anteriormente que tiene dos enlaces covalentes (es decir, es divalente) y puede estar en las configuraciones orto, meta o para como se muestra en las siguientes estructuras, con fenilo como grupo ilustrativo:

30



35 40 A menos que se indique otra cosa, un "heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un sistema de anillo monovalente, monocíclico o bicíclico, aromático o no aromático, sustituido o sin sustituir, que tiene de 3 a 8 átomos de carbono (también denominados miembros de anillo) y de uno a cuatro miembros de anillo heteroátomo seleccionados independientemente de N, O, P o S, y obtenido por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo del anillo de un sistema de anillos precursor. Uno o más átomos de N, C o S del heterociclo pueden oxidarse. El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. A menos que se indique lo contrario, el heterociclo está anido a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono, lo que da como resultado una estructura estable. Los ejemplos representativos de un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> incluyen, aunque sin limitación, pirrolidinilo, azetidinilo, piperidinilo, morfolinilo, tetrahidropiranilo, benzofuranilo, benzotifeno, indolilo, benzopirazolilo, pirrolilo, tiofenilo (tiofeno), furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, pirimidinilo, piridinilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo e isoxazolilo. Un "heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>" es un heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> aromático.

45 50 A menos que se indique otra cosa, "heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un grupo heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> definido anteriormente donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo heterociclo está sustituido por un enlace (es decir, es divalente). Un "heteroarileno C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un grupo heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> definido anteriormente en donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo heteroarilo está sustituido por un enlace (es decir, es divalente).

55 A menos que se indique otra cosa, un "carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", por sí mismo o como parte de otro término, es un anillo carbocíclico, bicíclico o monocíclico no aromático, saturado o insaturado, monovalente de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de anillo de un sistema de anillos precursor. Los -carbociclos C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> representativos incluyen, aunque sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentadienilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 1,3-ciclohexadienilo, 1,4-ciclohexadienilo, cicloheptilo, 1,3-cicloheptadienilo, 1,3,5-cicloheptatrienilo, ciclooctilo y ciclooctadienilo.

A menos que se indique otra cosa, un "carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>", por sí mismo o como parte de otro término, se refiere a un grupo carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> definido anteriormente donde otro de los átomos de hidrógeno de los grupos carbociclo está sustituido por un enlace (es decir, es divalente).

- 5 A menos que se indique otra cosa, el término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, salvo que se especifique lo contrario, un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada estable, o combinaciones de las mismas, completamente saturado o que contiene de 1 a 3 grados de insaturación, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y de uno a diez, preferentemente de uno a tres, heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre opcionalmente pueden oxidarse y el heteroátomo de nitrógeno opcionalmente puede cuaternizarse. El heteroátomo o heteroátomos O, N y S se pueden colocar en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. El heteroátomo Si se puede colocar en cualquier posición del grupo heteroalquilo, incluyendo la posición en la que el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)-CH<sub>3</sub>, -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, -CH=CH-O-CH<sub>3</sub>, -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-CH=N-O-CH<sub>3</sub> y -CH=CH-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-NH-OCH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. En realizaciones preferidas, un heteroalquilo o heteroalquileno de C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> tiene de 1 a 4 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos y un C<sub>1</sub> a C<sub>3</sub> heteroalquilo o heteroalquileno tiene de 1 a 3 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos. En algunos aspectos, un heteroalquilo o heteroalquileno está saturado.
- 10 20 A menos que se indique otra cosa, el término "heteroalquileno" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un grupo divalente procedente de heteroalquilo (como se discute anteriormente), como se ilustra en -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-.
- 15 25 Para los grupos heteroalquileno, los heteroátomos también pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos de la cadena. Aún además, para los grupos de enlace alquieno y heteroalquieno, no está implícita la orientación del grupo de enlace.

"Alquilo sustituido" y "arilo sustituido" significan alquilo y arilo, respectivamente, en que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos, cada uno independientemente, por un sustituyente. Los sustituyentes típicos incluyen, aunque sin limitación, -X, -R, -O<sup>-</sup>, -OR, -SR, -S<sup>-</sup>, -NR<sub>2</sub>, -NR<sub>3</sub>, =NR, -CX<sub>3</sub>, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO<sub>2</sub>, =N<sub>2</sub>, -N<sub>3</sub>, -NRC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -S(=O)<sub>2</sub>R, -OS(=O)<sub>2</sub>OR, -S(=O)<sub>2</sub>NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)<sub>2</sub>, -P(=O)(OR)<sub>2</sub>, -PO<sup>-</sup><sub>3</sub>, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -AsO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(S)R, -CO<sub>2</sub>R, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C(=S)SR, -C(=O)NR<sub>2</sub>, -C(=S)NR<sub>2</sub> o -C(=NR)NR<sub>2</sub>, en donde cada X es independientemente un halógeno: -F, -Cl, -Br, o -I; y cada R es independientemente -H, -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, -arilo C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>, un grupo protector o una fracción de profármaco. Los grupos alquieno, carbociclo, carbociclo, arileno, heteroalquilo, heteroalquieno, heterociclo, heterociclo, heteroarilo y heteroarileno tal como se han descrito anteriormente también se pueden sustituir de forma similar.

GR es un grupo reactivo que contiene un sitio reactivo (SR) capaz de formar un enlace con cualquiera de los componentes de la unidad Enlazadora (es decir, A, W, Y) o la unidad de Fármaco D. SR es el sitio reactivo dentro de un Grupo Reactivo (GR). Los grupos reactivos incluyen grupos sulfhidrilo para formar enlaces disulfuro o enlaces tioéter, aldehído, cetona o grupos hidrazina para formar enlaces hidrazone, grupos carboxílicos o amino para formar enlaces peptídicos, grupos carboxílicos o hidroxilos para formar enlaces éster, ácidos sulfónicos para formar enlaces sulfonamida, alcoholes para formar enlaces carbamato y aminas para formar enlaces sulfonamida o enlaces carbamato. La siguiente tabla es ilustrativa de los Grupos Reactivos, Sitios Reactivos, y grupos funcionales ilustrativos que pueden formarse tras la reacción del sitio reactivo. La tabla no es limitante. Un experto en la materia apreciará que las porciones R' y R'' indicadas en la tabla son efectivamente cualquier fracción orgánica (por ejemplo, un grupo alquilo, grupo arilo, grupo heteroarilo o alquilo sustituido, grupo arilo o heteroarilo) que sea compatible con la formación de enlaces proporcionada al convertir el GR en uno de los Grupos Funcionales Ilustrativos. También se apreciará que, como se aplica a las realizaciones de la presente invención, R' puede representar uno o más componentes del enlazador autoestabilizante o del enlazador secundario opcional, según el caso, y R'' puede representar uno o más componentes del enlazador secundario opcional, Unidad de Fármaco, Unidad de Estabilidad o Unidad de Detección, según sea el caso.

GR	SR	Grupos Funcionales Ilustrativos
1) R'-SH	-S-	R'-S-R'' R'-S-S-R''
2) R'-C(=O)OH	-C(=O)-	R'-C(=O)NH-R''
3) R'-C(=O)ONHS	-C(=O)-	R'-C(=O)NH-R''
4) R'S(=O) <sub>2</sub> -OH	-S(=O) <sub>2</sub> -	R'S(=O) <sub>2</sub> NH-R''
5) R'-CH <sub>2</sub> -X (X es Br, I, Cl)	-CH <sub>2</sub> -	R'-CH <sub>2</sub> -S-R''
6) R'-NH <sub>2</sub>	-N-	R'-NHC(=O)R''

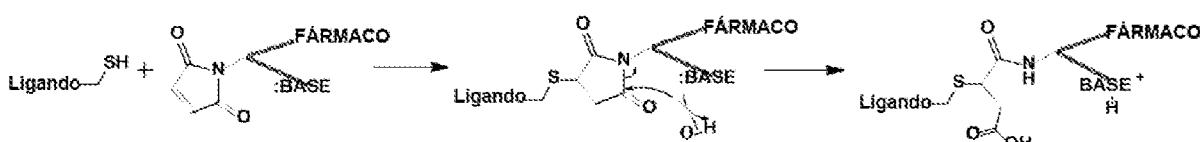
- 55 55 Se entenderá que, una vez que ha reaccionado, el sitio reactivo SR puede formar un nuevo enlace con componentes

de la Unidad Enlazadora o de la unidad de Fármaco, según sea el caso. El sitio reactivo, SR, una vez unido al resto de la unidad de Enlazador normalmente ha perdido su reactividad.

5 El término "dilactama", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una amida cíclica que se forma a partir de una reacción de macrociclicación con una succinimida tio-sustituida y una base presente en el conjunto enlazador autoestabilizante.

#### General

- 10 La hidrólisis de una maleimida (o succinimida tio-sustituida) representa una reacción de adición nucleofílica en la que el agua, actuando como nucleófilo, ataca a uno de los átomos de carbono carbonílico electrofílico del anillo de maleimida (o del anillo de succinimida). La velocidad de esta reacción está influenciada por la electrofilia de los carbonilos, que puede variar con la sustitución de los grupos donadores o aceptores de electrones presentes en el nitrógeno del grupo imida. La velocidad de la reacción de hidrólisis también se ve influenciada por el pH de un disolvente acuoso, que aumenta efectivamente la nucleofilia del agua con el aumento del pH. Los presentes inventores han descubierto que la colocación de un grupo básico en una maleimida N-sustituida también aumenta la velocidad de la hidrólisis. Mediante una cuidadosa ingeniería de un grupo N-sustituyente en la maleimida, la combinación de su influencia de aceptor de electrones sobre el anillo de maleimida (aumentando así su electrofilia) y la basicidad localizada (aumentando la nucleofilia efectiva del agua cercana) puede utilizarse para ajustar la velocidad de hidrólisis de la maleimida original o de su derivado succinimida tio-sustituido. La presente invención proporciona, entre otras cosas, maleimidas N-sustituidas con velocidades de hidrólisis que caen dentro de un intervalo útil en el que su reacción con tióles ocurre más rápidamente que su hidrólisis al derivado del ácido maleico, pero que producen succinimidas tio-sustituidas con velocidades de hidrólisis suficientemente rápidas para lograr una hidrólisis completa en condiciones suaves muy adecuadas para la fabricación de bioconjugados basados en proteínas.
- 15 25 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que un grupo funcional básico proximal a una maleimida catalizará la hidrólisis de una succinimida tio-sustituida que se forma tras la conjugación de la maleimida y un tiol proteico dando lugar a un bioconjugado estable. Combinando además un grupo básico proximal con un grupo aceptor de electrones, la velocidad de hidrólisis del anillo de succinimida tio-sustituido puede ajustarse a un nivel deseable. Los parámetros de diseño que afectan a la velocidad de hidrólisis incluyen el pKa del grupo básico, la fuerza del grupo aceptor de electrones, cuando está presente, y la proximidad de ambos grupos a los carbonilos de la maleimida. Los parámetros de diseño que afectan al porcentaje de hidrólisis incluyen la naturaleza y la proximidad de la base a los carbonilos de la maleimida.
- 30 35 Conceptualmente, sin limitar la invención, una unidad Enlazadora que comprende un conjunto enlazador autoestabilizante se denomina en el presente documento Enlazador Autoestabilizante o Unidad Enlazadora Autoestabilizante. El Enlazador Autoestabilizante antes de la conjugación con la unidad de Ligando comprende un grupo maleimida. El Enlazador Autoestabilizante es autoestabilizante en virtud de la proximidad del grupo maleimida a una base dentro de la Unidad Enlazadora que cataliza la hidrólisis de su propia succinimida tio-sustituida tras la conjugación con la Unidad de Ligando. Esto se representa esquemáticamente a continuación:
- 40 45



Se entenderá que el término Enlazador Autoestabilizante se refiere a la Unidad Enlazadora tanto antes como después de la estabilización.

- 50 En vista de lo anterior, la presente invención, tal como se define en el objeto de las reivindicaciones, proporciona un grupo de realizaciones, un Conjunto de Ligando-Agente Funcional que comprende una Unidad de Ligando y al menos un Agente Funcional seleccionado entre una Unidad de Fármaco, una Unidad de Detección o una Unidad Estabilizante, en donde la unidad de Ligando y cada uno del o los Agentes Funcionales están unidos por un conjunto enlazador autoestabilizante que comprende un anillo de succinimida o un anillo de succinimida hidrolizado conjugado directamente con la unidad de Ligando mediante un enlace tioéter; y una base y un grupo aceptor de electrones (conjugados a la Unidad de Ligando a través de la succinimida) unidos de forma operable para estabilizar el conjugado en plasma en relación con un conjugado de ligando-fármaco que carece del conjunto enlazador autoestabilizante (es decir, aumentando la velocidad de hidrólisis del anillo de succinimida). En algunos aspectos, el grupo aceptor de electrones se coloca para aumentar la electrofilia de la succinimida, haciéndola más reactiva con el agua, y la base se coloca para ayudar a la hidrólisis del anillo de succinimida (por ejemplo, mediante un mecanismo de catálisis intramolecular de la base). En algunos aspectos, en lugar del anillo de succinimida es una dilactama formada cuando la base reacciona con el anillo de succinimida. En otro grupo de realizaciones, se proporcionan unidades de Enlazador-Agente Funcional en las que la porción enlazadora comprende un conjunto de enlazador autoestabilizante. En otro grupo de realizaciones, se proporcionan conjugados de Ligando-Enlazador, en donde la porción enlazadora
- 55 60

comprende un conjunto de enlazador autoestabilizante. En algunas realizaciones, la porción enlazadora comprende además un conjunto de enlazador secundario opcional ( $L^O$ ).

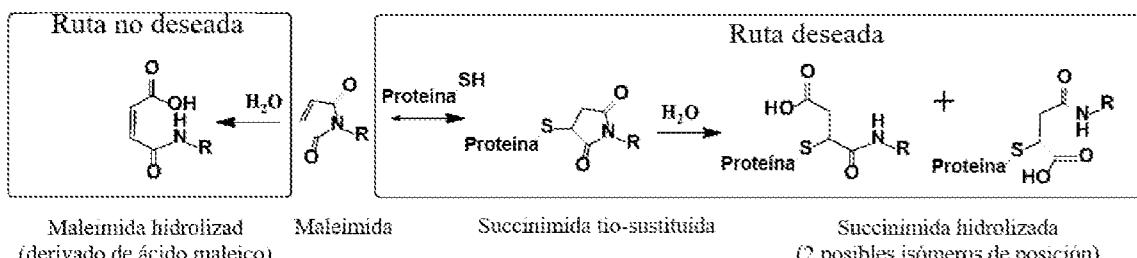
En algunos aspectos, el conjugado de Ligando-Agente Funcional es un conjugado de Ligando-Fármaco. Por consiguiente, la presente invención, tal como se define en el objeto de las reivindicaciones, proporciona un grupo de realizaciones, un Conjugado de Ligando-Fármaco que comprende una unidad de Ligando y al menos una unidad de Fármaco, en donde la unidad de Ligando y cada una de la o las unidades de Fármaco están unidas por un conjunto enlazador autoestabilizante que comprende un anillo de succinimida o un anillo de succinimida hidrolizado conjugado directamente con la unidad de Ligando mediante un enlace tioéter; y una base y un grupo acceptor de electrones (conjugados a la Unidad de Ligando a través del anillo de succinimida) unidos de forma operable para estabilizar el conjugado en plasma en relación con un conjugado de ligando-fármaco que carece del conjunto enlazador autoestabilizante (es decir, aumentando la velocidad de hidrólisis del anillo de succinimida). En algunos aspectos, el grupo acceptor de electrones se coloca para aumentar la electrofilia de la succinimida, haciéndola más reactiva con el agua, y la base se coloca para ayudar a la hidrólisis del anillo de succinimida (por ejemplo, mediante un mecanismo de catálisis intramolecular de la base). En algunos aspectos, en lugar del anillo de succinimida es una dilactama formada cuando la base reacciona con el anillo de succinimida. En otro grupo de realizaciones, se proporcionan unidades de Fármaco-Enlazador en las que la porción enlazadora comprende un conjunto de enlazador autoestabilizante. En otro grupo de realizaciones, se proporcionan conjugados de Ligando-Enlazador, en donde la porción enlazadora comprende un conjunto de enlazador autoestabilizante. En algunas realizaciones, la porción enlazadora comprende además un conjunto de enlazador secundario opcional ( $L^O$ ). En algunas realizaciones, el conjunto enlazador secundario es un conjunto enlazador liberable ( $L^R$ ) que comprende una unidad escindible y, opcionalmente, una o más de una unidades de Tramo y una unidad Espaciadora. En algunas realizaciones diferentes, el conjunto enlazador secundario es un conjunto enlazador no liberable ( $L^N$ ) que comprende una o más de una unidad de Extensión y una unidad Espaciadora. En otras realizaciones más, la invención proporciona métodos para tratar cáncer, enfermedades inmunitarias, enfermedades infecciosas y otras enfermedades y trastornos utilizando un conjugado Ligando-Fármaco que comprende un conjunto enlazador autoestabilizante.

La unidad de Enlazador del conjugado Ligando-Agente Funcional (o conjugado Ligando-Fármaco) puede comprender adicionalmente, además de un conjunto enlazador autoestabilizante, un conjunto enlazador secundario opcional ( $L^O$ ) que une cada Agente Funcional (o unidad de Fármaco) al conjunto enlazador autoestabilizante. El conjunto enlazador secundario puede ser un conjunto enlazador liberable o un conjunto enlazador no liberable.

El término unidad Enlazadora puede utilizarse en el presente documento para referirse a la porción enlazadora del conjugado de Ligando-Agente funcional (o conjugado de Ligando-Fármaco) que comprende el conjunto enlazador autoestabilizante y el conjunto enlazador secundario opcional.

#### El conjunto enlazador autoestabilizante

Los Enlazadores Autoestabilizantes están diseñados de forma que la velocidad de la hidrólisis posconjugación del anillo de succinimida sea controlable y se sitúe dentro de un intervalo deseado. Los límites de este intervalo suelen venir dictados por los problemas que surgen en la fabricación de conjugados ligando-fármaco. Por un lado, una hidrólisis demasiado lenta requeriría retracos inaceptables en el proceso de fabricación o condiciones agresivas de pH y temperatura que podrían inducir daños en la cadena principal de la proteína. Por el contrario, una maleimida demasiado reactiva con el agua puede hidrolizarse al derivado del ácido maleico correspondiente antes de que pueda reaccionar con los tióles proteicos disponibles (véase la ruta no deseada):



Estos derivados de ácido maleico no son reactivos con los tióles y, por lo tanto, esta ruta de reacción no da lugar a un bioconjungado. Por lo tanto, las maleimidas que sufren una hidrólisis más rápida que la adición de tióles en las condiciones aplicables no son reactivos útiles. En general, las características estructurales que aumentan la velocidad de hidrólisis de una succinimida tio-sustituida también aumentarán la velocidad de hidrólisis de la maleimida madre.

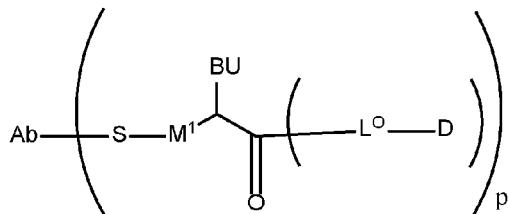
En el diseño de los Enlazadores Autoestabilizantes de la presente invención, se entenderá que el pKa del grupo básico, la fuerza del grupo o grupos aceptores de electrones y la proximidad de ambos grupos a la maleimida son variables interrelacionadas que afectarán a la velocidad de hidrólisis tanto de la maleimida como del correspondiente producto

de succinimida tio-sustituida. Por consiguiente, la posición del grupo aceptor de electrones y de la base dependerá del pKa de la base y de la fuerza del grupo o grupos aceptores de electrones. El experto en la materia entenderá que para grupos aceptores de electrones particularmente fuertes, tales como flúor, trifluorometilo y nitrógeno, el grupo puede estar más alejado de la maleimida.

5 En algunas realizaciones, la reacción de hidrólisis puede competir con una reacción de macrocicлизación de forma que los conjugados resultantes comprenden una mezcla heterogénea de conjugados de succinimida tio-sustituida hidrolizada y conjugados de dilactama tio-sustituida ciclada. En realizaciones preferidas, no se formará una dilactama.

#### Algunas realizaciones de la invención

10 En realizaciones seleccionadas, los conjugados Ligando-Fármaco tienen la fórmula:



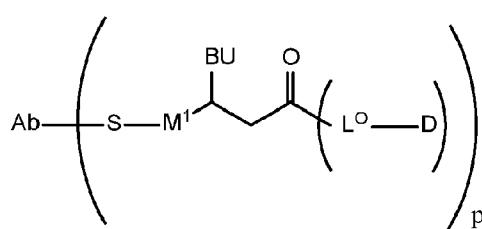
15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la porción de Ligando es un anticuerpo (Ab), el subíndice p oscila entre 1 y 20 (preferentemente entre 1 y 12), y M¹ es un anillo de succinimida o una succinimida hidrolizada o junto con UB forma una dilactama resultante de la reacción de la base de UB con el anillo de succinimida y D es una unidad de Fármaco. Cuando S es un átomo de azufre del anticuerpo. En algunos aspectos, L° es un conjunto enlazador liberable que tiene la fórmula:



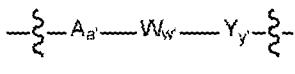
25 en donde -A- es una unidad de Extensión opcional, el subíndice a' es 0 o 1; -W- es una unidad Escindible opcional, el subíndice w' es 0 o 1; e -Y- es una unidad de Espaciador opcional y el subíndice y' es 0 o 1; y las líneas onduladas indican los puntos de unión al conjunto enlazador autoestabilizante y a la unidad de Fármaco. UB es -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NHR<sup>a</sup> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NR<sup>a</sup><sub>2</sub>, en donde x es un número entero de 1-4 y cada R<sup>a</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1-6</sub> y haloalquilo C<sub>1-6</sub> o dos grupos R<sup>a</sup> se combinan con el nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidinilo, pirrolidinilo o piperidinilo, siempre que no haya menos de 2 átomos intermedios entre la base de la unidad Básica y el átomo de nitrógeno de la succinimida (hidrolizada o no) o dilactama. En otros aspectos

30 más, L° es un conjunto enlazador liberable y UB es -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>. En algunos aspectos, el Ab puede ser sustituido por una proteína no anticuerpo. M¹ es preferentemente un anillo de succinimida o un anillo de succinimida hidrolizado.

35 En otras realizaciones seleccionadas, los conjugados Ligando-Fármaco tienen la fórmula:



40 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde la porción Ligando es un anticuerpo (Ab) y el subíndice p oscila entre 1 y 20 (preferentemente entre 1 y 12) y M¹, UB y L° son como se describen en cualquiera de las realizaciones proporcionadas en el presente documento y D es una unidad de Fármaco. Cuando S es un átomo de azufre del anticuerpo. M¹ es un anillo de succinimida o succinimida hidrolizada o junto con UB forma una dilactama resultante de la reacción de la base de UB con el anillo de succinimida. Por ejemplo, en algunos aspectos, L° es un conjunto enlazador liberable que tiene la fórmula:

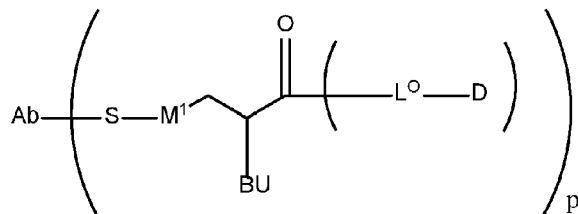


en donde -A- es una unidad de Extensión opcional, el subíndice a' es 0 o 1; -W- es una unidad Escindible opcional, el subíndice w' es 0 o 1; e -Y- es una unidad de Espaciador opcional y el subíndice y' es 0 o 1; y las líneas onduladas indican los puntos de unión al conjunto enlazador autoestabilizante y a la unidad de Fármaco. UB es -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NH<sub>2</sub>,

- (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NHR<sup>a</sup> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NR<sup>a</sup><sub>2</sub>, en donde x es un número entero de 1-4 y cada R<sup>a</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1-6</sub> y haloalquilo C<sub>1-6</sub> o dos grupos R<sup>a</sup> se combinan con el nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidinilo, pirrolidinilo o piperidinilo, siempre que no haya menos de 2 átomos intermedios entre la base de la unidad Básica y el átomo de nitrógeno de la succinimida (hidrolizada o no) o dilactama. En otros aspectos más, L<sup>o</sup> es un conjunto enlazador liberable y UB es -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>. En algunos aspectos, el Ab puede ser sustituido por una proteína no anticuerpo. M<sup>1</sup> es preferentemente un anillo de succinimida o un anillo de succinimida hidrolizado.

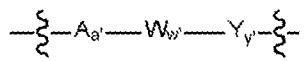
En otras realizaciones seleccionadas, los conjugados Ligando-Fármaco tienen la fórmula:

10



- o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en donde la porción Ligando es un anticuerpo (Ab), el subíndice p oscila entre 1 y 20 (preferentemente entre 1 y 12) y M<sup>1</sup>, UB y L<sup>o</sup> son como se describen en cualquiera de las 15 realizaciones proporcionadas en el presente documento y D es una unidad de Fármaco. Cuando S es un átomo de azufre del anticuerpo. M<sup>1</sup> es un anillo de succinimida o succinimida hidrolizada o junto con UB forma una dilactama resultante de la reacción de la base de UB con el anillo de succinimida. Por ejemplo, en algunos aspectos, L<sup>o</sup> es un conjunto enlazador liberable, que tiene la fórmula:

20

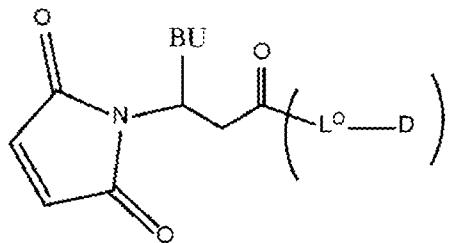


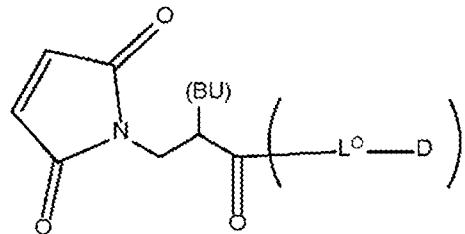
- en donde -A- es una unidad de Extensión opcional, el subíndice a' es 0 o 1; - W- es una unidad Escindible opcional, el subíndice w' es 0 o 1; e -Y- es una unidad de Espaciador opcional y el subíndice y' es 0 o 1; y las líneas onduladas indican los puntos de unión al conjunto enlazador autoestabilizante y a la unidad de Fármaco. UB es -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NHR<sup>a</sup> y -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>NR<sup>a</sup><sub>2</sub>, en donde x es un número entero de 0-4 y cada R<sup>a</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1-6</sub> y haloalquilo C<sub>1-6</sub> o dos grupos R<sup>a</sup> se combinan con el nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidinilo, pirrolidinilo o piperidinilo, siempre que no haya menos de 2 átomos intermedios entre la base de la unidad Básica y el átomo de nitrógeno de la succinimida (hidrolizada o no) o dilactama. En otros aspectos más, L<sup>o</sup> es un conjunto enlazador liberable y UB es -NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>. En algunos aspectos, el Ab puede ser sustituido por una proteína no anticuerpo. M<sup>1</sup> es preferentemente un anillo de succinimida o un anillo de succinimida hidrolizado.

Habiendo descrito diversos conjugados Ligando-Agente Funcional y conjugados Ligando-Fármaco proporcionados por la presente divulgación, un experto en la materia apreciará que los conjuntos de componentes también son útiles. 35 Por consiguiente, la presente invención proporciona Conjugados Agente Funcional-Enlazador (por ejemplo, Conjugados Fármaco-Enlazador), Enlazadores y conjuntos Ligando-Enlazador.

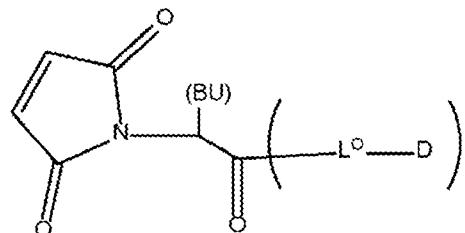
### Conjugados Agente Funcional-Enlazador

- 40 En ciertas realizaciones seleccionadas, el Conjugado Agente Funcional-Enlazador está representado por la fórmula:



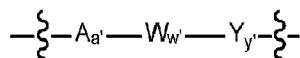


o



o una sal del mismo, en donde UB y  $L^O$  tienen los significados que se indican en el presente documento y D es una unidad de Fármaco. Además, cada una de las realizaciones seleccionadas específicamente citadas para UB y  $L^O$  (para cualquiera de los conjugados proporcionados en el presente documento) son igualmente aplicables a estos Conjugados Fármaco-Enlazador. UB es una Unidad Básica seleccionada entre el grupo que consiste en  $-(CH_2)_xNH_2$ ,  $-(CH_2)_xNHR^a$  y  $-(CH_2)_xNR^{a_2}$ , en donde x es un número entero de 0-4 y cada  $R^a$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo  $C_{1-6}$  y haloalquilo  $C_{1-6}$  o dos grupos  $R^a$  se combinan con el nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidinilo, pirrolidinilo o piperidinilo, siempre que no haya menos de 2 átomos intermedios entre la base de la unidad Básica y el átomo de nitrógeno de la maleimida.  $L^O$  es un conjunto enlazador secundario opcional que tiene la fórmula:

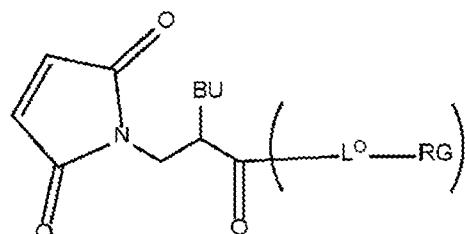
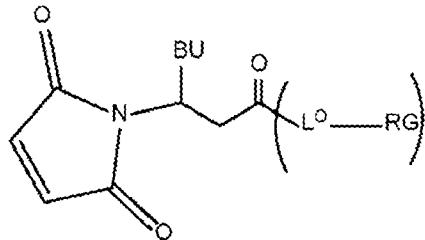
10



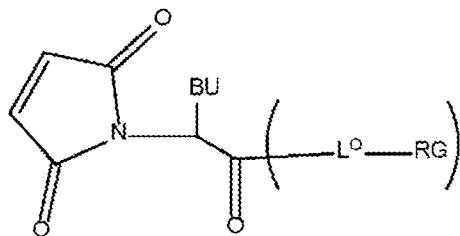
15 en donde -A- es una unidad de Extensión opcional, el subíndice  $a'$  es 0 o 1; -W- es una unidad Escindible opcional, el subíndice  $w'$  es 0 o 1; e -Y- es una unidad de Espaciador opcional y el subíndice  $y'$  es 0 o 1; y las líneas onduladas indican los puntos de unión al conjunto enlazador autoestabilizante y a la unidad de Fármaco.

### Enlazadores

20 También se divultan en el presente documento Enlazadores que tienen la fórmula:



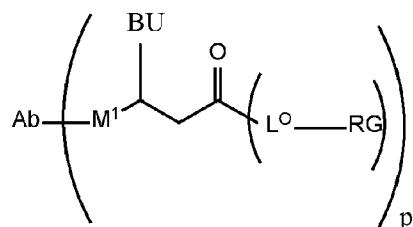
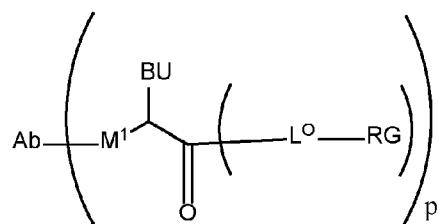
o



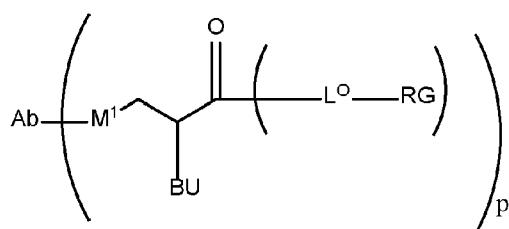
o una sal de la misma (por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable) en donde UB y L<sup>o</sup> tienen los significados indicados anteriormente. GR es un grupo reactivo (que comprende un sitio reactivo) en el extremo de L<sup>o</sup>, adecuado para acoplar una unidad de Fármaco. Además, cada una de las realizaciones seleccionadas citadas específicamente para UB, L<sup>o</sup> y GR (para cualquiera de los conjugados proporcionados en el presente documento) son igualmente aplicables a estos Enlazadores.

#### Conjugados Ligando-Enlazador

También se divultan en el presente documento conjugados Ligando-Enlazador, representado por la fórmula:

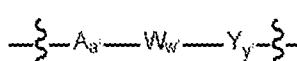


o



o una sal de la misma (por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable), en donde L es un anticuerpo (Ab), y M<sup>1</sup>, UB, L<sup>o</sup> y GR tienen el significado indicado anteriormente. Además, cada una de las realizaciones seleccionadas citadas específicamente para Ab, M<sup>1</sup>, UB, L<sup>o</sup> y GR (para cualquiera de los conjugados proporcionados en el presente documento) son igualmente aplicables a estos conjugados Ligando-Enlazador.

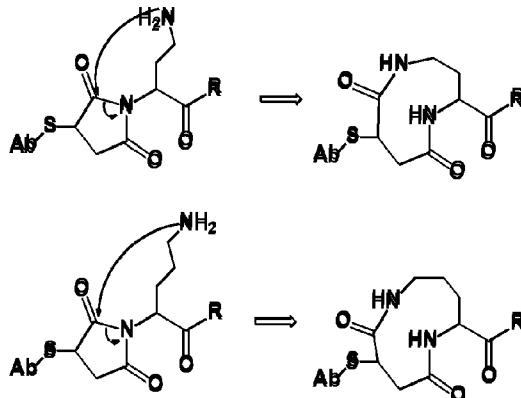
En cada una de las realizaciones seleccionadas en donde los conjugados Ligando-Fármaco, Fármaco-Enlazadores, Enlazadores o Ligando-Enlazador o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, el conjunto enlazador secundario opcional puede representarse mediante la siguiente fórmula:



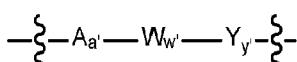
en donde -A- es una unidad de Extensión opcional, el subíndice a' es 0 o 1 -W- es una unidad Escindible opcional, el subíndice w' es 0 o 1; e -Y- es una unidad de Espaciador opcional y el subíndice y' es 0 o 1.

**Realizaciones adicionales de la invención**

En algunos aspectos de la presente invención, un conjunto enlazador autoestabilizante puede sufrir macrociclación para formar una dilactama como sigue, en donde R representa el resto del conjugado:

**Conjunto Enlazador Secundario**

10 El enlazador secundario opcional puede comprender diversos grupos enlazadores. En cada una de las realizaciones proporcionadas en el presente documento, incluidas las realizaciones citadas específicamente,  $L^O$  puede estar presente y tener la fórmula:



15 en donde

- A- una unidad ensanchadora opcional, el subíndice  $a'$  es 0 o 1;
- 20 -W- es una unidad Escindible opcional, el subíndice  $w'$  es 0 o 1; y
- Y- es una unidad de Espaciador opcional y el subíndice  $y'$  es 0 o 1;

El conjunto enlazador secundario opcional puede ser un conjunto enlazador liberable,  $L^R$ . En esas realizaciones, w es 1. En algunos aspectos diferentes, el conjunto enlazador secundario opcional es un conjunto enlazador no liberable. 25 En esas realizaciones w es 0 y la liberación del fármaco se produce por una vía de degradación proteica total (es decir, ruta no escindible).

**La Unidad de Ligando**

30 En algunas realizaciones de la invención, está presente una Unidad de Ligando. La unidad de Ligando ( $L^-$ ) es un agente diana que se une específicamente a una fracción diana. El ligando puede unirse específicamente a un componente celular (un agente de unión celular) o a otras moléculas diana de interés. En algunos aspectos, la unidad de Ligando actúa administrando la unidad de Fármaco a la población de células diana concreta con la cual la unidad de Ligando interacciona. Los ligandos incluyen, aunque sin limitación, proteínas, polipéptidos y péptidos. Las unidades de Ligando adecuadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa y fragmentos 35 de unión a antígeno de los mismos, interferones, linfocinas, hormonas, factores de crecimiento y factores estimulantes de colonias, vitaminas, moléculas transportadoras de nutrientes (tales como, aunque no de forma limitativa, transferrina) o cualquier otra molécula o sustancia de unión a célula. En algunos aspectos, el ligando es un agente dirigido a proteínas no anticuerpos. En algunos aspectos, se proporciona un Ligando-Agente Funcional en donde  $D'$  40 es una Unidad de Detección o Unidad de Estabilidad y la unidad de Ligando es una proteína (por ejemplo, una proteína no anticuerpo).

En algunos aspectos, una unidad de Ligando forma un enlace con la maleimida de la Unidad Básica Autoestabilizante a través de un grupo sulfhidrilo del Ligando para formar una succinimida tio-sustituida. El grupo sulfhidrilo puede estar 45 presente en el Ligando en el estado natural del Ligando, por ejemplo un resto de origen natural o puede introducirse en el Ligando mediante modificación química.

En el caso de los bioconjungados, se ha observado que el lugar de conjugación del fármaco puede afectar a una serie 50 de parámetros, entre ellos la facilidad de conjugación, la estabilidad del fármaco-enlazador, los efectos sobre las propiedades biofísicas de los bioconjungados resultantes y la citotoxicidad *in vitro*. Con respecto a la estabilidad del fármaco-enlazador, el lugar de conjugación de un fármaco-enlazador con un ligando puede afectar a la capacidad del fármaco-enlazador conjugado para sufrir una reacción de eliminación y para que el fármaco-enlazador se transfiera desde el ligando de un bioconjungado a un tiol reactivo alternativo presente en el medio del bioconjungado, tales como,

- por ejemplo, un tiol reactivo en albúmina, cisteína libre, o glutatión cuando está en plasma. El uso de los Enlazadores Autoestabilizantes de la presente invención es particularmente beneficioso cuando se conjugan con restos de tiol en sitios que son susceptibles a la reacción de eliminación y posterior transferencia del fármaco-enlazador si se utilizan maleimidas de alquilo no autoestabilizantes (por ejemplo, enlazador-fármaco de maleimido-caproilo). Tales sitios incluyen, por ejemplo, los disulfuros intercatenarios, así como sitios seleccionados de ingeniería de cisteína. El uso de los Enlazadores Autoestabilizantes de la presente invención proporciona un enlace estable y la capacidad de unir múltiples fármacos a cada unidad de Ligando.
- En un aspecto, la unidad de Ligando tiene uno o más restos lisina que pueden estar modificados químicamente para introducir uno o más grupos sulfhidrilo. Los reactivos que se pueden usar para modificar las lisinas incluyen, aunque sin limitación, S-acetiltioacetato de N-succinimidilo (SATA) y clorhidrato de 2-iminotiolano (reactivo de Traut).
- En otra realización, la unidad de Ligando puede tener uno o más grupos de hidratos de carbono que pueden estar modificados químicamente para tener uno o más grupos sulfhidrilo.
- En otra realización, el Ligando es un anticuerpo y el grupo sulfhidrilo se genera por reducción de un disulfuro intercatenario. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la Unidad Enlazadora se conjuga con un resto de cisteína de los disulfuros reducidos intercatenarios.
- En otra realización, el grupo sulfhidrilo se introduce químicamente en el anticuerpo, por ejemplo mediante la introducción de un resto de cisteína. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la unidad Enlazadora se conjuga con un resto de cisteína introducido.
- Las proteínas, polipéptidos, o ligandos peptídicos no inmunorreactivos útiles incluyen, aunque sin limitación, transferrina, factores de crecimiento epidérmico ("EGF"), bombesina, gastrina, péptido liberador de gastrina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, IL-2, IL-6, factores de crecimiento transformantes ("TGF"), tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de vaccinia ("VGF"), insulina y factores de crecimiento I y II de tipo insulina, somatostatina, lectinas y apoproteína procedente de una lipoproteína de baja densidad.
- Los ligandos particularmente preferidos son anticuerpos. Los anticuerpos policlonales útiles son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo obtenidas de los sueros de animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales útiles son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un determinante antigenético particular (p. ej., un antígeno de célula cancerosa, un antígeno vírico, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un producto químico, ácido nucleico, o fragmentos de los mismos). Puede prepararse un anticuerpo monoclonal (mAb) frente a un antígeno de interés utilizando cualquier técnica conocida en la técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo.
- Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados o anticuerpos monoclonales químéricos de ser humano-ratón (u otras especies). Los anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos mediante cualquiera de numerosas técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, Teng *et al.*, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:7308-7312; Kozbor *et al.*, 1983, Immunology Today 4:72-79; y Olsson *et al.*, 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16).
- El anticuerpo puede ser un fragmento, derivado o análogo de un anticuerpo funcionalmente activo que se une inmunoespecíficamente a células diana deseado (por ejemplo, antígenos de células cancerosas, antígenos víricos o antígenos microbianos) u otros anticuerpos unidos a las células tumorales o a la matriz. A este respecto, "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de estimular anticuerpos anti-anti-idiotipo que reconocen el mismo antígeno que el anticuerpo del cual se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una realización ilustrativa, se puede potenciar la antigenicidad del idiótipo de la molécula de inmunoglobulina mediante la delección de las secuencias marco y de las CDR que están en el extremo C de la secuencia de la CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de las CDR en los ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier procedimiento de ensayo de unión conocido en la materia (por ejemplo, el ensayo BIA core) (véanse, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E *et al.*, 1980, J. Immunology 125(3):961-969).
- Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, sin limitación, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fab, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, scFv, scFv-FV o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo.
- Además, se divultan anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales químéricos y humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que pueden fabricarse utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, son anticuerpos útiles. Un anticuerpo químérico es una molécula en la que las distintas porciones se obtienen de distintas especies animales, tal como, por ejemplo, las que tienen una región variable obtenida de un monoclonal murino y regiones constantes de inmunoglobulina humana. (Véanse, por ejemplo, la

- patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y la patente de EE. UU. N.º 4.816.397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (las CDR) de la especie no humana y una región marco conservada de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.585.089). Dichos anticuerpos monoclonales químicos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la publicación internacional n.º WO 87/02671; la publicación de patente europea N.º EP 0 184 187; la publicación de patente europea N.º EP 0 171 496; la publicación de patente europea N.º EP 0 173 494; la Publicación Internacional N.º WO 86/01533; la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; la publicación de patente europea N.º 012 023; Berter *et al.*, 1988, Science 240: 1041-1043; Liu *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura *et al.*, 1987, Cancer. Res. 47:999-1005; Wood *et al.*, 1985, Nature 314:446-449; y Shaw *et al.*, 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214; la patente de EE. UU. n.º 5.225.539; Jones *et al.*, 1986, Nature 321:552-525; Verhoeven *et al.*, 1988, Science 239:1534; y Beidler *et al.*, 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.
- Son particularmente deseables los anticuerpos completamente humanos y se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar los genes de la cadena pesada y ligera humana.
- Los anticuerpos incluyen análogos y derivados que bien pueden estar modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente permita al anticuerpo retener su inmunoespecificidad de unión a antígeno. Por ejemplo, aunque no de forma limitativa, los derivados y análogos de los anticuerpos incluyen aquellos que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas que incluyen, sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc. Además, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.
- Los anticuerpos pueden tener modificaciones(*por ejemplo*, sustituciones, delecciones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con receptores Fc. En particular, los anticuerpos pueden tener modificaciones en restos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio dirigido contra Fc y el receptor de FcRn (véase, por ejemplo, LA publicación internacional n.º WO 97/34631).
- Se pueden obtener anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. Pueden obtenerse anticuerpos inmunoespecíficos que codifican la secuencia de nucleótidos de un antígeno de célula cancerosa, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos similar, de las publicaciones de la bibliografía, o por clonación y secuenciación rutinarias.
- En una realización específica, pueden utilizarse anticuerpos conocidos para el tratamiento del cáncer. Se pueden obtener anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa comercialmente o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinante. Pueden obtenerse anticuerpos inmunoespecíficos que codifican la secuencia de nucleótidos de un antígeno de célula cancerosa, por ejemplo, de la base de datos GenBank o de una base de datos similar, de las publicaciones de la bibliografía, o por clonación y secuenciación rutinarias.
- Pueden utilizarse anticuerpos para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. Se pueden obtener anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de una célula que es responsable de producir anticuerpos autoinmunitarios de cualquier organización (por ejemplo, un científico de una universidad o una compañía) o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, síntesis química o técnicas de expresión recombinante. En otra realización, los anticuerpos útiles que son inmunoespecíficos para el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias incluyen, aunque sin limitación, anticuerpo antinuclear; anticuerpo dirigido contra el ADNds; anticuerpo dirigido contra el ADNss, IgM de anticuerpo dirigido contra cardiolipina, IgG; IgM de anticuerpo dirigido contra fosfolípido, IgG; anticuerpo dirigido contra SM; anticuerpo dirigido contra mitocondrias; anticuerpo tiroideo; anticuerpo microsomal; anticuerpo de tiroglobulina; anticuerpo anti SCL-70; anticuerpo dirigido contra Jo; anticuerpo dirigido contra U<sub>1</sub>RNP; anticuerpo dirigido contra La/SSB; anti-SSA; anticuerpo dirigido contra SSB; anticuerpo dirigido contra células peritales; anticuerpo dirigido contra histonas; anticuerpo dirigido contra RNP; anticuerpo C-ANCA; anticuerpo P-ANCA; anticuerpo dirigido contra centrómero; anticuerpo antifibrilarina y anticuerpo dirigido contra GBM.
- En determinadas realizaciones, los anticuerpos útiles pueden unirse a un receptor o a un complejo receptor expresado en un linfocito activado. El receptor o el complejo receptor puede comprender un miembro de la superfamilia de los genes de las inmunoglobulinas, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocina, un receptor de quimiocinas, una proteína principal de histocompatibilidad, una lectina o una proteína de control del complemento. Los ejemplos no limitantes de miembros adecuados de la superfamilia de las

5 inmunoglobulinas son CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD28, CD30, CD70, CD79, CD90, CD152/CTLA-4, PD-1 e ICOS. Los ejemplos no limitantes de miembros adecuados de la superfamilia de receptores de TNF son CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4-1BB, TNF-R1, TNFR-2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4 y APO-3. Los ejemplos no limitantes de integrinas adecuadas son CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 y CD104. Los ejemplos no limitantes de lectinas adecuadas son las lectinas del tipo C, lectina de tipo S, y lectina de tipo I.

#### **La Unidad de Fármaco, D**

10 La unidad de fármaco (D) puede ser cualquier fármaco citotóxico, citostático o inmunosupresor también denominado en el presente documento agente citotóxico, citostático o inmunosupresor. La unidad de Fármaco tiene un átomo que puede formar un enlace con la Unidad Enlazadora. En algunas realizaciones, la unidad de Fármaco D tiene un átomo de nitrógeno que puede formar un enlace con la unidad Enlazadora. En otras realizaciones, la unidad de fármaco D tiene un ácido carboxílico que puede formar un enlace con la unidad Enlazadora. En otras realizaciones, la unidad de fármaco D tiene un grupo sulfhidrilo que puede formar un enlace con la unidad Enlazadora. En otras realizaciones, la unidad de fármaco D tiene un grupo hidroxilo o cetona que puede formar un enlace con la unidad Enlazadora.

15 Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunosupresores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, aglutinantes del surco menor de ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cis-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizantes de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos preformados, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizantes de la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca o similares. Ejemplos particulares de clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, aglutinantes del surco menor de ADN, agentes alquilantes del ADN e inhibidores de la tubulina. Los agentes citotóxicos ilustrativos incluyen, por ejemplo, auristatinas, camptotecinas, duocarmicinas, etopósidos, maitansinas y maitansinoides (por ejemplo, DM1 y DM4), taxanos, benzodiacepinas (por ejemplo, pirrolo[1,4]benzodiacepinas (PBD), indolinobenzodiacepinas y oxazolidinobenzodiacepinas) y alcaloides de la vinca. En los documentos WO 2010/091150, WO 2012/112708, WO 2007/085930 y WO 2011/023883 se describen fármacos que contienen determinadas benzodiacepinas.

20 Los agentes citotóxicos o inmunosupresores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, busionina sulfoximina, caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citosina, citocalasina B, dacarbazine, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorubicina, decarbazine, docetaxel, doxorubicina, etopósido, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gemcitabina, gramicidina D, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), maitansina, mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, paclitoxina, plicamicina, procarbazina, rizoxina, estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina, 30 vinorelbina, VP-16 y VM-26.

25 En algunas realizaciones típicas, los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, aglutinantes de la ranura menor del ADN (por ejemplo, enediinas y lexitropsinas, un compuesto CBI; véase también la patente de EE.UU. n.º 6.130.237), duocarmicinas (véase la publicación de EE.UU. n.º 20060024317), taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puromicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobia, y mitoxantrona.

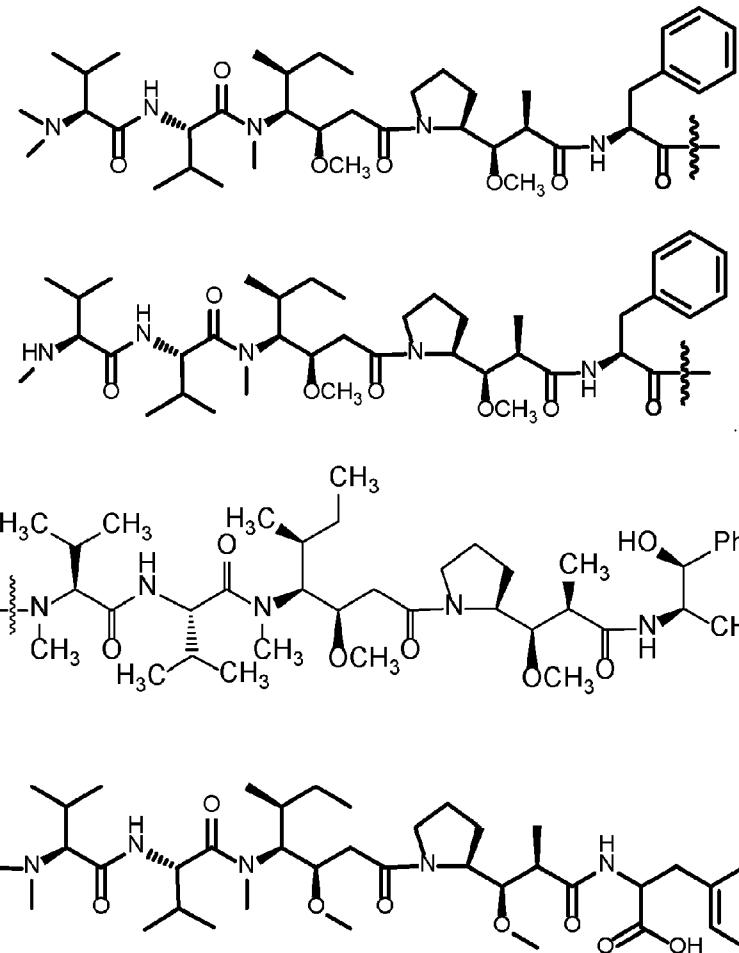
30 En algunas realizaciones, la unidad de Fármaco es un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, aunque sin limitación, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik) y alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de bacatina, análogos de taxanos por ejemplo, epotilona A y B, nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermólido y eleuterobia.

35 En determinadas realizaciones, el agente citotóxico es maitansina o un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari *et al.*, 1992, Cancer Res. 52:127-131 y la patente de EE.UU. n.º 8.163.888).

40 En algunas realizaciones, la unidad de Fármaco es una auristatina. Las auristatinas incluyen, aunque sin limitación, AA, AFP, AEB, AEVB, MMAF y MMAE. La síntesis y la estructura de las auristatinas se describen en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003-0083263, 2005-0238649 2005-0009751, 2009-0111756 y 2011-0020343; la publicación de patente internacional N.º WO 04/010957, la publicación de patente internacional N.º WO 02/088172 y las patentes de EE.UU. N.º 7.659.241 y 8.343.928. Las auristatinas ilustrativas de la presente invención se unen a la tubulina y ejercen un efecto citotóxico o citostático sobre la línea celular deseada.

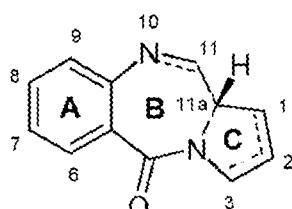
45 65 Las unidades de fármaco de auristatina ilustrativas tienen la siguiente fórmula o una sal farmacéuticamente aceptable

de la misma, en donde la línea ondulada indica el lugar de unión a la unidad enlazadora:



En algunas realizaciones, el Fármaco es una benzodiacepina (incluidos los fármacos que contienen benzodiacepinas, por ejemplo, pirrolo[1,4]benzodiacepinas (PBD), indolinobenzodiacepinas y oxazolidinobenzodiacepinas).

Las PBD son de la estructura general:



pero pueden diferir en el número, el tipo y la posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos aromáticos A como en los anillos pirrolo C, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina ( $\text{N}=\text{C}$ ), una carbinolamina ( $\text{NH}-\text{CH}(\text{OH})$ ) o un éter metílico de carbinolamina ( $\text{NH}-\text{CH}(\text{OMe})$ ) en la posición N10-C11, que es el centro electrofílico responsable de la alquilación del ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición quiral C11a que les proporciona un giro dextrógiro cuando se observan desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional apropiada para la isohelicidad con el surco menor del ADN de la forma B, lo que conduce a un ajuste completo en el sitio de unión. La capacidad de las PBD para formar un aducto en el surco menor les permite interferir con el procesamiento del ADN, de ahí su uso como agentes antitumorales. La actividad biológica de estas moléculas puede potenciarse mediante, por ejemplo, unión de las dos unidades de PBD a través de sus 10  
funcionalidades C8/C'-hidroxilo mediante un enlace cruzado flexible. Se cree que los dímeros de PBD forman 15  
lesiones de ADN selectivas de secuencia, como el enlace cruzado palindrómico 5'-Pu-GATC-Py-3' entre cadenas, que se considera el principal responsable de su actividad biológica.

Existen varios ensayos distintos que pueden utilizarse para determinar si un conjugado Ligando-Fármaco ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular. En un ejemplo para determinar si un TM-CAF ejerce un efecto 20

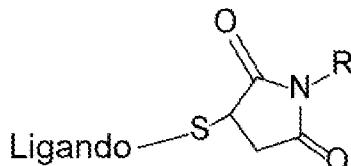
citostático o citotóxico en una línea celular, se utiliza un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, se cultivan células a una densidad de 5000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos cultivan durante un período de 72 horas y se exponen a 0,5 µCi de  $^3\text{H}$ -timidina durante las últimas 8 horas del período de 72 horas, y se mide la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en las células del cultivo en presencia y ausencia del conjugado Ligando-Fármaco. El conjugado Ligando-Fármaco tiene un efecto citostático o citotóxico sobre la línea celular si las células del cultivo tienen una incorporación reducida de  $^3\text{H}$ -timidina en comparación con células de la misma línea celular cultivadas en las mismas condiciones, pero sin ponerlas en contacto con el conjugado Ligando-Fármaco.

- 5 En otro ejemplo, para determinar si un conjugado Ligando-Fármaco ejerce un efecto citostático o citotóxico en una  
10 línea celular, se mide la viabilidad celular determinando en una célula la captación de un colorante, tal como rojo neutro, azul tripán o azul ALAMAR™ (véase, por ejemplo, Page *et al.*, 1993, Intl. J. of Oncology 3:473-476). En dicho ensayo, las células se incuban en medio que contiene el colorante, se lavan las células y el resto del colorante, que refleja la captación celular del colorante, se mide espectrofotométricamente. También puede usarse el colorante de  
15 unión a proteínas sulforrodamina B (SRB) para medir la citotoxicidad (Skehan *et al.*, 1990, J. Nat'l Cancer Inst. 82:1107-12). Los conjugados Ligando-Fármaco preferidos incluyen los que tienen un valor de  $\text{Cl}_{50}$  (definido como la concentración de mAB que arroja un 50 % de destrucción celular) de menos de 1000 ng/ml, preferentemente inferior a 500 ng/ml, más preferentemente inferior a 100 ng/ml, incluso más preferentemente inferior a 50 o incluso inferior a 10 ng/ml en la línea celular.
- 20 Los procedimientos generales para unir un fármaco a enlazadores se conocen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 8.163.888, 7.659.241, 7.498.298, la publicación de Estados Unidos N.º US20110256157 y las solicitudes internacionales N.º WO2011023883 y WO2005112919.

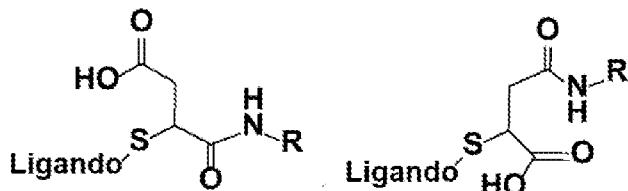
#### M<sup>1</sup> - La succinimida

- 25 Una succinimida no hidrolizada (también denominada en el presente documento anillo de succinimida) conjugada con la unidad de Ligando mediante un enlace tioéter puede representarse como sigue, en donde R representa el resto de la unidad Enlazadora opcionalmente conjugada con una unidad de Fármaco, Unidad de Detección o unidad de Estabilidad:

30



- 35 Una succinimida no hidrolizada (también denominada en el presente documento anillo de succinimida) conjugada con la unidad de Ligando mediante un enlace tioéter puede representarse como uno de sus isómeros de posición como sigue, en donde R representa el resto de la unidad Enlazadora opcionalmente conjugada con una unidad de Fármaco, Unidad de Detección o unidad de Estabilidad:



- 40 Se entenderá para las succinimidas no hidrolizadas y las representaciones de succinimidas hidrolizadas, puede haber de 1 a 20, preferentemente de 1 a 12, de 1 a 10 o de 1 a 8 enlazadores autoestabilizantes conjugados a cada Ligando. En algunos aspectos, hay de 1 a 20, preferentemente de 1 a 12, de 1 a 10 o de 1 a 8 fármacos-enlazadores conjugados a cada Ligando. Además, para los conjugados descritos en el presente documento en los que no se une un Ligando, la succinimida está en una forma insaturada como una maleimida (capaz de reaccionar con un tiol o con el Ligando).

45

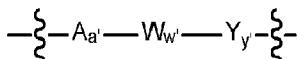
#### Unidades básicas

- La unidad básica (UB) puede ser esencialmente una base capaz de facilitar el ataque de un ion hidróxido (o agua) para hidrolizar un grupo succinimida cercano. Por consiguiente, la unidad Básica de la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en  $-(\text{CH}_2)_x\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_x\text{NHR}^a$  y  $-(\text{CH}_2)_x\text{NR}^a_2$ , en donde x es un número entero de 0 a 4, de 1 a 4, de 1 a 3 o de 2 a 3 o de 2 a 4, y también puede ser 0, 1, 2, 3 o 4 y cada  $\text{R}^a$  se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo  $\text{C}_{1-6}$  y haloalquilo  $\text{C}_{1-6}$  o dos grupos  $\text{R}^a$  se combinan con el

nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidinilo, pirrolidinilo o piperidinilo, siempre que no haya menos de 2 átomos intermedios entre la base de la unidad Básica y el átomo de nitrógeno de la succinimida (hidrolizada o no) o dilactama.

## 5 Conjunto enlazador secundario opcional ( $L^o$ )

Como se ha indicado anteriormente, el conjunto enlazador secundario opcional puede representarse mediante la fórmula:



en donde -A- es una unidad de Extensión opcional, el subíndice  $a'$  es 0 o 1; -W- es una unidad Escindible opcional, el subíndice  $w'$  es 0 o 1; e -Y- es una unidad de Espaciador opcional y el subíndice  $y'$  es 0 o 1. La línea ondulada adyacente a la unidad de Extensión opcional indica el lugar de unión al conjunto enlazador autoestabilizante y la línea ondulada adyacente a la unidad Espaciadora opcional indica el lugar de unión a la unidad de Fármaco.

Métodos generales de unión de una unidad de Fármaco, una unidad de Detección o una unidad de Estabilidad a una unidad de Ligando son conocidos en la técnica y los enlazadores conocidos en la técnica pueden adaptarse para su uso con un conjunto enlazador autoestabilizante o modificarse para incluir un componente básico y/o un grupo aceptor de electrones utilizando las enseñanzas descritas en el presente documento. Por ejemplo, se encuentran actualmente en desarrollo clínico los CAF de auristatina y maitansina para el tratamiento del cáncer. La monometil auristatina E se conjuga a un anticuerpo a través de un enlazador peptídico escindible por proteasa, la monometil auristatina F se conjuga directamente a un anticuerpo a través de ácido maleimidocaproico, DM1 se conjuga a través de un disulfuro o directamente a través del enlazador SMCC heterobifuncional y DM4 se conjuga a través de un enlazador de disulfuro.

Estos sistemas enlazadores pueden adaptarse para su uso con un conjunto enlazador autoestabilizante o modificarse para incluir un componente básico y/o un grupo aceptor de electrones utilizando las enseñanzas descritas en el presente documento y proporcionar la liberación del fármaco mediante un sistema escindible o no escindible dependiendo del sistema enlazador utilizado. Los enlaces disulfuro: tioéter, péptido, hidrazina, éster o carbamato son todos ejemplos de enlaces que pueden utilizarse para conectar una Unidad Fármaco a una Unidad Enlazadora. Las Unidades de Tramo, Unidades Escindibles y las Unidades Espaciadoras se describen con más detalle a continuación.

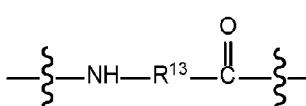
Las Unidades de Tramo, Unidades Escindibles y las Unidades Espaciadoras se describen con más detalle a continuación.

## 35 La unidad ensanchadora

La unidad ensanchadora (-A-), cuando está presente, amplía el marco de la unidad Enlazadora para proporcionar más distancia entre el conjunto de enlace autoestabilizante y la unidad de Fármaco. Una unidad de Extensión es capaz de unir el conjunto enlazador autoestabilizante a la unidad Escindible cuando la unidad Escindible está presente, el conjunto enlazador autoestabilizante a la unidad espaciadora cuando la unidad Escindible está ausente pero la unidad Espaciadora está presente y el conjunto enlazador autoestabilizante a la unidad de Fármaco cuando tanto la unidad Escindible como la unidad Espaciadora están ausentes. Como se ha descrito, una unidad de Extensión es capaz de unirse a más de una unidad Escindible, Unidad espaciadora y/o unidad de Fármaco.

La unidad de Extensión también puede actuar para alterar las propiedades fisicoquímicas del Fármaco-Enlazador en función de los componentes de la unidad de Extensión. En algunos aspectos, la unidad de Extensión se añadirá para aumentar la solubilidad del Fármaco-Enlazador y comprenderá uno o varios grupos potenciadores de la solubilidad, tales como grupos iónicos o polímeros solubles en agua. Los solubles en agua normalmente incluyen cualquier segmento o polímero que sea soluble en agua a temperatura ambiente e incluyen grupos de polí(etileno)glicol, así como otros polímeros tales como polietileniminas.

Una unidad de Extensión puede comprender uno o varios grupos de extensión. Los grupos de tramo ilustrativos incluyen, por ejemplo, -NH-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -NH-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-NH-C(O)-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -NH-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-C(O)-NH-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub>-CH<sub>2</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>s</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>s</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-, -NH-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -NH-(arileno-), y -NH-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, en donde cada s es independientemente 1-10. Un grupo de tramo representativo que tiene un grupo carbonilo para enlazarse con el resto de la unidad Enlazadora o la unidad fármaco es el siguiente:



en donde R<sup>13</sup> es -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -arileno-, -heteroalquieno C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>-, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -arileno-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -arileno-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquieno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-

, -alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-10</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>- o -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>1-10</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>- En algunas realizaciones, R<sup>13</sup> es -alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>- o heteroalquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>- En algunas realizaciones, R<sup>13</sup> es -alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-10</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>- o -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>1-10</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>- En algunas realizaciones, R<sup>13</sup> es -alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-polietilenenglicol o polietilenimina.

5 Los sistemas de liberación de fármacos no escindibles son conocidos en la técnica y pueden adaptarse para su uso con los conjuntos de enlazador autoestabilizante de la presente invención como unidades de Tramo y/o unidades Espaciadoras. Un enlazador no escindible es capaz de unir una unidad de Fármaco a un Ligando de forma generalmente estable y covalente y es sustancialmente resistente a la escisión inducida por ácidos, la escisión inducida por luz, la escisión inducida por peptidasas o esterasas y la escisión de enlaces disulfuro. El fármaco se libera de los conjugados Ligando-Fármaco que contienen enlazadores no escindibles a través de mecanismos alternativos, tal como degradación proteolítica del ligando.

10 15 Los reactivos reticulantes que forman enlazadores no escindibles entre los fármacos maitansinoides y los ligandos son bien conocidos en la técnica y pueden adaptarse para su uso en el presente documento. Los reactivos de reticulación ilustrativos que forman enlazadores no escindibles entre los fármacos maitansinoides y los ligandos comprenden una fracción basada en maleimido o haloacetilo. Entre ellos se incluyen N-succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de SMCC de "cadena larga" (LC-SMCC), éster N-succinimidílico de ácido κ-maleimidoundecanoico (KMUA), éster N-succinimidílico de ácido γ-maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimida de ácido ε-maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida [AMAS], succinimidil-6-(β-maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), 4-(p-maleimidofenil)-butirato de N-succinimidilo (SMPB) e isocianato de N-(p-maleimidofenilo) (PMPI), N-succinimidil-4-(yodoacetil)-aminobenzoato (SIAB), yodoacetato de N-succinimidilo (SIA), bromoacetato de N-succinimidilo (SBA) y 25 3-(bromoacetamido)propionato de N-succinimidilo (SBAP). Se pueden encontrar unidades de tramo adicionales para su uso en combinación con el conjunto enlazador autoestabilizante de la presente invención, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 8.142.784.

### La Unidad Escindible

30 La unidad Escindible (-W-), cuando está presente, es capaz de unir el conjunto enlazador autoestabilizante a la unidad Espaciadora cuando la unidad Espaciadora está presente o el conjunto enlazador autoestabilizante a la unidad de Fármaco cuando la unidad Espaciadora está ausente. La unión desde el conjunto enlazador autoestabilizante a la unidad Espaciadora o a la unidad de Fármaco puede ser directamente desde el conjunto enlazador autoestabilizante cuando la unidad de Extensión está ausente o a través de la unidad de Extensión si la unidad de Extensión está presente.

40 45 En alguna realización, la unidad Escindible se conjugará directamente con el conjunto enlazador autoestabilizante en un extremo y con la unidad de Fármaco en el otro. En otras realizaciones, la unidad Escindible se conjugará directamente con la unidad de Extensión en un extremo y con la unidad de Fármaco en el otro. En aún en otras realizaciones, la unidad Escindible se conjugará directamente con la unidad de Extensión en un extremo y con la unidad Espaciadora en el otro. En aún otras realizaciones más, la unidad Escindible se conjugará directamente con el conjunto enlazador autoestabilizante en un extremo y con la unidad Espaciadora en el otro. En estas realizaciones puede utilizarse cualquiera de los conjuntos enlazadores autoestabilizantes descritos específicamente en el presente documento.

50 La unidad Escindible es capaz de formar un enlace escindible con una unidad de Fármaco o una unidad Espaciadora. Los grupos reactivos para formar enlaces escindibles pueden incluir, por ejemplo, grupos sulfhidrilo para formar enlaces disulfuro, aldehído, cetona o grupos hidrazina para formar enlaces hidrazona, grupos carboxílicos o amino para formar enlaces peptídicos, y grupos carboxílicos o hidroxi para formar enlaces éster.

55 La naturaleza de la unidad Escindible puede variar mucho. Por ejemplo, los enlazadores escindibles incluyen enlazadores que contienen disulfuro y que son escindibles por intercambio de disulfuro, enlazadores lábiles al ácido que se pueden escindir a pH ácido, y enlazadores que se pueden escindir por hidrolasas, peptidasas, esterasas y glucuronidasas.

60 En algunos aspectos, la estructura y secuencia de la unidad Escindible es tal que la unidad es escindida por la acción de enzimas presentes en el sitio diana. En otros aspectos, la unidad Escindible puede ser escindible por otros mecanismos. La unidad Escindible puede comprender uno o múltiples sitios de escisión.

En algunas realizaciones, la unidad Escindible comprenderá un aminoácido o una o más secuencias de aminoácidos. La unidad Escindible puede comprender, por ejemplo, un monopéptido, un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido.

65 Cada aminoácido puede ser natural o no natural y/o un isómero D o L, siempre que exista un enlace escindible. En algunas realizaciones, la unidad Escindible comprenderá únicamente aminoácidos naturales. En algunos aspectos, la

unidad escindible comprenderá de 1 a 12 aminoácidos en secuencia contigua.

En algunas realizaciones, cada aminoácido se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, valina, cisteína, metionina, selenocisteína, ornitina, penicilamina,  $\beta$ -alanina, ácido aminoalcanoico, ácido aminoalquínico, ácido aminoalcanedioico, ácido aminobenzoico, ácido amino-heterociclo-alcanoico, ácido heterociclo-carboxílico, citrulina, estatina, ácido diaminoalcanoico y derivados de los mismos. En algunas realizaciones, cada aminoácido se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, valina, cisteína, metionina y selenocisteína. En algunas realizaciones, cada aminoácido se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, y valina. En algunas realizaciones, cada aminoácido se selecciona entre los aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos.

- 15      En otra realización, cada aminoácido se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en los siguientes aminoácidos L-(naturales): alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano, valina, cisteína, metionina y selenocisteína.
- 20      En otra realización, cada aminoácido se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en los siguientes isómeros D de estos aminoácidos naturales: alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, histidina, glicina, ácido glutámico, glutamina, fenilalanina, lisina, leucina, serina, tirosina, treonina, isoleucina, prolina, triptófano y valina.

- 25      En algunas realizaciones, la unión entre la unidad Escindible y la unidad de Fármaco puede ser escindida enzimáticamente por una o más enzimas, incluida una proteasa asociada a tumor, para liberar la Unidad de fármaco (-D), que en una realización se protona *in vivo* tras la liberación para proporcionar un fármaco (D).

- 30      Pueden diseñarse unidades Escindibles útiles y optimizarse en su selectividad de escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor. En una realización, una unión (o enlace) entre la unidad Escindible y la unidad de Fármaco o unidad Espaciadora es aquella cuya escisión es catalizada por la catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

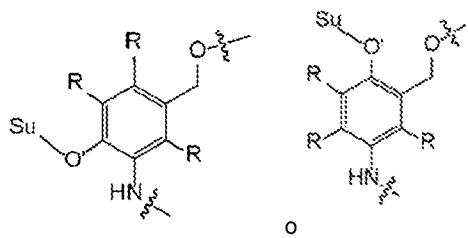
- 35      En determinadas realizaciones, la unidad Escindible puede comprender únicamente aminoácidos naturales. En otras realizaciones, la unidad Escindible puede comprender únicamente aminoácidos no naturales. En algunas realizaciones, la unidad Escindible puede comprender un aminoácido natural unido a un aminoácido no natural. En algunas realizaciones, la unidad Escindible puede comprender un aminoácido natural unido a un isómero D de un aminoácido natural.

- 40      Una unidad Escindible ilustrativa es el dipéptido -Val-Cit-, -Phe-Lys- o -Val-Ala.
- 45      En algunas realizaciones, la unidad Escindible comprenderá un péptido y comprenderá de 1 a 12 aminoácidos. En algunas de tales realizaciones, el péptido se conjugará directamente con la unidad de Fármaco y la unidad Espaciadora estará ausente. En algunas de tales realizaciones, la unidad de Extensión y la unidad Espaciadora estarán ausentes. En un aspecto, el péptido será un dipéptido.
- 50      En algunas realizaciones, la unidad Escindible -W<sub>w</sub>- estará representada por  $\text{--}(\text{AA})_{1-12}\text{--}$  o  $\text{--}(\text{AA}-\text{AA})_{1-6}\text{--}$  en donde AA es en cada aparición independientemente seleccionada entre aminoácidos naturales o no naturales. En un aspecto, AA es en cada aparición independientemente seleccionado entre aminoácidos naturales. Un experto en la materia apreciaría que los aminoácidos están típicamente unidos a la unidad de Fármaco o a la unidad Espaciadora a través de unidades funcionales presentes en el aminoácido, por ejemplo, su ácido carboxílico o sus amino terminales.

- 55      En otros aspectos, la unidad Escindible comprenderá una unidad de glucorónido, preferentemente 1 o 2 unidades de glucorónido. En algunas de tales realizaciones, la unidad de Glucurónido comprende un resto de azúcar (Su) unido mediante un enlace glucosídico (-O') a un Espaciador autoinmolable:

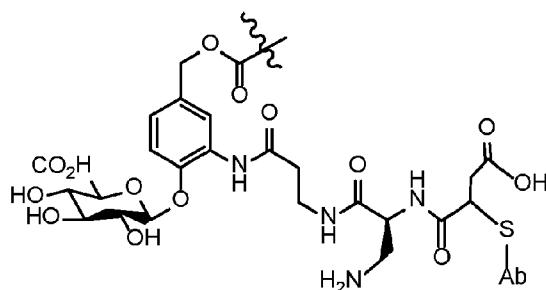
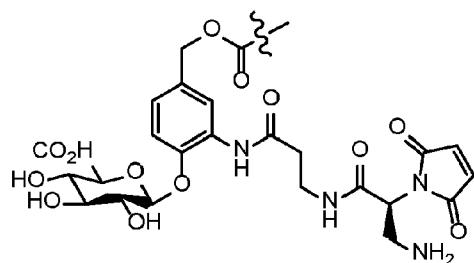
-[Su-O'-Y]-

- 60      El enlace glucosídico (-O') es normalmente un sitio de escisión de  $\beta$ -glucuronidasa, tal como un enlace escindible por el ser humano, una  $\beta$ -glucuronidasa lisosómica.
- En algunos aspectos, -[Su-O'-Y]- está representado por la siguiente fórmula:



en donde Su es un resto de Azúcar,  $-O'$  representa un enlace glucosídico; cada R es, de forma independiente, hidrógeno, un halógeno, -CN o  $-NO_2$ ; en donde el enlace ondulado adyacente al átomo de nitrógeno indica la unión covalente a la unidad de Extensión o al Ligando y el enlace ondulado adyacente al oxígeno indica la unión covalente a la unidad Espaciadora o a la unidad de Fármaco. Una unidad Enlazadora ilustrativa que comprende un glucorónido antes de la conjugación con un anticuerpo y después de la conjugación es la siguiente, en donde la línea ondulada indica la unión a una unidad de Fármaco o unidad Espaciadora y Ab representa un anticuerpo y S es un átomo de azufre del anticuerpo. Se entenderá que se puede unir más de un conjunto autoestabilizante a cada anticuerpo:

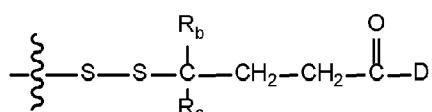
10



15 En algunas realizaciones, la propia unidad Escindible comprenderá un átomo de azufre capaz de formar un enlace con un átomo de azufre de una unidad Espaciadora o de una unidad de Fármaco para formar un disulfuro o un disulfuro impedido. La escisión se produce entre los dos átomos de azufre del disulfuro. En algunas de tales realizaciones, uno de los átomos de azufre se escinde de la unidad de Fármaco y, siempre que no haya otro mecanismo de liberación, el otro átomo de azufre permanece unido a la unidad de Fármaco. Una unidad Enlazadora que comprende una unidad Escindible con un átomo de azufre es capaz de formar un enlace con un átomo de azufre de una unidad Espaciadora o de una unidad de Fármaco para formar un disulfuro o un disulfuro impedido.

20

25 Los enlazadores ilustrativos incluyen, por ejemplo, el siguiente Fármaco-Enlazador en donde la línea ondulada indica el lugar de unión al resto de la Unidad Enlazadora, D es un fármaco maitansinoide y  $R_a$  y  $R_b$  se seleccionan independientemente entre H o metilo.



30 En la técnica se conocen diversos enlazadores disulfuro y pueden adaptarse para el uso en la invención presente, incluidos, por ejemplo, los que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetilitoacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato), SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno) y SPP (N-succinimidil 4-(2-piridil-ditio)pentanoato). (Véanse, por ejemplo, Thorpe *et al.*, 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, En Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también la Patente de Estados Unidos n.º 4.880.935).

En algunas realizaciones, el enlazador escindible es sensible al pH y comprenderá, por ejemplo, un enlazador lábil al

ácido que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, un grupo hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-acónica, ortoéster, acetal o cetal). (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.122.368, 5.824.805, 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123; Neville *et al.*, 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661.) Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables a un pH inferior a 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma.

En algunas realizaciones, la unidad Escindible se conjugará directamente con la unidad de Fármaco y la unidad Espaciadora estará ausente y la unidad Escindible se unirá a la unidad de Fármaco mediante un enlace peptídico, disulfuro o hidrazona escindible.

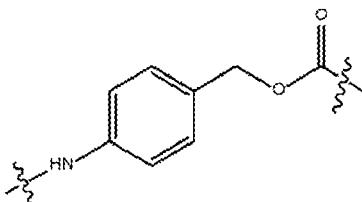
10

### **La unidad espaciadora**

La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad Escindible a la unidad de Fármaco o una unidad de Extensión a la unidad de Fármaco o un conjunto enlazador autoestabilizante a una unidad de Fármaco. Como la unidad de Extensión, la unidad Espaciadora, cuando está presente puede actuar para ampliar el marco de la unidad Enlazadora. La unidad Espaciadora puede comprender múltiples grupos autoinmolables o no autoinmolables. En algunas realizaciones, la unidad Espaciadora comprende uno o varios grupos autoinmolables. En este contexto, la expresión "grupo autoinmolar" se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de unir covalentemente de forma conjunta dos restos químicos separados en una molécula tripartita normalmente estable. Esta se separará espontáneamente del segundo resto químico si su unión al primer resto se escinde. En otras realizaciones, la unidad Espaciadora no es autoinmolar. En estas realizaciones, parte o la totalidad de la unidad Espaciadora permanece unida a la unidad de Fármaco.

En algunas realizaciones, -Y- es un grupo autoinmolar y está unido a una unidad Escindible a través del átomo de carbono metíleno del grupo autoinmolar, y unido directamente a la unidad de fármaco a través de un carbonato, carbamato o éter.

En algunas realizaciones, -Yy- es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) cuya porción fenilénica está opcionalmente sustituida con -alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), halógeno, nitró o ciano. En otra realización, -Yy- puede ser un grupo carbonato. Una unidad PAB no sustituida es la siguiente:



Otros ejemplos de enlazadores autoinmolables incluyen, aunque sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase por ejemplo, Hay *et al.*, 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. Pueden usarse separadores que experimenten una ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas de ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (véase, por ejemplo, Rodrigues *et al.*, 1995, Chemistry Biology 2:223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] adecuadamente sustituidos (véase, por ejemplo, Storm *et al.*, 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (véase, por ejemplo, Amsberry *et al.*, 1990, J. Org. Chem. 55:5867). Eliminación de fármacos que contienen aminas que están sustituidas en la posición α de la glicina (véase, por ejemplo, Kingsbury *et al.*, 1984, J. Med. Chem. 27: 1447) son también ejemplos de grupos autoinmolables.

Se divultan otras unidades Espaciadoras adecuadas en la patente de Estados Unidos publicada con el n.º 2005-0238649.

Las unidades de Tramo ilustrativas, las unidades Escindibles y las unidades Espaciadoras que pueden utilizarse con las presentes composiciones y métodos se describen en el documento WO 2004010957, el documento WO 2007/038658, el documento WO 2005/112919, las patentes de Estados Unidos n.º 6.214.345, 7.659.241, 7.498.298, 7.968.687, 8.163.888 y las publicaciones de Estados Unidos n.º 2009-0111756, 2009-0018086 y 2009-0274713.

En las realizaciones en donde los Conjugados se conjugan con una unidad de Estabilidad o una unidad de Detección en lugar de una unidad de Fármaco, el conjunto Enlazador Secundario opcional normalmente estará ausente. En las realizaciones en las que está presente el Conjunto Enlazador Secundario, la unidad de Extensión estará generalmente presente, pero la unidad Escindible y la unidad espaciadora estarán ausentes. La unidad de Extensión extenderá el armazón de la unidad Enlazadora para proporcionar más distancia entre el conjunto autoestabilizante y la unidad de Detección o la unidad de Estabilidad. En dichos aspectos, la unidad de Extensión es capaz de unir el conjunto de enlace autoestabilizante a la unidad de Detección o a la unidad de Estabilidad.

**CARGA DE FÁRMACO**

El número de enlazadores autoestabilizantes por Ligando está representado por p. En las realizaciones en donde los enlazadores no están ramificados, p representa el número de moléculas de fármaco-enlazador (o moléculas de detección-enlazador o de estabilidad-enlazador) por molécula de Ligando (por ejemplo, anticuerpo). Dependiendo del contexto, p puede representar el número promedio de enlazadores autoestabilizantes por Ligando (o en realizaciones en las que los enlazadores no están ramificados, el número promedio de moléculas de fármaco-enlazador (o de moléculas de detección-enlazador o estabilidad-enlazador) por Ligando (por ejemplo, anticuerpo)). La variable p oscila entre 1 y 20, típicamente de 1 a 12, de 1 a 10 y es, preferentemente, de 1 a 8. En algunas realizaciones preferidas, cuando p representa el número promedio de enlazadores autoestabilizantes por anticuerpo, p varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En algunas realizaciones, p es aproximadamente 2, aproximadamente 4 o aproximadamente 8. En algunas realizaciones preferidas, cuando p representa el número promedio de moléculas de fármaco-enlazador por anticuerpo, p varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. En algunas realizaciones, p es aproximadamente 2, aproximadamente 4 o aproximadamente 8. El número de D' por enlazadores autoestabilizantes está representado por u. u oscila entre 1 y 10.

El número promedio de unidades de fármaco por unidad de ligando en una preparación procedente de una reacción de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales tales como espectroscopia de masas, ensayo ELISA, HIC y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de los conjugados Fármaco-Enlazador-Ligando en función de p. En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de los conjugados homogéneos Ligando-Fármaco, cuando p es un valor determinado del conjugado Ligando-Fármaco con otras cargas de fármaco puede conseguirse por medios como la HPLC de fase inversa o la electroforesis.

**Conjunto de enlazador autoestabilizante y velocidad de hidrólisis**

El conjunto de enlazador Autoestabilizante une la unidad de Ligando a una unidad de Extensión si la unidad de Extensión está presente, une la unidad de Ligando a una unidad Escindible si la unidad de Extensión está ausente y una unidad Escindible está presente, une la unidad de Ligando a una unidad Espaciadora si la unidad de Extensión y la unidad Escindible están ausentes y la unidad Espaciadora está presente, o une la unidad de Ligando a D' (por ejemplo, una unidad de Fármaco) si la unidad de Extensión, la unidad Escindible y la unidad Espaciadora están ausentes. En algunas realizaciones, la unidad de Extensión, la unidad Escindible y la unidad Espaciadora estarán ausentes y el conjunto enlazador autoestabilizante se conjugará directamente con D' (por ejemplo, una unidad de Fármaco). En otras realizaciones, una o varias de la unidad de Extensión, la unidad Escindible y la unidad Espaciadora estarán presentes.

La velocidad a la que se hidroliza la succinimida tio-sustituida del Ligando Autoestabilizante cuando forma parte de un Conjugado Ligando-Fármaco puede cuantificarse utilizando el t<sub>1/2</sub> de hidrólisis. El t<sub>1/2</sub> de hidrólisis se refiere al tiempo que tarda en hidrolizarse la mitad del compuesto de interés, es decir, sufrir la apertura de un anillo, en las condiciones establecidas (por ejemplo, pH 7,4 y 22 °C). En algunas realizaciones de la presente invención, el t<sub>1/2</sub> de hidrólisis de la succinimida tio-sustituida de la unidad Enlazadora Autoestabilizante es inferior a 4 horas, preferentemente inferior a 3 horas, incluso más preferentemente, inferior a 2 horas, inferior a 1 hora, inferior a 45 minutos, inferior a 30 minutos, inferior a 15 minutos utilizando el ensayo y las condiciones indicadas a continuación.

Las velocidades de reacción de hidrólisis de los enlazadores de fármaco de maleimida tras su conjugación con cisteínas de anticuerpos pueden determinarse mediante espectrometría de masas, ya que el producto hidrolizado tiene un peso molecular de 18 dalton mayor que el conjugado no hidrolizado. La reducción de los disulfuros entre cadenas de una IgG1 humana crea una única cisteína reducida en la cadena ligera y tres cisteínas reducidas en la cadena pesada. A continuación, el enlazador de fármaco de maleimida autoestabilizante puede conjugarse con el anticuerpo reducido a pH 7,4 y 22 °C e introducirse en un espectrómetro de masas por electropulverización de alta resolución a través de una columna HPLC de fase inversa que separa las cadenas ligeras y pesadas conjugadas. De este modo, pueden medirse las masas de las cadenas ligeras y pesadas conjugadas y determinarse las intensidades de los picos mediante un software estándar de procesamiento de datos de espectrometría de masas (por ejemplo, MassLynx). Realizando una serie de inyecciones a lo largo del tiempo, la desaparición del pico correspondiente a la masa del original, conjugado no hidrolizado y puede controlarse la aparición del pico correspondiente a la masa del conjugado hidrolizado, las intensidades de los picos determinados y el porcentaje de conjugado hidrolizado calculado en cada punto de tiempo. Trazando el porcentaje de hidrólisis frente al tiempo, se genera una curva (por ejemplo, utilizando PRISM) que puede ajustarse a una ecuación estándar para fenómenos exponenciales que incluye un parámetro para t<sub>1/2</sub>.

En algunos aspectos, el Enlazador Autoestabilizante se diseñará de manera que el componente maleimida del enlazador autoestabilizante no sufre hidrólisis sustancial antes de la conjugación con la unidad de Ligando.

En algunas realizaciones de la presente invención, el t<sub>1/2</sub> de hidrólisis de la succinimida tio-sustituida del enlazador autoestabilizante es de aproximadamente 5 o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 24 horas, preferentemente de aproximadamente 5 o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 12 horas, más preferentemente de aproximadamente 5 o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 5 horas, más

- preferentemente de aproximadamente 5 o de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 2,5 horas, aún más preferentemente de aproximadamente 5 o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 1 hora, aún más preferentemente de aproximadamente 5 o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, aún más preferentemente de aproximadamente 5 o aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20 minutos, y aún más preferentemente de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 15 minutos a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5 (por ejemplo, 7,4) y una temperatura de aproximadamente 22 °C.
- En algunas de estas realizaciones, la t<sub>1/2</sub> de hidrólisis es la indicada anteriormente, la hidrólisis se completa. Se considera que la hidrólisis es completa si se hidroliza el 90 % de la succinimida tio-sustituida. Preferentemente, se alcanzará una hidrólisis del 95 % o más, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. En algunas realizaciones, la reacción de hidrólisis competirá con la formación de dilactama y no se completará. En algunas de tales realizaciones, al menos el 90 % del producto de reacción será una combinación de un conjugado de Ligando-Fármaco succinimida tio-sustituido hidrolizado o un conjugado de Ligando-Fármaco dilactama tio-sustituido. Preferentemente al menos el 95 % o más, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % del producto de reacción será una combinación de un conjugado de Ligando-Fármaco tio-sustituido hidrolizado o un conjugado de Ligando-Fármaco dilactama tio-sustituido. El porcentaje de hidrólisis puede calcularse a partir de los datos de espectrometría de masas del conjugado en el punto de tiempo final determinando la intensidad del pico correspondiente a la masa del conjugado no hidrolizado original y la intensidad del pico correspondiente a la masa del conjugado hidrolizado, y utilizando la suma de las intensidades pico para determinar el porcentaje hidrolizado y el porcentaje no hidrolizado.
- Además de caracterizar el conjugado de Ligando-Fármaco por su t<sub>1/2</sub> de hidrólisis y/o la eficacia de la reacción de hidrólisis, la estabilidad del conjugado de Ligando-Fármaco puede caracterizarse por la capacidad del conjugado de Ligando-Fármaco de sufrir una reacción de eliminación y de que el ligando-fármaco se transfiera de la Unidad de Ligando a un tiol reactivo alternativo presente en el entorno del conjugado de Ligando-Fármaco. En algunas realizaciones, el Fármaco-Enlazador no mostrará ninguna o prácticamente ninguna disociación del Ligando en las siguientes condiciones de ensayo e indicadas. Se considera que la expresión "disociación sustancialmente nula del ligando" se alcanza si es inferior al 40 %, preferentemente, inferior al 20 %, aún más preferentemente inferior al 10 %, o aún más preferentemente inferior al 5 % o inferior al 2 % del Fármaco-Enlazador en una muestra se disocia del Ligando.
- La eliminación de un enlazador de fármaco que contiene un enlazador enzimático de un anticuerpo puede medirse en plasma ex vivo mediante el siguiente método. El conjugado se coloca en plasma estéril y se incuba a 37 °C. Al principio de la incubación y en diferentes momentos, desde 1 hora hasta 1 semana o más, se extrae una alícuota y se congela a -80 °C. Una vez completados los puntos temporales, las muestras se pasan por una resina de afinidad de proteína A para capturar el anticuerpo, la resina se lava con tampón y, a continuación, el fármaco se libera del anticuerpo capturado mediante tratamiento con una enzima adecuada (por ejemplo, papaina o proteinasa K para los enlazadores escindibles basados en péptidos). A continuación, el fármaco liberado puede cuantificarse mediante la metodología LC-MS estándar, y la cantidad de fármaco medida en cada punto de tiempo se divide por la cantidad de fármaco medida para la alícuota de preincubación para determinar el porcentaje de fármaco que permanece conjugado con el anticuerpo en cada punto de tiempo. La precisión de este ensayo puede mejorarse incluyendo un estándar interno de conjugado anticuerpo-fármaco que se prepara utilizando una versión marcada isotópicamente del mismo ligando-fármaco, de forma que el fármaco que se libera de él puede detectarse independientemente en el ensayo LC-MS del fármaco liberado del fármaco-enlazador de prueba en virtud de su diferencia de masa. Este estándar interno de conjugado anticuerpo-fármaco marcado isotópicamente se añade a cada muestra en cantidades iguales inmediatamente antes del paso de captura de la proteína A. A continuación, la cuantificación del fármaco liberado por el CAF de prueba se realiza de forma ratiométrica con respecto a la señal del patrón interno mediante técnicas LC-MS convencionales.
- Un método alternativo para evaluar la eliminación de un enlazador de fármaco de maleimida de un anticuerpo (u otro ligando) consiste en incubar el conjugado en tampón (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato) a pH ligeramente elevado (por ejemplo, pH 8,0) en presencia de un gran exceso de un tiol de molécula pequeña (por ejemplo, N-acetil cisteína, NAC) que reaccionará con cualquier maleimida que se elimine del conjugado padre. Pueden realizarse ensayos LC-MS para detectar y cuantificar el enlazador-fármaco conjugado con NAC o el ligando precursor-conjugado. En este último caso, puede medirse la relación entre el ligando-conjugado y el ligando no conjugado, que permanecerá constante a lo largo del tiempo si el ligando-conjugado es estable. En la sección de ejemplos se ofrecen métodos adicionales.
- Tratamiento del cáncer**
- Los conjugados Ligando-Fármaco se utilizan para inhibir la multiplicación de una célula tumoral o cancerosa, provocando la apoptosis en una célula tumoral o cancerosa, o para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente. Los conjugados de Ligando-fármaco pueden utilizarse, por consiguiente, en una diversidad de contextos para el tratamiento de cánceres. Los conjugados de Ligando-fármaco pueden utilizarse para suministrar un fármaco a una célula tumoral o cancerosa. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, en una realización, la unidad de Ligando de un conjugado de Ligando-Fármaco se une o se asocia con una célula cancerosa o un antígeno asociado a una célula tumoral, y el conjugado de Ligando-Fármaco puede ser captado (internalizado) al interior de una célula tumoral o

- célula cancerosa mediante endocitosis mediada por receptor u otro mecanismo de internalización. El antígeno puede unirse a una célula tumoral o célula cancerosa o puede ser una proteína de matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa. Una vez dentro de la célula, mediante un mecanismo escindible o no escindible, en función de los componentes del sistema enlazador, el fármaco se libera dentro de la célula. En una realización alternativa, el Fármaco o unidad de Fármaco se escinde del conjugado de Ligando-Fármaco fuera de la célula tumoral o célula cancerosa, y el Fármaco o Unidad de Fármaco posteriormente penetra en la célula.
- 5 Los conjugados de Ligando-Fármaco pueden proporcionar una diana farmacológica específica para tumores o cáncer, reduciendo así la toxicidad general del fármaco. En algunas realizaciones, las Unidades enlazadoras estabilizan los Conjugados de Ligando-Fármaco en la sangre, pero son capaces de liberar el fármaco una vez dentro de la célula.
- 10 En una realización, la unidad de ligando se une a la célula tumoral o célula cancerosa.
- 15 En otra realización, la unidad de ligando se une a un antígeno de una célula tumoral o célula cancerosa que se encuentra en la superficie de la célula tumoral o célula cancerosa.
- 20 En otra realización, la unidad de ligando se une a un antígeno de una célula tumoral o célula cancerosa que es una proteína de la matriz extracelular asociada con la célula tumoral o célula cancerosa.
- 25 La especificidad de la unidad de ligando por una célula tumoral o célula cancerosa concreta puede ser importante para determinar los tumores o cánceres que se tratan de la manera más eficaz. Por ejemplo, el conjugado de ligando-fármaco que tiene una unidad de Ligando BR96 puede ser útil para tratar carcinomas positivos para antígenos entre los que se incluyen los de pulmón, mama, colon, ovario, y páncreas. Los Conjugados de Ligando-Fármaco que tienen una unidad de Ligando de unión anti-CD30 o anti-CD70 pueden ser útiles para tratar neoplasias hematológicas.
- Otros tipos de cánceres particulares que se pueden tratar con los Conjugados de ligando fármaco, aunque sin limitación, los divulgados en la Tabla 1:
- Tabla 1
- Tumores sólidos, incluyendo, pero sin limitación:
- fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rhabdomiosarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de huesos, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer bucal, cáncer nasal, cáncer de garganta, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, cáncer uterino, cáncer de testículo, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendrogioma, meningioma, cáncer de piel, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma
- cánceres transmitidos por la sangre, incluyendo, pero sin limitación:
- leucemia linfoblástica aguda "LLA", leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B, leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia mieloblástica aguda "LMA", leucemia promielocítica aguda "LPA", leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia aguda no diferenciada, leucemia mielocítica crónica "LMC", leucemia linfocítica crónica "LLC", tricoleucemia, mieloma múltiple
- leucemias aguda y crónica:
- leucemias linfoblástica, mielógena linfocítica, mielocítica
- Linfomas:
- enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de la cadena pesada, policitemia vera
- 30 **Terapia para el cáncer de multi-modalidad**
- Los cánceres, incluidos, sin limitación, un tumor, metástasis, u otra enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado, puede tratarse o inhibirse mediante la administración de un conjugado de Ligando-Fármaco.
- 35 En otras realizaciones, se proporciona una cantidad eficaz de un Conjugado de Ligando-Fármaco y un agente quimioterapéutico para su uso en métodos de tratamiento del cáncer, que incluyen administrar a un paciente lo que necesita una cantidad eficaz de un Conjugado de Ligando-Fármaco y un agente quimioterapéutico. En una realización, el agente quimioterapéutico es aquel con el que no se ha encontrado que el tratamiento del cáncer sea resistente. En otra realización, el agente quimioterapéutico es aquel con el que se ha descubierto que el tratamiento del cáncer es

resistente. Los Conjugados de Ligando-Fármaco pueden administrarse a un paciente que ha experimentado también cirugía como tratamiento para el cáncer.

5 En algunas realizaciones, el paciente también recibe un tratamiento adicional, tal como radioterapia. En una realización específica, el Conjugado de Ligando-Fármaco se administra de forma concurrente con el agente quimioterapéutico o con radioterapia. En otra realización específica, el agente quimioterapéutico o la radioterapia se administra antes o posteriormente a la administración de un conjugado de Ligando-Fármaco.

10 Se puede administrar un agente quimioterapéutico durante una serie de sesiones. Puede administrarse uno cualquiera o una combinación de agentes quimioterapéuticos, tal(es) agente(s) quimioterapéutico(s) de tratamiento estándar.

15 Además, el conjugado de Ligando-Fármaco para su uso en métodos de tratamiento del cáncer se proporcionan como alternativa a la quimioterapia o a la radioterapia cuando la quimioterapia o la radioterapia han resultado o pueden resultar demasiado tóxicas, por ejemplo, da como resultado efectos secundarios inaceptables o insopportables, para el sujeto que se está tratando. El paciente tratado puede, opcionalmente, tratarse con otro tratamiento contra el cáncer como la cirugía, radioterapia o quimioterapia, dependiendo de qué tratamiento se considera aceptable o soportable.

## **COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN**

20 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de Ligando-Fármaco se describen en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los conjugados de Ligando-Fármaco pueden tener cualquier forma que permita administrar el compuesto a un paciente para el tratamiento de un trastorno asociado con la expresión del antígeno al que se une la Unidad Ligando. Por ejemplo, los conjugados pueden estar en forma líquida o sólida. La vía de administración preferida es la parenteral. La administración parenteral incluye inyecciones subcutáneas, intravenosa, intramuscular, inyección intraesternal o técnicas de infusión. Las composiciones se pueden administrar por vía parenteral. Los compuestos pueden administrarse por vía intravenosa.

25 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de Ligando-Agente Funcional se describen en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los conjugados Ligando-Fármaco pueden presentarse en cualquier forma que permita administrar el compuesto a un paciente para el tratamiento de un trastorno o con fines de diagnóstico.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de tal manera que permitan a un compuesto estar biodisponible tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones pueden tener la forma de una o más dosis unitarias, donde, por ejemplo, un comprimido puede ser una sola unidad de dosificación.

35 Los materiales utilizados en la preparación de las composiciones farmacéuticas pueden no ser tóxicos en las cantidades utilizadas. Será evidente para los expertos en la materia que la dosificación óptima del principio (o principios) activo en la composición farmacéutica dependerá de una diversidad de factores. Los factores de interés incluyen, sin limitación, el tipo de animal (por ejemplo, un ser humano), la forma particular del compuesto, la manera de administración y la composición empleada.

40 La composición puede ser, por ejemplo, en forma de líquido. El líquido puede ser útil para la administración por inyección. En una composición para su administración mediante inyección se puede incluir, uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

45 Las composiciones líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir también uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles, tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como el medio disolvente o de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, ciclodextrina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos, tales como alcohol benzílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como aminoácidos, acetatos, citratos o fosfatos; detergentes, tales como tensioactivos no iónicos, polioles; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición parenteral se puede introducir en una ampolla, una jeringuilla desechable o un vial multidosis fabricado con vidrio, plástico u otro material. La solución salina fisiológica es un adyuvante ilustrativo. Una composición inyectable es, preferentemente, estéril.

50 La cantidad del conjugado que es eficaz en el tratamiento de un trastorno o dolencia concreto dependerá de la naturaleza del trastorno o dolencia, y se puede determinar mediante técnicas clínicas normalizadas. Además, se pueden utilizar de manera opcional ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis exacta que se va a emplear en las composiciones también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno y se decidirá según el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente.

55 Las composiciones comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de tal manera que se obtenga una dosificación

adecuada. Normalmente, esta cantidad es al menos aproximadamente un 0,01 % de un compuesto en peso de la composición.

- 5 Para la administración intravenosa, la composición puede comprender de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de un Conjugado de Ligando-Fármaco por kg de peso corporal del animal. En un aspecto, la composición puede incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg de un Conjugado de Ligando-Fármaco por kg de peso corporal del animal. En otro aspecto, la cantidad administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal de un compuesto.
- 10 En general, la dosificación de un compuesto administrada a un paciente es normalmente de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada a un paciente está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. En algunas realizaciones, la dosificación administrada está entre aproximadamente 0,1 y 4 mg/kg, incluso más preferentemente de 0,1 a 3,2 mg/kg, o incluso más preferentemente de 0,1 a 2,7 mg/kg del peso corporal del sujeto durante un ciclo de tratamiento.
- 15 Los conjugados de Ligando-Agente funcional, por ejemplo, Conjugados de Ligando-Fármaco) pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal). La administración puede ser sistémica o local. Se conocen varios sistemas de administración, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, etc., y se pueden usar para administrar un compuesto. En determinadas realizaciones, se administra más de un compuesto o composición a un paciente.
- 20
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante o excipiente, con el cual se administra un compuesto. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo. Los vehículos pueden ser suero salino, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizar, espesamiento, lubricantes y colorantes. En una realización, cuando se administra a un paciente, el compuesto o composiciones y los transportadores farmacéuticamente aceptables son estériles. El agua es un transportador ilustrativo cuando los compuestos se administran por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de glucosa y glicerol como vehículos líquidos, en particular para soluciones inyectables. Los transportadores farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes, tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes tampón del pH.
- En una realización, los conjugados se formulan en conformidad con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a animales, especialmente seres humanos. Normalmente, los transportadores o vehículos para administración intravenosa son disoluciones tampón acuosas estériles. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para administración intravenosa pueden comprender opcionalmente un anestésico local tal como lignocaína para disminuir el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan conjuntamente en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o un sobrecito, que indica la cantidad de principio activo. Cuando un conjugado se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con un frasco para infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando el conjugado se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o solución salina para que los componentes se mezclen antes de la administración.
- Las composiciones farmacéuticas generalmente se formulan como estériles, sustancialmente isotónicas y en total cumplimiento con todas las normas de las prácticas correctas de fabricación (PCF) de la Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos.
- Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los conjugados de Ligando-Fármaco de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones preferidas, la totalidad, o casi la totalidad, o más del 50 % de los conjugados ligando-fármaco presentes en la composición farmacéutica comprende una succinimida tio-sustituida hidrolizada. En algunas realizaciones preferidas, más del 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de los Conjugados de Fármaco Ligando presentes en

la composición farmacéutica comprende una succinimida tio-sustituida hidrolizada.

#### Métodos de preparación de conjugados de Ligando-Fármaco

- 5 En otro aspecto, se describen métodos de preparación de conjugados de Ligando-Fármaco o conjugados de Ligando-Agente Funcional que comprenden un enlazador autoestabilizante.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden las etapas de proporcionar una unidad de Fármaco-Enlazador o Enlazadora como se describe en el presente documento, conjugar dicha unidad de Fármaco-Enlazador o Enlazadora con un grupo sulfhidrilo de una unidad de Ligando para formar un conjugado, permitiendo que el conjugado resultante sufra una reacción de hidrólisis para formar un conjugado de Ligando-Fármaco que comprenda una succinimida hidrolizada tio-sustituida.

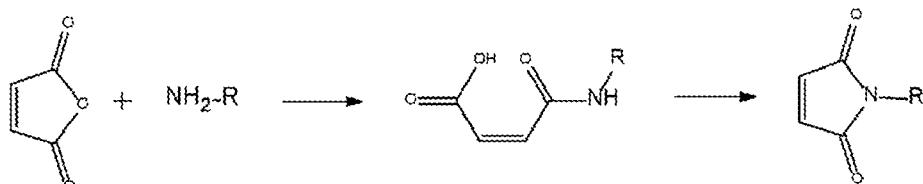
10 15 La velocidad de la hidrólisis de la succinimida tio-sustituida puede manipularse ajustando las condiciones de reacción tras la conjugación del Fármaco-Enlazador con el Ligando, por ejemplo, ajustando el pH o la temperatura. En algunas realizaciones de la presente invención, toda, prácticamente toda o al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o incluso el 95 % de la succinimida tio-sustituida se hidroliza sin manipulación de las condiciones de reacción, es decir, la reacción de hidrólisis se produce en las mismas condiciones de reacción que la reacción de conjugación. En algunas realizaciones, toda, prácticamente toda o al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o incluso el 95 % de la 20 succinimida tio-sustituida se hidroliza desde 20 minutos a 4 horas después de la conjugación, preferentemente de 20 minutos a 2 horas después de la conjugación. En realizaciones ilustrativas, las condiciones de conjugación son un pH de aproximadamente 7,4 y una temperatura de aproximadamente 22 °C.

25 Los métodos para preparar un conjugado de Ligando-Fármaco comprenden las etapas de proporcionar una unidad de Fármaco-Enlazador o Enlazadora que comprende un Enlazador Autoestabilizante; conjugar dicha unidad de Fármaco-Enlazador o Enlazadora con un grupo sulfhidrilo de un Ligando para formar un conjugado de Ligando-Fármaco que comprenda una succinimida tio-sustituida no hidrolizada; permitiendo que la succinimida tio-sustituida no hidrolizada experimente una reacción de hidrólisis, en donde toda, prácticamente toda o al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o incluso el 85 % de la succinimida se hidroliza de 10 minutos a 4 horas después de la conjugación. En algunas 30 realizaciones, toda, prácticamente toda o al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o incluso el 95 % de la succinimida se hidroliza en 10 minutos, en 20 minutos, 40 minutos, 60 minutos, 90 minutos o 120 minutos después de la conjugación. En algunas realizaciones, la reacción de hidrólisis se produce en las mismas condiciones de reacción que la reacción de conjugación. En realizaciones ilustrativas, las condiciones de conjugación son un pH de 35 aproximadamente 7,4 y una temperatura de aproximadamente 22 °C.

#### Métodos para sintetizar Enlazadores Autoestabilizantes

La presente invención proporciona, entre otras cosas, Enlaces Autoestabilizantes. Los métodos de preparación de unidades Enlazadoras Autoestabilizantes se incluyen en el ámbito de la presente invención.

40 Los compuestos de maleimida suelen prepararse a partir de las aminas correspondientes mediante la reacción de la amina primaria con anhídrido maleico seguida de la ciclodeshidratación del ácido maleámico. El esquema general para la preparación de los compuestos de maleimida se muestra en el esquema siguiente.



45 Para la preparación de maleimidas que contienen grupos básicos en la cadena lateral de la amina de partida, dichos grupos básicos deben ser protegidos, si es necesario. Los grupos protectores adecuados deben ser estables en las condiciones de preparación de la maleimida, pero deben poder eliminarse posteriormente en presencia de maleimida. 50 Los grupos protectores adecuados consisten en, aunque sin limitación, grupos protectores lábiles en presencia de ácidos. El grupo protector "Boc" es uno de los grupos protectores preferentes.

55 La primera etapa de la preparación de maleimida, la formación de ácido maleámico, es muy fácil y puede lograrse normalmente con un buen rendimiento mediante la adición lenta de la amina a una suspensión que contiene un exceso estequiométrico del anhídrido maleico.

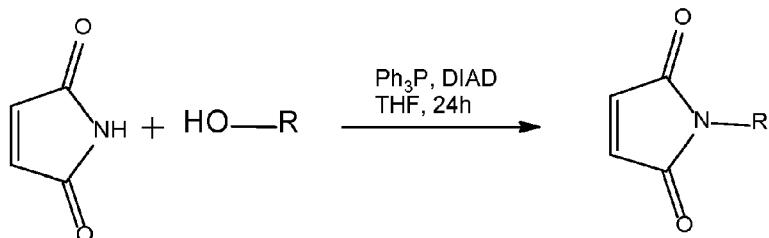
60 La segunda etapa, la ciclodeshidratación del ácido maleámico, puede lograrse de varias maneras conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, el uso de agentes químicos deshidratantes ha sido un método bien establecido para llevar a cabo esta etapa. Se han usado carbodiimidas en combinación con alcoholos isomerizantes, por ejemplo: DCC/HOBt, para efectuar la ciclodeshidratación de ácidos amicos a maleimidas.

- La ciclodeshidratación térmica con uso de destilación azeotrópica en presencia de catalizador ácido es otro método bien conocido para generar maleimidas. El uso de un disolvente azeotrópico permite eliminar eficazmente el coproducto acuoso a medida que se forma, conduciendo así la reacción a la maleimida. Entre los disolventes azeotrópicos adecuados se incluyen ciclohexano, benceno, tolueno, etilbenceno, mesitileno y similares. El tolueno se considera el más deseable, ya que hierve a 110 °C a presión atmosférica. Son preferibles temperaturas de ebullición inferiores a 200 °C para minimizar la posible isomerización térmica del ácido maleámico a la estructura trans (ácido fumarámico), termodinámicamente más estable.
- 5
- 10 El uso de codisolventes apróticos polares puede ser beneficioso para mejorar el rendimiento global, así como para reducir el tiempo de ciclodeshidratación. Se ha indicado que varios disolventes apróticos polares, incluidos dimetilformamida, dimetilacetamida, acetonitrilo, N-metilpirrolidona, dimetilsulfóxido y sulfonato, son útiles. El disolvente aprótico polar más útil es dimetilformamida.
- 15 La incorporación de ciertas sales de amina en lugar de disolventes apróticos puede ser aún más beneficiosa para la formación de maleimida según la patente US 5,973,166.

También se ha descrito la síntesis de maleimida asistida por microondas en una sola etapa a partir de anhídrido maleico y una amina adecuada sin utilizar disolventes (H. N. Borah, *et al.*, J. Chem. Research (S), 1998, 272-272).

20 En ARKIVOC 2001 (v) 60-67 por V. Ondrus, *et al.* se ha descrito un ejemplo en el que se utiliza agua como disolvente para la formación de maleimida.

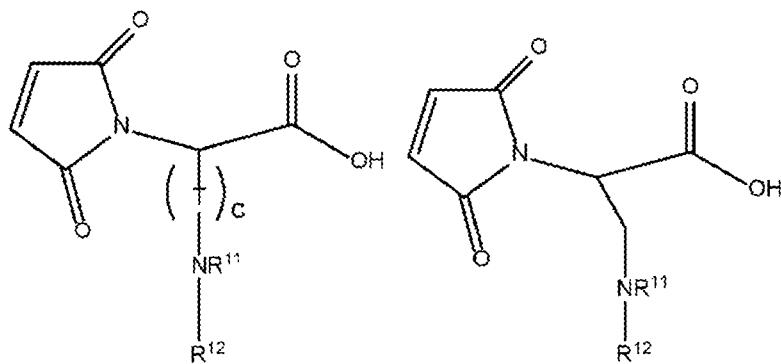
25 Como alternativa, los compuestos de maleimida pueden generarse a partir de maleimida y un alcohol apropiado usando, por ejemplo, condiciones de reacción de Mitsunobu según el esquema siguiente (M.A. Walker, Tetrahedron Letters, 1994, v. 35, n 5, págs. 665-668).



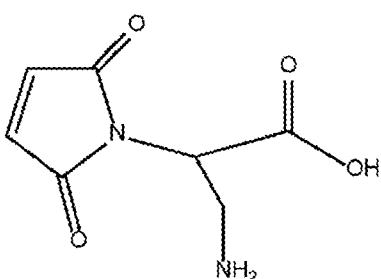
- 30 El conjunto de enlace autoestabilizante de la presente invención está unido a la unidad de Extensión, la unidad Escindible, la unidad Espaciadora o la unidad de Fármaco utilizando las enseñanzas descritas en el presente documento en combinación con métodos conocidos en la materia. Los enlaces y los fármaco-enlaces se conjugan con las unidades de Ligando utilizando las enseñanzas descritas en el presente documento en combinación con métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, para la conjugación con disulfuros intercatenarios, un anticuerpo
- 35 puede tratarse con un agente reductor, tal como ditiotreitol (DTT) para reducir todos o parte de los restos disulfuro de cisteína intercatenarios para formar grupos tiol de cisteína fuertemente nucleofílicos. El anticuerpo totalmente reducido o el anticuerpo parcialmente reducido puede conjugarse posteriormente con la maleimida de la Unidad Enlazadora. En realizaciones ilustrativas, las condiciones de conjugación son suaves, pH de aproximadamente 7 y una temperatura de aproximadamente 22 °C.
- 40

#### Productos intermedios

- La presente invención proporciona productos intermedios para su uso en la elaboración de Enlaces Autoestabilizantes. Los productos intermedios incluyen los siguientes, en donde T, c, R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> son como se han descrito anteriormente.
- 45



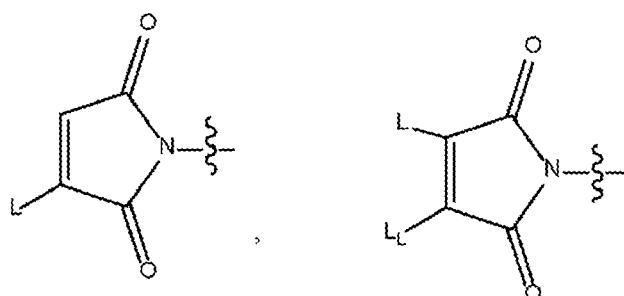
y

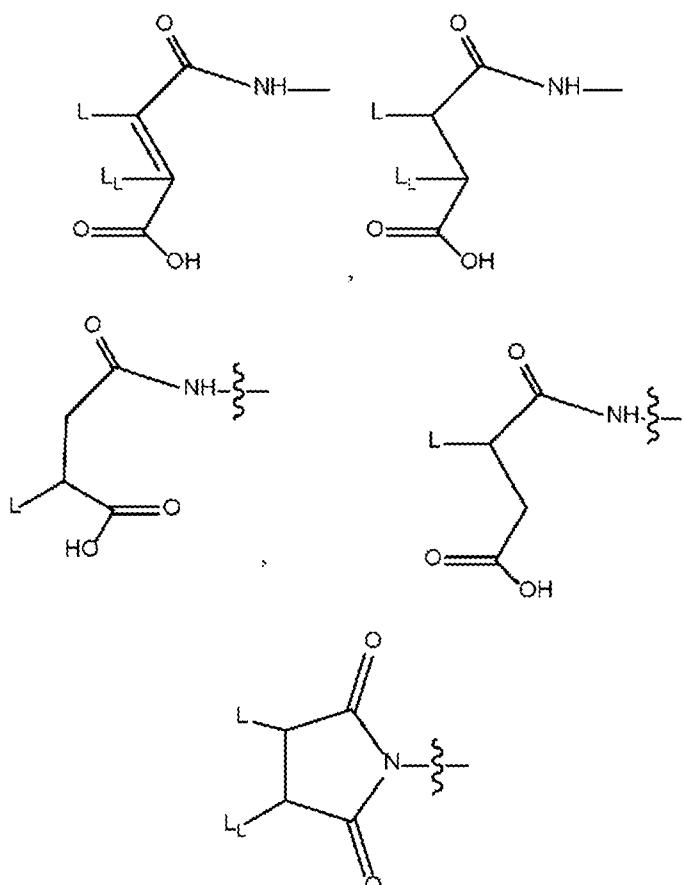
**Enlaces autoestabilizantes de maleimida o succinimida mono-tio-sustituida o di-tio-sustituida**

Además de diseñar enlazadores autoestabilizantes para aumentar la velocidad de hidrólisis de las succinimidas monotio-sustituidas, también pueden utilizarse enlazadores autoestabilizantes para aumentar la velocidad de hidrólisis de maleimidas monotio-sustituidas, maleimidas di-tio-sustituidas o succinimidas di-tio-sustituidas.

- 5 En vista de lo anterior, un Conjugado de Ligando-Agente Funcional puede comprender una Unidad de Ligando y al menos un Agente Funcional seleccionado entre una Unidad de Fármaco, una Unidad de Detección o una Unidad de Estabilidad, en donde la unidad de Ligando y cada uno del o los Agentes Funcionales están unidos por un conjunto enlazador autoestabilizante que comprende un anillo de succinimida, un anillo de maleimida, un anillo de succinimida hidrolizada o un anillo de maleimida hidrolizada, en donde el anillo de succinimida, el anillo de maleimida, el anillo de succinimida hidrolizada o el anillo de maleimida hidrolizada se conjuga directamente con la Unidad de Ligando mediante uno o dos enlaces tioéter; y una base y un grupo aceptor de electrones unidos operablemente para estabilizar el conjugado en plasma en relación con un Conjugado de Ligando-Agente Funcional que carezca del conjunto enlazador autoestabilizante (es decir, aumentando la velocidad de hidrólisis del anillo de succinimida o maleimida). En algunos aspectos, el grupo aceptor de electrones se coloca para aumentar la electrofilia de la succinimida o maleimida, haciéndola más reactiva con el agua, y la base se coloca para ayudar a la hidrólisis del anillo de succinimida o maleimida (por ejemplo, mediante un mecanismo de catálisis intramolecular de la base).
- 10
- 15
- 20
- El anillo de maleimida puede conjugarse con la Unidad DE Ligando mediante uno o dos enlaces tioéter, como se ilustra a continuación, tanto en forma no hidrolizada como hidrolizada, y el anillo de succinimida puede conjugarse con la Unidad DE Ligando mediante dos enlaces tioéter, como se ilustra a continuación, tanto en forma no hidrolizada como hidrolizada, en donde la línea ondulada indica el punto de unión con el resto del conjugado enlazador o del conjugado enlazador-agente funcional:

25





En realizaciones en donde el anillo de maleimida, maleimida hidrolizada, anillo de succinimida o succinimida hidrolizada se conjuga con el Ligando mediante dos enlaces tioéter, p normalmente oscila entre 1 y 10, o 1 y 8, o 1 y 4, y la maleimida o succinimida puede conjugarse con la misma o diferentes cadenas polipeptídicas del Ligando. En algunos aspectos, el Ligando es un anticuerpo. En otros aspectos, el Ligando es una proteína no anticuerpo.

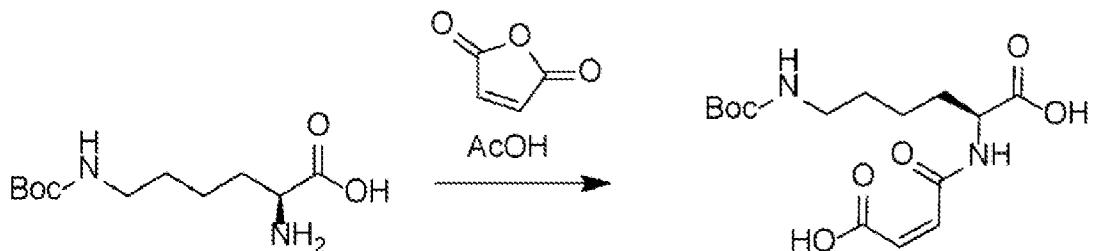
5

Los métodos para preparar halomaleimidas mono-tiosustituidas o di-tiosustituidas, así como succinimidas ditiosustituidas, son conocidos en la materia, al igual que los métodos para conjugarlas con ligandos, véase, por ejemplo, Ryan *et al.*, Chem. Commun., 2011, 47, 5452-5454 y Smith *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2010, 132(6), 1960-1965.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1 - Síntesis de componentes autoestabilizantes representativos

15

**Maleil-Lisina(boc)OH**

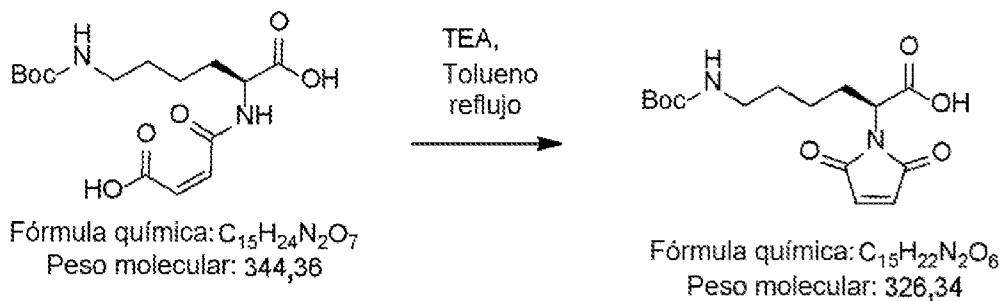
Fórmula química: C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
Peso molecular: 246,30

Fórmula química: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>  
Peso molecular: 344,36

- En un matraz de fondo redondo de 50 ml se disolvieron H-Lys(boc)-OH (246 mg, 1 mmol) y anhídrido maleico (98 mg, 1 mmol) en 1 ml (4 vol.) de ácido acético y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta obtener un aceite en el evaporador rotatorio y el producto se precipitó añadiendo ~ 10 ml de diclorometano. El precipitado se recogió por filtración al vacío, se lavó con diclorometano y se secó durante la noche en la estufa de vacío. Se recuperaron 270 mg de producto en forma de polvo blanco (rendimiento del 85 %)
- 5

**Maleoil-Lisina(boc)-OH**

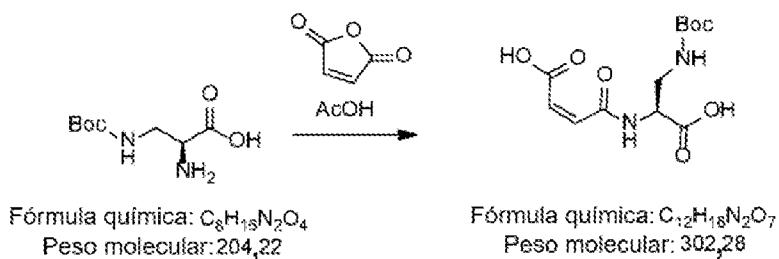
10



Fórmula química: C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>  
Peso molecular: 344,36

Fórmula química: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>  
Peso molecular: 326,34

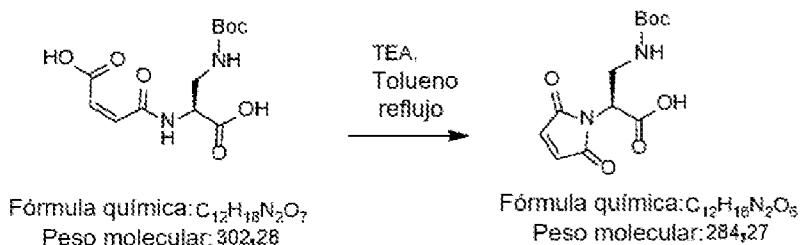
- Se suspendió maleil-Lys(boc)-OH (100 mg, 0,29 mmol) en Tolueno (3 ml) y trietilamina (224 ul) sobre tamices moleculares en un matraz de fondo redondo de 50 ml equipado con un condensador. Se añadió DMA (-150 ul) para favorecer la solubilidad. La solución se calentó a 125 °C y se sometió a reflugio durante 4 horas, tras lo cual mediante LCMS se demostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad en el evaporador rotatorio, se redissolvió en DMSO y se purificó mediante HPLC preparativa. Se aislaron 56 mg de producto como un polvo blanco. (Rendimiento del 60 %)
- 15

**Maleil-DPR(boc)OH**

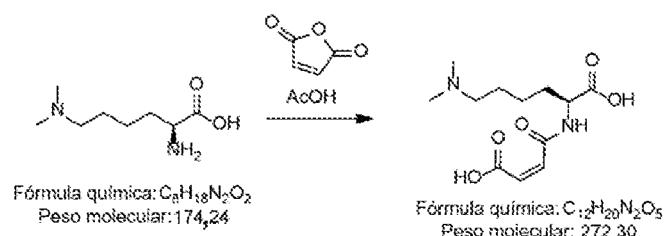
Fórmula química: C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
Peso molecular: 204,22

Fórmula química: C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>  
Peso molecular: 302,28

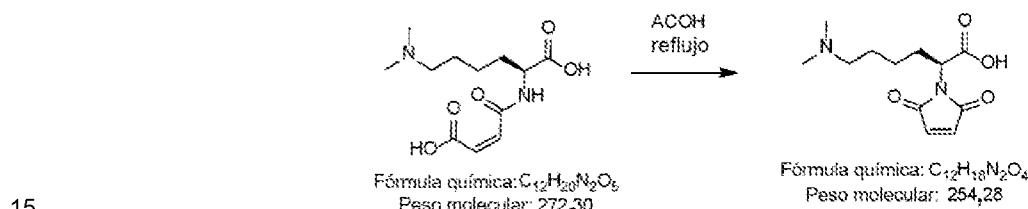
- Se preparó maleil-DPR(boc)-OH de la misma manera que maleil-Lisina(boc)OH. (503 mg, 67 %)
- 25

**Maleoil-DPR(boc)-OH**

Se preparó maleoil-DPR(boc)-OH de la misma manera que maleoil-Lys(boc). (340 mg, 71 %)

**5 Maleil-Dimetil-lisina**

- 10 Se preparó maleil-dimetil-lisina de la misma manera que maleil-lys(boc)-OH, con la excepción de que el producto no precipitó tras la adición de diclorometano. En su lugar, el aceite se coevaporó con diclorometano/ hexano 1:1 hasta obtener una espuma blanca y se secó en alto vacío durante una noche. (109 mg, 99 %)

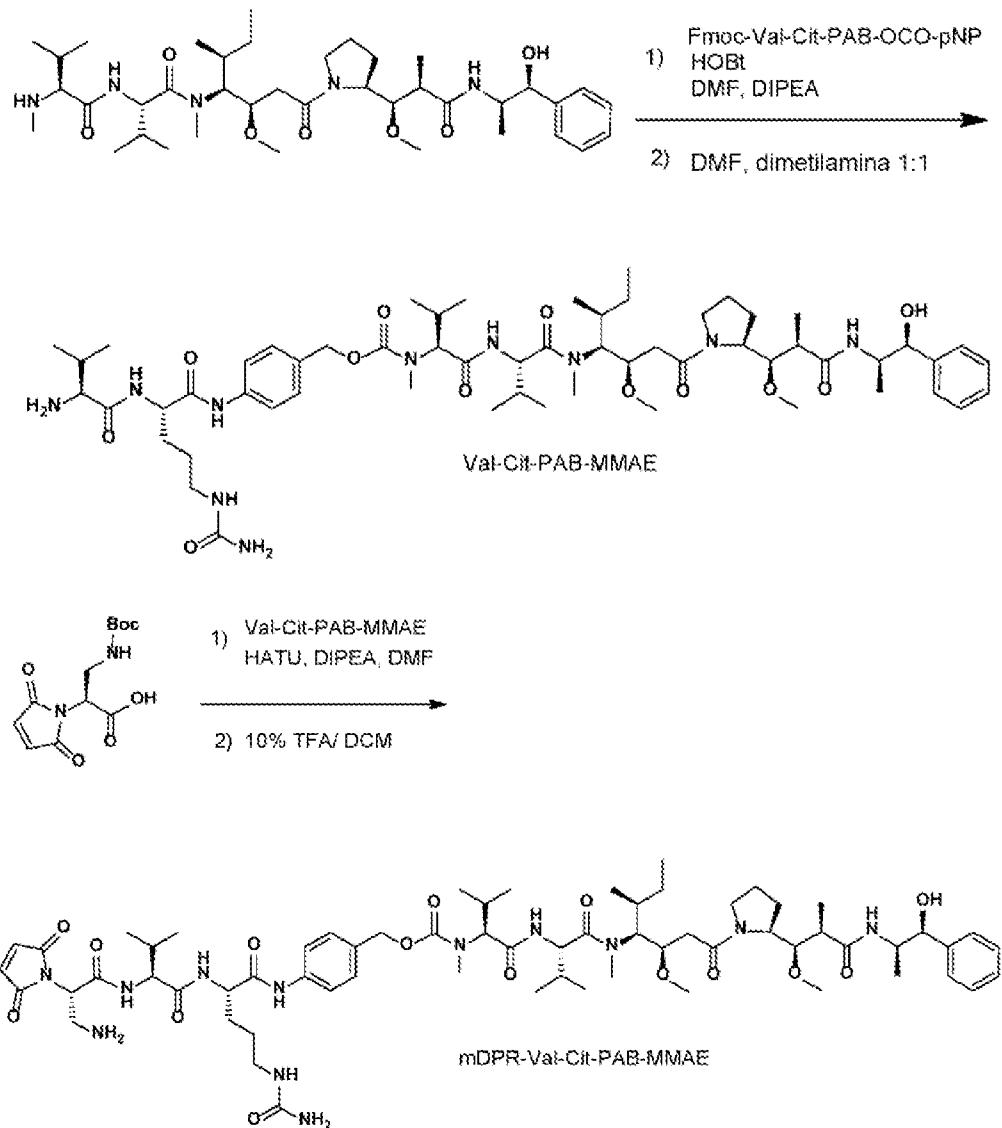
**Maleoil-dimetil-lisina**

- 15 En un matraz de fondo redondo de 10 ml se disolvió maleil-dimetil-lisina (100 mg) en ácido acético (1 ml) y se sometió a refluxo durante 4 horas. Después de 4 horas, la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad en el evaporador rotatorio y se secó hasta obtener una espuma blanca en alto vacío. La RMN del material bruto muestra una conversión del -80 % basada en la relación entre el singlete a 6,9 ppm y los protones olefínicos del material de partida.

**Ejemplo 2 - Síntesis de mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE**

- 25 Se preparó mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE acoplando mDPR protegido con Boc a Val-Cit-PAB-MMAE utilizando métodos estándar para el acoplamiento de péptidos. El grupo Boc se eliminó en la última etapa.

Esquema:



#### Preparación de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE

- 5 Se cargaron MMAE (5,34 g, 6,94 mmol), Fmoc-Val-Cit-PAB-OCO-pNP (5,0 g, 6,94 mmol) y HOBr (1,4 mmol) en un matraz de fondo redondo de 250 ml purgado con N<sub>2</sub> y se disolvieron en 15 ml de DMA. A continuación, se añadió DIPEA (2,44 ml, 14 mmol) y la solución se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente en atmósfera inerte. El producto se aisló mediante HPLC preparativa, utilizando un gradiente lineal del 30 % de MeCN (0,05 % de TFA) al 100 % de MeCN (0,05 % de TFA) durante 40 minutos. Las fracciones que contenían producto se concentraron en el evaporador rotatorio hasta obtener un polvo blanco, obteniéndose 3,2 g (34 %)

#### Preparación de Val-Cit-PAB-MMAE

- 15 Una solución de 3,2 g de Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE en 7 ml de DMF y 7 ml de dietilamina se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se concentró en el evaporador rotatorio hasta obtener un aceite espeso. El producto se precipitó en éter dietílico (100 ml) y se filtró obteniéndose 2,0 g de producto en forma de polvo blanquecino que se utilizó sin purificación adicional.

#### Preparación de mDPR (boc)Val-Cit-PAB-MMAE

- 20 En un matraz de fondo redondo de 50 ml, se disolvieron mDPR(boc)-OH (25 mg, 0,089 mmol), Val-Cit-PAB-MMAE

(100 mg, 0,089 mmol) y HATU (41 mg, 0,107 mmol) en 2 ml de DMF. Se añadió DIPEA (34  $\mu$ l) y la solución se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con 1 ml de DMSO y el producto se aisló mediante HPLC preparativa. (70 mg, 56 %)

5 *Preparación de mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE*

El material anterior se disolvió en 2 ml de TFA al 10 %/dclorometano y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad, se reconstituyó en 1 ml de DMSO y se purificó mediante HPLC preparativa. (56 mg, 86 %)

10

Ejemplo 3 - Control de la hidrólisis de la tiosuccinimida

La hidrólisis por tiosuccinimida de un bioconjuguado autoestabilizante puede monitorizarse mediante espectrometría de masas por electropulverización, ya que la adición de agua al conjugado da como resultado un aumento de 18 Dalton al peso molecular observable del conjugado. Cuando se prepara un conjugado reduciendo completamente los disulfuros intercatenarios de un anticuerpo IgG1 humano y conjugando la maleimida con las cisteínas resultantes, cada cadena ligera del anticuerpo contendrá una única modificación maleimídica y cada cadena pesada contendrá tres modificaciones maleimídicas (véase la Figura 1, arriba). Tras la hidrólisis completa de las tiosuccinimidas resultantes, la masa de la cadena ligera aumentará por tanto en 18 Dalton, mientras que la masa de la cadena pesada aumentará en 54 Dalton. Esto se ilustra en la figura 1 (abajo), con la conjugación y posterior hidrólisis de un enlazador maleimídico autoestabilizante de la presente invención (mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE, peso molecular 1289 Da) al anticuerpo anti-CD30 cAC10 totalmente reducido. La presencia del único sitio de glicosilación ligado al N en la cadena pesada da lugar a la heterogeneidad de masas observada en el anticuerpo no conjugado.

25 Ejemplo 4 - Control de la hidrólisis 11/2

Monitorizando las intensidades de los picos no hidrolizados e hidrolizados en el espectro de masas de un bioconjuguado autoestabilizante a lo largo del tiempo (mDPR-Val-Cit-PAB-MMAE), se puede evaluar la cinética de hidrólisis. Para ello, se traza el porcentaje de la población total que se ha hidrolizado en cada punto de tiempo en función del tiempo (Figura 2, arriba). A continuación, estos datos se ajustan a la ecuación exponencial

$$Y = Y_{\max} \times (1 - e^{(-Kt)})$$

35 donde Y es el porcentaje de hidrólisis observado en el tiempo t,  $Y_{\max}$  es el % de hidrólisis máxima asintótica y K es la constante de velocidad de hidrólisis. La semivida de la reacción de hidrólisis se define como

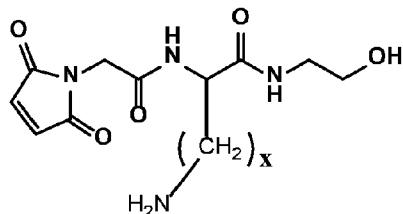
$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{K}$$

40 Cuando este procedimiento se realiza en la cadena ligera de un anticuerpo hlgG1 reducido, el análisis es bastante sencillo ya que sólo hay un sitio de conjugación por cadena ligera y la reacción es una simple progresión de la especie no hidrolizada a la especie hidrolizada con un cambio de masa de 18 Dalton. Realizar este análisis en la cadena pesada se complica por el hecho de que hay un total de tres sitios de conjugación, dando lugar a una serie de picos de +18, +36, y +54 Dalton cuando el conjugado sufre hidrólisis. El análisis de la cadena pesada se complica aún más 45 por la presencia de múltiples glicoformas. El análisis presentado en la Figura 2 se realizó evaluando únicamente los picos derivados de la glicoforma más abundante (la transición de 54195 Da a 54250 Da) y asumiendo que estos picos son un sustituto razonable de toda la población de glicoformas de cadena pesada. Como se aprecia en la figura 2, los perfiles cinéticos observados para las cadenas ligeras y pesadas son muy similares. Por esta razón, y debido a las complejidades añadidas de cuantificar las velocidades de hidrólisis en la cadena pesada señaladas anteriormente, la 50 mayoría de los datos para caracterizar las velocidades de hidrólisis de las maleimidas autoestabilizantes conjugadas con anticuerpos se determinaron a partir de la evaluación de la hidrólisis de la cadena ligera.

Una limitación de esta metodología es que el proceso de ionización por electropulverización tiende a producir una pequeña proporción de aductos de sodio en los picos observados (aproximadamente el 10 % en las condiciones utilizadas para generar los datos de la Figura 2), que tienen una masa observada 22 Dalton mayor que la masa parental. Muchos espectrómetros de masas no tienen la resolución suficiente para distinguir esta masa +22 de la masa +18 resultante de la hidrólisis de una proteína con una masa molecular total superior a 25.000 dalton. Por consiguiente, en los primeros momentos, cuando el grado de hidrólisis es bajo, la aparición de un pico a aproximadamente +20 Dalton es una combinación de estos dos efectos que no pueden separarse fácilmente de forma experimental. Como resultado, la estimación del porcentaje de producto hidrolizado en los primeros puntos de tiempo es probablemente 60 una sobreestimación, pero la magnitud de este efecto disminuye a medida que la reacción avanza hacia su finalización

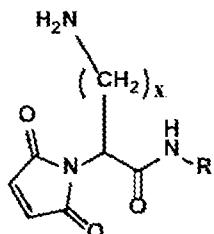
Ejemplo 5 - Evaluación del espaciado entre la maleimida y el grupo básico del conjunto enlazador autoestabilizante

Se planteó la hipótesis de que la presencia de un grupo amino básico adyacente a la maleimida aceleraría la hidrólisis de las tiosuccinimidas preparadas con esas maleimidas y, por tanto, daría lugar a bioconjungados estables. La distancia entre la maleimida y el grupo amino básico se reconoció como un parámetro importante en el diseño de tales unidades autoestabilizantes. Para evaluar el papel de este espaciado, se preparó una serie de maleimidas con la estructura general



donde  $x$  variaba de 1 a 4. A continuación, estas maleimidas se conjugaron con una IgG1 humana totalmente reducida a pH8 y 37 °C y se controlaron inmediatamente mediante espectrometría de masas por electropulverización para determinar la velocidad de hidrólisis. La distancia entre el grupo básico y la maleimida es inversamente proporcional a la velocidad de hidrólisis, es decir, cuanto mayor sea la distancia, más lenta será la hidrólisis. Este resultado ilustra que la colocación de un grupo amino básico cerca de una maleimida da como resultado un aumento de la velocidad de hidrólisis del anillo de succinimida de los bioconjungados preparados con la maleimida. Sin embargo, incluso con el espaciado más corto probado aquí ( $x=1$ ), un conjugado de anticuerpo tendría que mantenerse a pH 8 y 37 °C durante aproximadamente 5 horas para lograr una hidrólisis completa (aproximadamente 5 semividas). La exposición de un anticuerpo u otra proteína a tales condiciones durante períodos prolongados puede dar como resultado modificaciones covalentes y mal plegamiento, por lo que se buscaron maleimidas con velocidades de hidrólisis aún más rápidas.

Para preparar bioconjungados con velocidades de hidrólisis más rápidas, se preparó una serie de maleimidas con la estructura general



donde  $x = 1$  a 4 y  $R = \text{val-cit-PAB-MMAE}$ . A continuación, estas maleimidas se conjugaron con una IgG1 humana totalmente reducida a pH8 y 37 °C y se controlaron inmediatamente mediante espectrometría de masas por electropulverización para determinar la velocidad de hidrólisis. Como se muestra en la figura 4 (arriba), la distancia entre el grupo básico y la maleimida dentro de esta serie de compuestos estructuralmente relacionados ejerce una profunda influencia en el progreso de la reacción de hidrólisis. Como en el ejemplo anterior, cuando más corta es la distancia entre la maleimida y la amina básica, más rápida será la hidrólisis. Puesto que se sabe que las condiciones básicas (es decir, un pH elevado) aumentan la velocidad de hidrólisis de los anillos de maleimida y succinimida, este efecto es, presumiblemente, un ejemplo de catálisis intramolecular por un mecanismo de base general. Dentro de esta serie, los compuestos con  $x=2$  y  $x=3$  no alcanzaron la hidrólisis completa durante las 3 horas de incubación, en lugar de alcanzar una asíntota aproximadamente al 80 % y al 50 %, respectivamente (los gráficos están normalizados con respecto a la hidrólisis máxima alcanzada). Este fenómeno puede deberse a una reacción competitiva, como el ataque nucleofílico directo de la amina primaria en el anillo de succinimida o puede deberse a una impureza isomérica en la maleimida que da lugar a una cinética de hidrólisis bifásica.

Ejemplo 6 - Cinética de hidrólisis

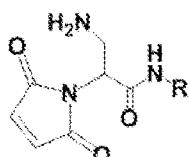
Los ejemplos anteriores ilustran la influencia que puede tener un grupo básico sobre la velocidad de hidrólisis del anillo de succinimida en un bioconjungado, dependiendo de la distancia entre el grupo básico y la maleimida de la molécula precursora. Sin embargo, se espera que la presencia de grupos aceptores o donadores de electrones también influya en la velocidad de hidrólisis del anillo, ya que estos grupos influirán en la densidad electrónica (y, por tanto, en la electrofilia) en los carbonos carbonilo del anillo. En los conjugados del ejemplo 5, un grupo carboxamida está presente en posición alfa con respecto al nitrógeno del anillo (es decir, un único átomo de carbono está presente entre el nitrógeno del anillo y el carbono carbonilo de la carboxamida). Dado que la carboxamida es un grupo débil acceptor de electrones, es probable que su presencia influya en las velocidades de hidrólisis observadas. Para comprender mejor las contribuciones relativas del grupo amino básico y del grupo carboxamida acceptor de electrones, a las velocidades

de hidrólisis observadas, se conjugaron una serie de maleimidas con un anticuerpo IgG1 humano reducido a pH 7,4, 22 °C y se determinaron las velocidades de hidrólisis mediante espectrometría de masas (Figura 5). Estas maleimidas sólo contenían la carboxamida en posición alfa (triángulos), sólo la amina primaria en posición beta (triángulos invertidos), o tanto la carboxamida como la amina primaria (círculos). También se evaluó una maleimida de control que no contenía ninguno de los grupos próximos a la maleimida, aunque su hidrólisis es tan lenta que no se observó ninguna reacción en estas condiciones y no se representan datos. En estas condiciones, la maleimida autoestabilizante, que contiene tanto la base como el grupo aceptor de electrones, produjo un bioconjunto con una hidrólisis  $t_{1/2}$  de sólo 12 minutos, mientras que la maleimida que sólo contenía la amina produjo un  $t_{1/2}$  de 2,5 horas, y la maleimida que sólo contenía la carboxamida produjo un  $t_{1/2}$  de 24 horas. Este resultado indica que el grupo básico y el grupo aceptor de electrones actúan conjuntamente para producir un conjugado con una cinética de hidrólisis muy rápida, que es la más conveniente para la fabricación de bioconjuntos en las condiciones suaves deseables. Los conjugados preparados con la diaminopropionil maleimida (círculos) presentan unas características de hidrólisis ideales, con un  $t_{1/2}$  inferior a 15 minutos en condiciones muy suaves y la reacción se acerca al 100 % de finalización en aproximadamente 2 horas.

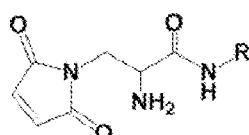
**Ejemplo 7 - Evaluación del espaciado entre el grupo maleimida y el grupo carboxamida del conjunto enlazador autoestabilizante**

La rápida y completa hidrólisis de la succinimida observada en los conjugados preparados con el ácido autoestabilizante diaminopropionil maleimido fármaco-enlazador (DPR) mostrados en los ejemplos 5 y 6 anteriores indica la importancia tanto del grupo básico como del grupo aceptor de electrones para el diseño. Se preparó un segundo enlazador-fármaco maleimido isomérico con ácido diaminopropiónico para evaluar además el papel de estos dos componentes en el comportamiento de hidrólisis de los conjugados resultantes. Las estructuras se denominan  $\alpha$ -maleimido DPR y  $\beta$ -maleimido DPR y se muestran a continuación.

25



$\alpha$ -maleimido DPR



$\beta$ -maleimido DPR

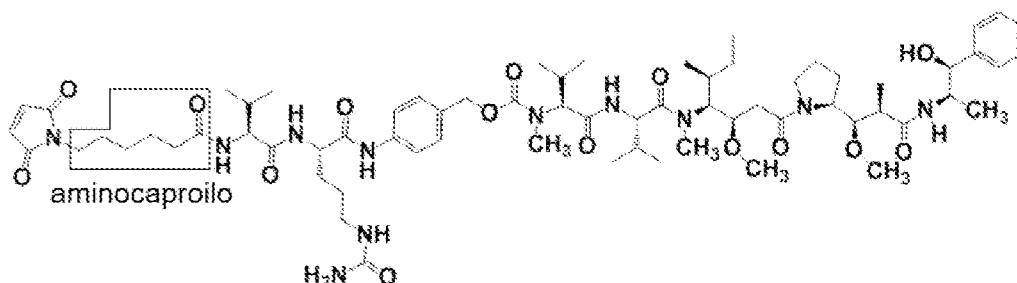
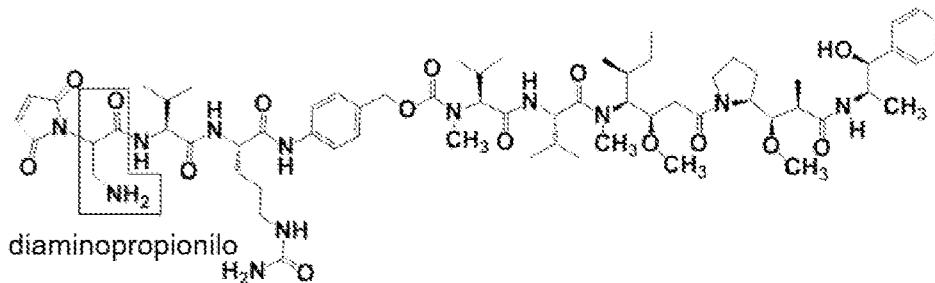
R = val-cit-PAB-MMAE

Ambas maleimidas DPR poseen una amina primaria básica que está separada del nitrógeno maleimido por dos átomos de carbono. Ambas poseen también un grupo carboxamida aceptor de electrones, sin embargo la distancia del nitrógeno maleimido a la carboxamida varía de 1 a 2 unidades de carbono ( $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente). Por último, la separación entre la amina básica y la carboxamida también varía de 1 a 2 unidades de carbono ( $\beta$  y  $\alpha$ , respectivamente). En conjunto, esto significa que en la  $\beta$ -DPR, la carboxamida ejerce menos influencia de acepción de electrones sobre el anillo de maleimida pero más influencia de acepción de electrones sobre la amina primaria, en relación con la  $\alpha$ -DPR. Se espera que esto ralentice la velocidad de hidrólisis al reducir tanto la electrofilia de la maleimida como la basicidad de la amina primaria. Cuando estos enlazadores-fármaco maleimido se conjugaron con anticuerpos reducidos y se controló la hidrólisis de la succinimida, se observó una velocidad de hidrólisis 17 veces menor para la  $\beta$ -DPR en relación con la  $\alpha$ -DPR (Figura 6). Este ejemplo ilustra cómo la posición relativa de un grupo básico y de un grupo aceptor de electrones puede utilizarse para "sintonizar" la velocidad de hidrólisis.

40 **Ejemplos 8-15**

Para evaluar la estabilidad y la actividad farmacológica de los CAF preparados con enlazadores-fármaco autoestabilizantes, se preparó un enlazador-fármaco maleimido autoestabilizante. Este enlazador-fármaco contiene el grupo maleimido-DPR acoplado al agente citotóxico MMAE a través de un grupo autoinmolable val-cit PAB escindible por proteasa (denominado en el presente documento maleimido-DPR-val-cit-PAB-MMAE). A modo de comparación, se utilizó un fármaco-enlazador no autoestabilizante (denominado en el presente documento maleimido-caproil-val-cit-PAB-MMAE). La única diferencia entre estos agentes es la unidad entre la maleimida y el grupo valina del enlazador val-cit. Las unidades de maleimida de estos fármaco-enlazadores pueden prepararse utilizando anhídrido maleico y ácido diaminopropiónico y aminocaproico monoprotegidos, respectivamente.

50



#### Ejemplo 8 - Evaluación de la estabilidad de los conjugados de Ligando-Fármaco en tampón

- 5 En los sistemas tampón estándar, la eliminación de maleimida de un bioconjugado preparado mediante química tiol-maleimida es esencialmente indetectable porque la maleimida eliminada reacciona rápidamente de nuevo con el tiol, dando como resultado un equilibrio que se encuentra muy hacia el lado del conjugado intacto. Sin embargo, la adición de un secuestrante de tioles al tampón crea un sistema en el que la maleimida que se elimina del bioconjugado puede reaccionar en su lugar con el secuestrante, dando como resultado una pérdida observable persistente de la maleimida de la proteína. Se realizó un experimento utilizando un sistema de este tipo con conjugados de anticuerpo-fármaco preparados con un enlazador de fármaco maleimido diaminopropionil (DPR) autoestabilizante junto con un enlazador de fármaco caproil no estabilizante. Se prepararon CAF con 8 fármacos por anticuerpo de maleimido-DPR-val-cit-PAB-MMAE o maleimido-caproil-val-cit-PAB-MMAE utilizando una IgG1 humanizada totalmente reducida. La carga de fármaco se confirmó mediante HPLC en fase inversa en una columna polimérica PLRP-S, tal como se ha descrito previamente (Sun 2005). La hidrólisis completa de la succinimida del enlazador autoestabilizante también se confirmó mediante espectrometría de masas por electropulverización. Estos CAF se colocaron en tampón Tris 150 mM, pH 8, a 2,5 mg/ml, que contiene 10 mM de N-acetilcisteína como secuestrante, y se incubaron durante 2 semanas a 37 °C. En siete puntos de tiempo durante la incubación, se extrajo una alícuota de cada CAF y se congeló a -80 °C. Una vez finalizado el curso temporal, todas las muestras se analizaron mediante el método de HPLC en fase inversa mencionado anteriormente para determinar la proporción fármaco:anticuerpos. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 7. El CAF preparado con el enlazador-fármaco DPR maleimido autoestabilizante mostró una pérdida mínima de fármaco a lo largo del tiempo (de 8,0 a 7,9 fármacos por anticuerpo a lo largo de 14 días), mientras que el CAF preparado con el fármaco-enlazador de caproil maleimido perdió aproximadamente la mitad de su carga de fármaco (de 8,0 a 3,9 fármacos por anticuerpo a lo largo de 14 días) en estas condiciones.
- 25

#### Ejemplo 9 - Estabilidad plasmática ex vivo (método de fase inversa)

- La evaluación de la carga de fármaco de los CAF humanizados en muestras de plasma no humano mediante el método de HPLC de fase inversa descrito en el Ejemplo 8 puede lograrse aislando primero los CAF con resina IgSelect (GE Healthcare), que se une selectivamente al dominio Fc humano. Se prepararon CAF con 8 fármacos por anticuerpo de maleimido-DPR-val-cit-PAB-MMAE o maleimido-caproil-val-cit-PAB-MMAE utilizando una IgG1 humana totalmente reducida. Estos CAF (0,25 mg/ml) se incubaron en plasma estéril de rata durante 7 días a 37 °C. En siete puntos de tiempo durante la incubación, se extrajo una alícuota de 50 µl de cada CAF y se congeló a -80 °C. Una vez finalizado el tiempo, los CAF se purificaron a partir de cada muestra y se analizaron mediante HPLC de fase inversa para determinar la proporción fármaco:anticuerpos. Los resultados de este estudio se representan en la Figura 8. Como se observó en el tampón, la incubación de un CAF preparado con una maleimida autoestabilizante en plasma de rata también da lugar a una pérdida de fármaco poco o nada observable en condiciones que dan lugar a la pérdida de aproximadamente la mitad del fármaco de un CAF maleimido-caproil.
- 30
- 35

#### Ejemplo 10 - Estabilidad plasmática ex vivo (método del fármaco conjugado)

Se utilizó un segundo formato de ensayo para evaluar la estabilidad del CAF en plasma humano y de rata ex vivo. Se prepararon CAF con 4 fármacos por anticuerpo de maleimido-DPR-val-cit-PAB-MMAE o maleimido-caproil-val-cit-

PAB-MMAE utilizando una IgG1 humana parcialmente reducida a un nivel de 4 tioles por anticuerpo (resultando en un CAF con 4 fármacos por anticuerpo). Estos dos CAF se introdujeron en plasma humano y de rata y se incubaron a 37 °C durante 7 días. En siete puntos de tiempo durante esta incubación, se extrajeron alícuotas y se congelaron a -80 °C hasta la finalización del curso temporal. A continuación, se aislaron los CAF de cada muestra y se liberó MMAE proteolíticamente de los CAF aislados como se ha descrito previamente (Sanderson 2005). A continuación, se cuantificó la MMAE liberada mediante LC-MS/MS y se normalizó con respecto al valor inicial de cada CAF (Figura 9). En plasma humano y de rata, el CAF preparado con una maleimida autoestabilizante perdió poco o nada de fármaco en estas condiciones, mientras que en un CAF de maleimido-caproil se perdía aproximadamente la mitad del fármaco.

#### 10 Ejemplo 11 - Estabilidad *in vivo*

Como se ha descrito en el Ejemplo 10 anterior, la proporción de fármaco:anticuerpos se puede medir para los CAF en plasma de rata mediante análisis HPLC en fase inversa tras purificación con resina IgSelect. Este método se aplicó a muestras procedentes de un experimento farmacocinético *in vivo* en ratas. Se prepararon CAF con 4 fármacos por anticuerpo de maleimido-DPR-val-cit-PAB-MMAE o maleimido-caproil-val-cit-PAB-MMAE utilizando una IgG1 humanizada parcialmente reducida a un promedio de 4 tioles por anticuerpo (resultando una proporción de fármaco:anticuerpos de 4). Estos CAF se purificaron posteriormente como se ha descrito previamente (Sanderson 2005) mediante cromatografía de interacción hidrofóbica para aislar las especies que contienen 4 fármacos por anticuerpo. Estos CAF se dosificaron por vía intravenosa a 10 mg/kg en ratas Sprague-Dawley. En cinco puntos de tiempo, se sacrificaron tres animales de cada grupo de dosificación y la sangre recogida se procesó para obtener plasma y se congeló a -80 °C. Una vez finalizado el estudio, todas las muestras se procesaron mediante el método de resina IgSelect descrito anteriormente, excepto que el volumen de la muestra varió. La proporción fármaco:anticuerpos en cada punto de tiempo de este estudio se representa en la figura 10. Como se observó en el plasma de rata *ex vivo*, el CAF preparado con una maleimida autoestabilizante presenta una pérdida mínima de fármaco *in vivo*, pasando de un valor inicial de 4,1 fármacos por anticuerpo a un valor de 3,6 fármacos por anticuerpo (reducción del 12 %) al cabo de 7 días. Durante este mismo periodo de tiempo, la proporción de fármaco:anticuerpos de un CAF preparado con un enlazador maleimido-caproil descendió de un valor inicial de 3,9 a un valor de 1,5 (reducción del 61 %). Esto ilustra que el aumento de la estabilidad de un fármaco-enlazador autoestabilizante que se observa *ex vivo* se traslada a un entorno *in vivo*.

#### 30 Ejemplo 12: Farmacocinética

Dado que los CAF de maleimido-caproil son propensos a la pérdida de fármaco por eliminación de maleimida, mientras que los CAF de maleimida autoestabilizante no lo son, es razonable predecir que la exposición al fármaco conjugado con anticuerpos será mayor tras dosis equivalentes de los dos CAF. Para confirmar esta predicción, se prepararon CAF con 4 fármacos por anticuerpo de maleimido-DPR-val-cit-PAB-MMAE o maleimido-caproil-val-cit-PAB-MMAE utilizando una IgG1 humana parcialmente reducida a un promedio de 4 tioles por anticuerpo (resultando una proporción fármaco:anticuerpos de 4). Estos dos CAF se dosificaron a 2 mg/kg en ratas Sprague-Dawley y se tomaron muestras de sangre en siete puntos de tiempo que se procesaron para obtener plasma. Estas muestras de plasma, junto con los estándares de cada CAF para la preparación de una curva de calibración, se sometieron al procedimiento de captura en resina mAb Select y liberación de papaína descrito en el ejemplo 10 anterior para medir la concentración de MMAE conjugado con anticuerpos. Las concentraciones del fármaco conjugado con el anticuerpo fueron mayores para el CAF preparado con el enlazador-fármaco autoestabilizante, con la magnitud de la diferencia aumentando con el tiempo (datos no mostrados). Las concentraciones iniciales del fármaco conjugado con anticuerpos son superponibles, lo que refleja la equivalencia de la dosis y la proporción de fármaco-anticuerpos de los CAF. Sin embargo, se observa divergencia en el primer día, alcanzando una diferencia del doble al tercer día. Estas concentraciones más altas dieron lugar a un AUC del fármaco conjugado con anticuerpos aproximadamente un 40 % mayor para el CAF autoestabilizado en relación con el CAF de maleimido-caproil

#### 50 Ejemplo 13 - Toxicología

Para evaluar el impacto de las maleimidas autoestabilizantes en la toxicología, se prepararon CAF con 4 fármacos por anticuerpo de maleimido-DPR-val-cit-PAB-MMAE o maleimido-caproil-val-cit-PAB-MMAE utilizando una IgG1 humanizada (que no tiene unión conocida a ningún antígeno de rata) parcialmente reducida a un promedio de 4 tioles por anticuerpo (resultando una proporción promedio de fármaco:anticuerpos de 4). Estos CAF se dosificaron por vía intravenosa en ratas CD<sup>®</sup>IGS hembra (Charles River Laboratories) a 10 mg/kg (6 ratas por artículo de ensayo más 6 ratas que recibieron sólo vehículo). Antes de la dosis y en 3 momentos después de la dosis, se tomaron muestras de sangre para análisis hematológicos y de química sérica en busca de biomarcadores de toxicidad. La neutropenia inducida por el CAF de MMAE pareció menos grave para el conjugado autoestabilizado que para el CAF maleimido-caproil (datos no mostrados).

#### Ejemplo 14 - Concentración plasmática del fármaco liberado

El experimento toxicológico descrito en el ejemplo 13 anterior también incluyó extracciones de sangre una hora y 24 horas después de la dosis, que junto con las muestras de 4 días y 7 días después de la dosis se analizaron para MMAE no conjugado en plasma por LC-MS/MS. Los resultados de este análisis indicaron que las concentraciones

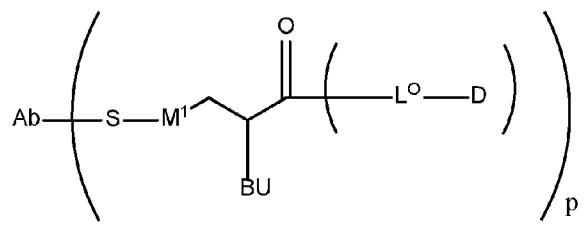
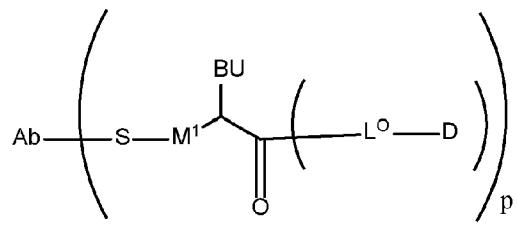
máximas de MMAE circulante son aproximadamente 2 veces menores para el CAF maleimido-DPR-val-cit-PAB-MMAE autoestabilizante en relación con el maleimido-caproil-val-cit-PAB-MMAE (datos no mostrados).

Ejemplo 15. Actividad de xenoinjerto

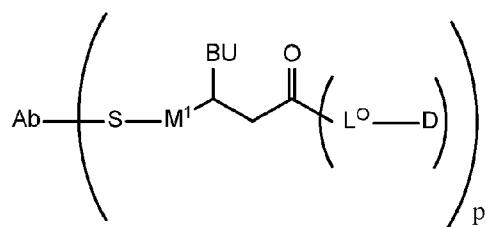
- 5 Para evaluar el impacto del fármaco-enlazador autoestabilizante en la actividad antitumoral de los CAF, se prepararon conjugados con el anticuerpo anti-CD30 cAC10 usando fármaco-enlazadores que contenían la carga útil citotóxica val-cit-PAB-MMAE unida al anticuerpo mediante un grupo maleimido-caproilo o un grupo maleimido-DPR autoestabilizante. Estos CAF se evaluaron en dos modelos murinos distintos de xenoinjertos de neoplasias humanas
- 10 CD30+. En el primer modelo (Figura 11), se implantaron células Karpas-299 (ALCL humano) por vía subcutánea en ratones SCID hembra y se dejó que los tumores alcanzaran un volumen aproximado de 250 mm<sup>3</sup> antes de administrar dosis de 1 mg/kg semanal durante tres dosis (seis ratones por grupo de dosis). Los seis ratones dosificados con el CAF maleimido-caproil experimentaron cierto retraso del crecimiento tumoral en relación con el grupo no tratado, y dos animales experimentaron una reducción parcial del tumor; sin embargo, todos los tumores crecieron y todo el
- 15 grupo fue sacrificado con tumores grandes. El grupo de dosis de CAF autoestabilizante experimentó respuestas completas (sin tumor detectable) en los seis animales, cinco animales experimentaron regresiones duraderas a lo largo del estudio y sólo un animal fue sacrificado tras la reaparición del tumor el día 55 del estudio. Los resultados de este estudio indican una actividad antitumoral *in vivo* significativamente mayor para la CAF preparada con el fármaco-enlazador autoestabilizante. En el segundo modelo, se implantaron células L428 (linfoma de Hodgkin humano) por vía
- 20 subcutánea en ratones NSG hembra y se dejó que los tumores alcanzaran un volumen aproximado de 100 mm<sup>3</sup> antes de administrar dosis de 1 mg/kg cada cuatro días durante cuatro dosis (seis ratones por grupo de dosis). Todos los animales de ambos grupos de dosis de CAF experimentaron un retraso significativo del crecimiento durante el tratamiento, sin embargo, todos los tumores comenzaron a crecer después del día 28 del estudio, sin diferencias significativas entre los CAF maleimido-caproil y los autoestabilizantes. Por lo tanto, la mejora de la actividad antitumoral
- 25 observada con el CAF autoestabilizante en estudios de xenoinjertos parece depender del modelo.

## REIVINDICACIONES

1. Un Conjugado de Ligando-Fármaco que tiene la fórmula:



o

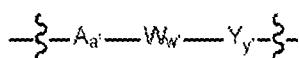


o una sal del mismo, en donde D es una unidad de Fármaco y Ab es un anticuerpo; y en donde:

S es un átomo de azufre del anticuerpo;

- 5 M¹ es un anillo de succinimida o succinimida hidrolizada o junto con UB forma una dilactama resultante de la reacción de la base de UB con el anillo de succinimida;  
UB es una Unidad Básica seleccionada entre el grupo que consiste en  $-(CH_2)_xNH_2$ ,  $-(CH_2)_xNHR^a$  y  $-(CH_2)_xNR^{a_2}$ , en donde x es un número entero de 0-4 y cada R<sup>a</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1-6</sub> y haloalquilo C<sub>1-6</sub> o dos grupos R<sup>a</sup> se combinan con el nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidinilo, pirrolidinilo o piperidinilo, siempre que no haya menos de 2 átomos intermedios entre la base de la unidad Básica y el átomo de nitrógeno de la succinimida (hidrolizada o no hidrolizada) o dilactama;  
10 la unidad de Fármaco es un agente citotóxico;  
el subíndice p oscila entre 1 y 20; y  
L° es un conjunto enlazador secundario opcional que tiene la fórmula:

15

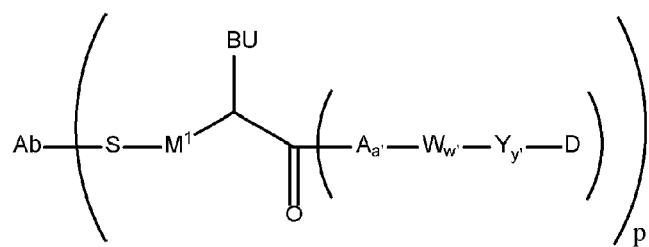


en donde -A- es una unidad de Extensión opcional, el subíndice a' es 0 o 1; -W- es una unidad Escindible opcional, el subíndice w' es 0 o 1; e-Y- es una unidad de Espaciador opcional y el subíndice y' es 0 o 1; y las líneas onduladas indican los puntos de unión al conjunto enlazador autoestabilizante y a la unidad de Fármaco, opcionalmente en donde:

- 20 (i) w' es 1 y W se conjuga directamente con la unidad de Fármaco,  
(ii) w' es 1 y W se conjuga directamente con la unidad Espaciadora,  
(iii) w' es 1 y W se conjuga directamente con la unidad de Fármaco o la unidad Espaciadora mediante un enlace peptídico disulfuro o hidrazina escindible,  
25 (iv) W está ausente o  
(v) W está presente y la unidad Espaciadora y la unidad de Extensión están ausentes.

2. Un Conjugado de Ligando-Fármaco según la reivindicación 1, que es de fórmula:

30

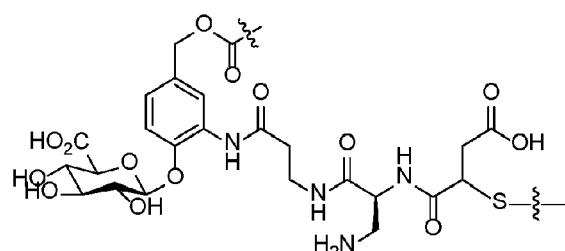


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el subíndice p oscila entre 1 y 12;

- 5 UB es  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$  o  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ; y  $\text{M}^1$  es un anillo de succinimida o un anillo de succinimida hidrolizada y D se selecciona entre el grupo que consiste en auristatinas y pirrolo[1,4]benzodiacepinas (PBD).

3. Un Conjugado de Ligando-Fármaco según la reivindicación 1, que tiene la estructura:

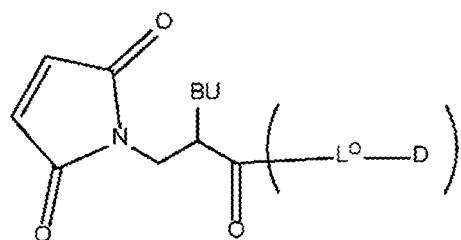
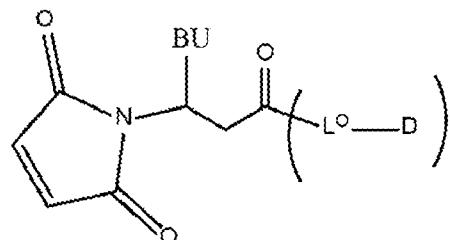
10



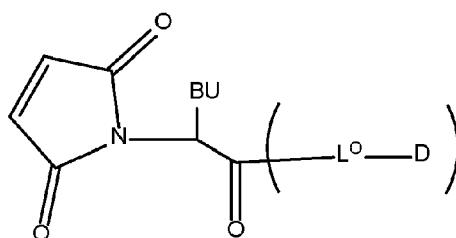
en donde la línea ondulada adyacente al carbonilo indica la unión covalente a la unidad de Fármaco (D), opcionalmente a través de una unidad Espaciadora (Y), y S es un átomo de azufre del anticuerpo (Ab) para la unión covalente de la unidad Enlazadora.

15

4. Un Conjugado de Fármaco-Enlazador que tiene la fórmula:



o



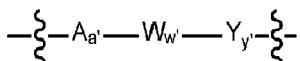
o una sal del mismo, en donde

D es una unidad de Fármaco;

5 UB es una Unidad Básica seleccionada entre el grupo que consiste en  $-(CH_2)_xNH_2$ ,  $-(CH_2)_xNHR^a$  y  $-(CH_2)_xNR^{a_2}$ , en donde x es un número entero de 0-4 y cada R<sup>a</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>1-6</sub> y haloalquilo C<sub>1-6</sub> o dos grupos R<sup>a</sup> se combinan con el nitrógeno al que están unidos para formar un grupo azetidinilo, pirrolidinilo o piperidinilo, siempre que no haya menos de 2 átomos intermedios entre la base de la unidad Básica y el átomo de nitrógeno de la maleimida;

10 La unidad de Fármaco es un agente citotóxico; y

L° es un conjunto enlazador secundario opcional que tiene la fórmula:



15 en donde -A- es una unidad de Extensión opcional, el subíndice a' es 0 o 1; -W- es una unidad Escindible opcional, el subíndice w' es 0 o 1; e-Y- es una unidad de Espaciador opcional y el subíndice y' es 0 o 1; y las líneas onduladas indican los puntos de unión al conjunto enlazador autoestabilizante y a la unidad de Fármaco, opcionalmente en donde:

20 (i) w' es 1 y W se conjuga directamente con la unidad de Fármaco,

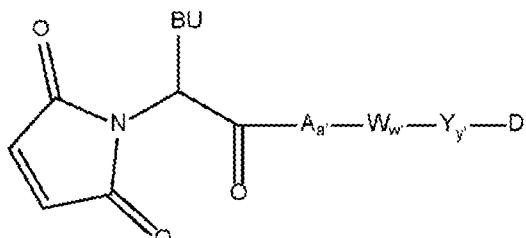
(ii) w' es 1 y W se conjuga directamente con la unidad Espaciadora,

(iii) w' es 1 y W se conjuga directamente con la unidad de Fármaco o la unidad Espaciadora mediante un enlace peptídico disulfuro o hidrazina escindible,

(iv) W está ausente o

(v) W está presente y la unidad Espaciadora y la unidad de Extensión están ausentes.

25 5. Un Conjugado de Fármaco-Enlazador según la reivindicación 4 que tiene la fórmula:



30 o sal del mismo, en donde

UB es  $-CH_2NH_2$ ,  $-CH_2CH_2NH_2$ ,  $-CH_2CH_2CH_2NH_2$  o  $-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$ ; y D se selecciona entre el grupo que consiste en auristatinas y pirrolo[1,4]benzodiacepinas (PBD).

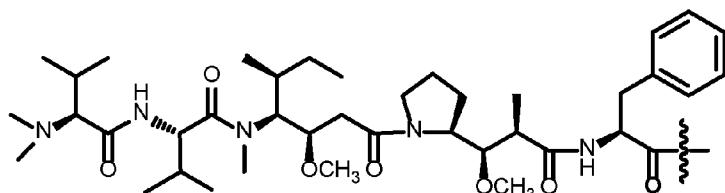
35 6. Un conjugado de Ligando-Fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un Conjugado de Fármaco-Enlazador según la reivindicación 4, en donde D se selecciona entre el grupo que consiste en:

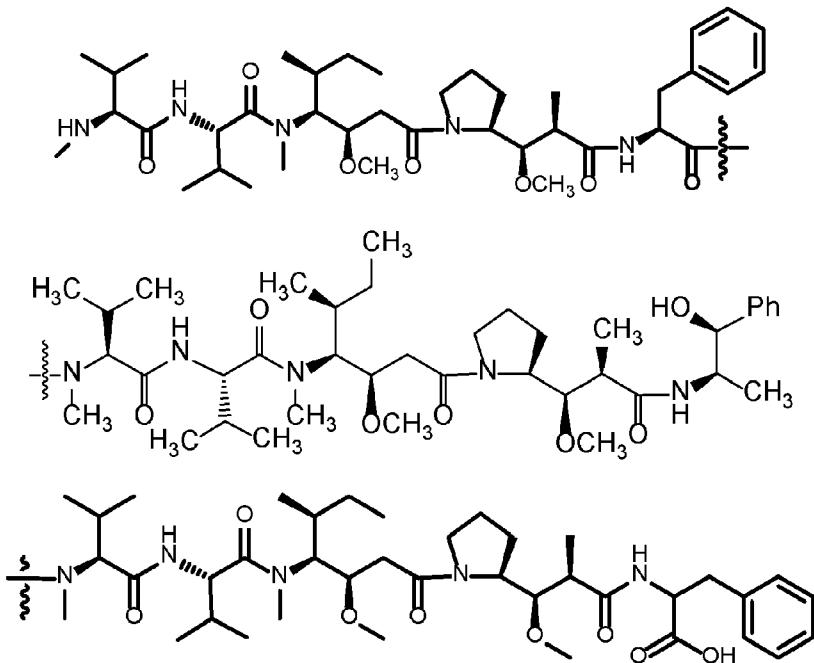
40 (a) agentes antitubulina, auristatinas, aglutinantes del surco menor de ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizantes de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, compuestos formadores de poros, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizantes de la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa y alcaloides de la vinca;

45 (b) auristatinas, camptotecinas, duocarmicinas, etopósidos, maitansinas y maitansinoides, taxanos, benzodiacepinas y alcaloides de la vinca; o

(c) auristatinas y pirrolo[1,4]benzodiacepinas (PBD).

45 7. Un conjugado de Ligando-Fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un Conjugado de Fármaco-Enlazador según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde D se selecciona entre el grupo que consiste en auristatinas que tienen las estructuras de:

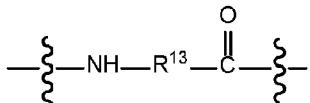




y su sal farmacéuticamente aceptable, en donde la línea ondulada indica el lugar de unión a la Unidad Enlazadora.

8. Un conjugado de Ligando-Fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o la reivindicación 7, o un conjugado de Fármaco-Enlazador según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la unidad de Extensión

- 5 (A) se selecciona entre el grupo que consiste en -NH-alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -NH-alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-NH-C(O)-alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -NH-alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-C(O)-NH-alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>s</sub>CH<sub>2</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>s</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-, -NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>s</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-, -NH-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -NH-(arileno)- y -NH-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, en donde cada s es independientemente 1-10, o en donde la Unidad de Extensión (A) tiene la fórmula de:

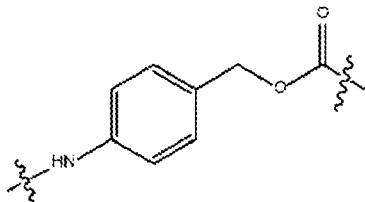


- 10 en donde R<sup>13</sup> es -alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -arileno-, -heteroalquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>-, -heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-, -arileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -arilen-alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-, -(heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>)-alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-10</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-O- (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>1-10</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-, preferentemente -alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o -heteroalquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, más preferentemente R<sup>13</sup> es alquíleno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>1-10</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub> o -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>1-10</sub>(-CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>.

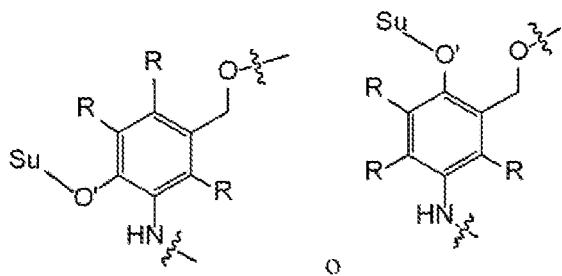
- 15 9. Un conjugado de Ligando-Fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o las reivindicaciones 7 a 8, o un conjugado de Fármaco-Enlazador según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde -W<sub>w</sub>- está representada por -(AA)-<sub>1-12</sub> o (-AA-AA)-<sub>1-6</sub> en donde AA es en cada aparición independientemente seleccionada entre aminoácidos naturales o no naturales, preferentemente seleccionados independientemente entre aminoácidos naturales, y el enlace entre la unidad Escindible (W) y la unidad de Fármaco (D) o la unidad Espaciadora (Y) es escindible enzimáticamente por una proteasa asociada a tumor, preferentemente por la catepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

- 20 10. Un conjugado de Ligando-Fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o las reivindicaciones 7 a 9, o un conjugado de Fármaco-Enlazador según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde -W<sub>w</sub>- es -Val-Cit-, -Phe-Lys- o -Val-Ala-.

- 25 11. Un conjugado de Ligando-Fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o las reivindicaciones 7 a 10, o un conjugado de Fármaco-Enlazador según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en donde -Y<sub>y</sub>- está representado por:



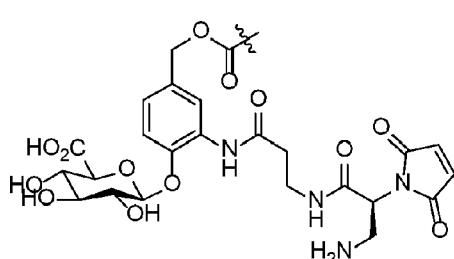
12. Un conjugado de Ligando-Fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o la reivindicación 11, o un Conjugado de Fármaco-Enlazador según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 u 11, en donde  $-W_w-$  es una  
5 Unidad de Glucurónido que tiene la estructura de:



en donde S es un resto de azúcar;

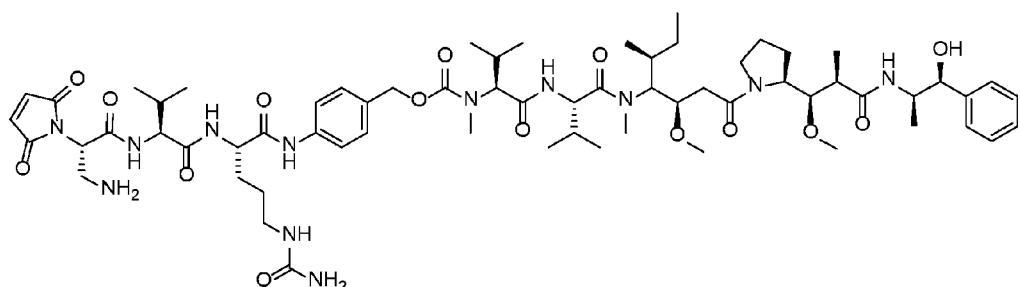
10 -O'- representa un enlace glicosídico que proporciona un sitio de escisión  $\beta$ -glucuronidasa que es escindible por la  
 $\beta$ -glucuronidasa lisosomal humana;  
 cada R es, de forma independiente, hidrógeno, un halógeno, -CN o -NO<sub>2</sub>;  
 el enlace ondulado adyacente al átomo de nitrógeno indica la unión covalente a la unidad de Extensión o al  
 15 anticuerpo (Ab); y  
 el enlace ondulado adyacente al oxígeno indica la unión covalente a la unidad Espaciadora (Y) o a la unidad de  
 Fármaco (D).

13. Un Conjugado de Fármaco-Enlazador según la reivindicación 4, que tiene la estructura:

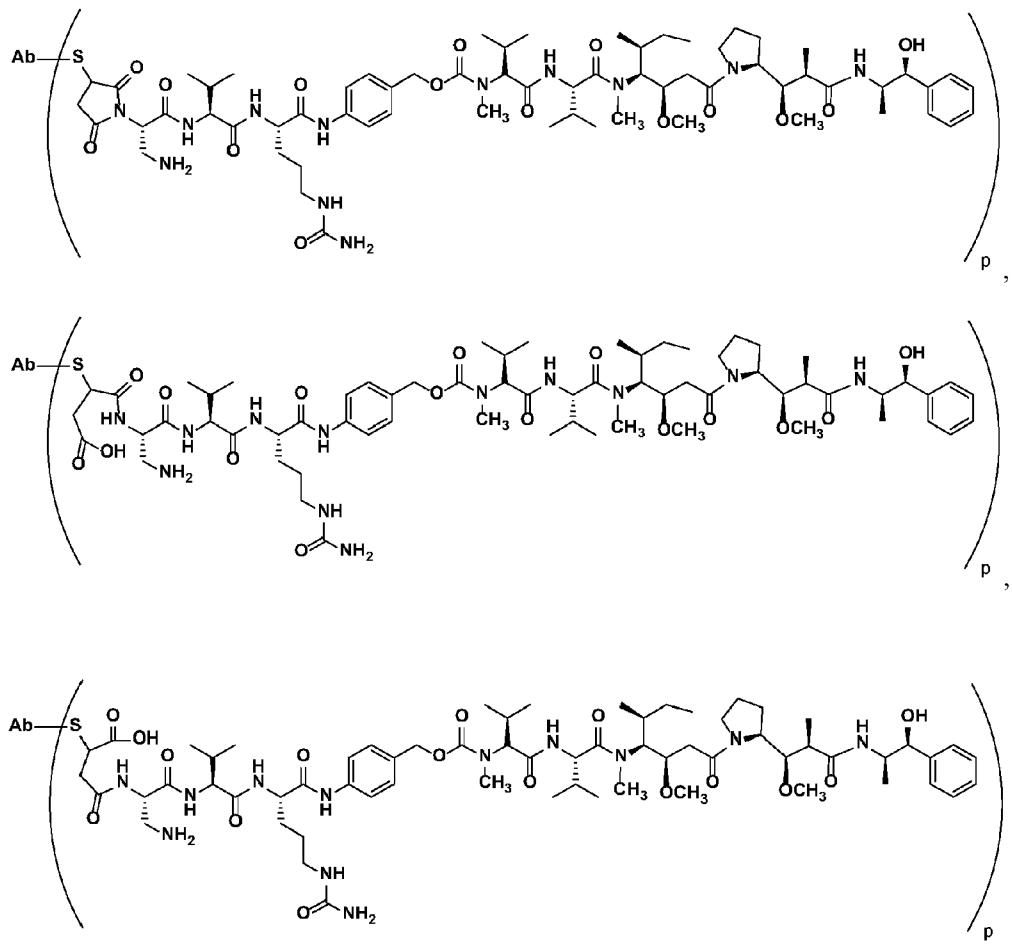


en donde la línea ondulada adyacente al carbonilo indica unión covalente al Fármaco (D).

- 25 14. Un Conjugado de Fármaco-Enlazador según la reivindicación 4, que tiene la estructura:



15. Un Conjugado de Ligando-Fármaco según la reivindicación 1, que tiene la estructura:



o una sal del mismo, en donde

Ab es un anticuerpo monoclonal y S es un átomo de azufre del anticuerpo monoclonal.

- 5 16. Un conjugado de Ligando-Fármaco según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 6 a 12 o 15 para su uso en un método de tratamiento del cáncer, cuyas células cancerosas expresan un antígeno diana, en donde el anticuerpo (Ab) es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno diana.

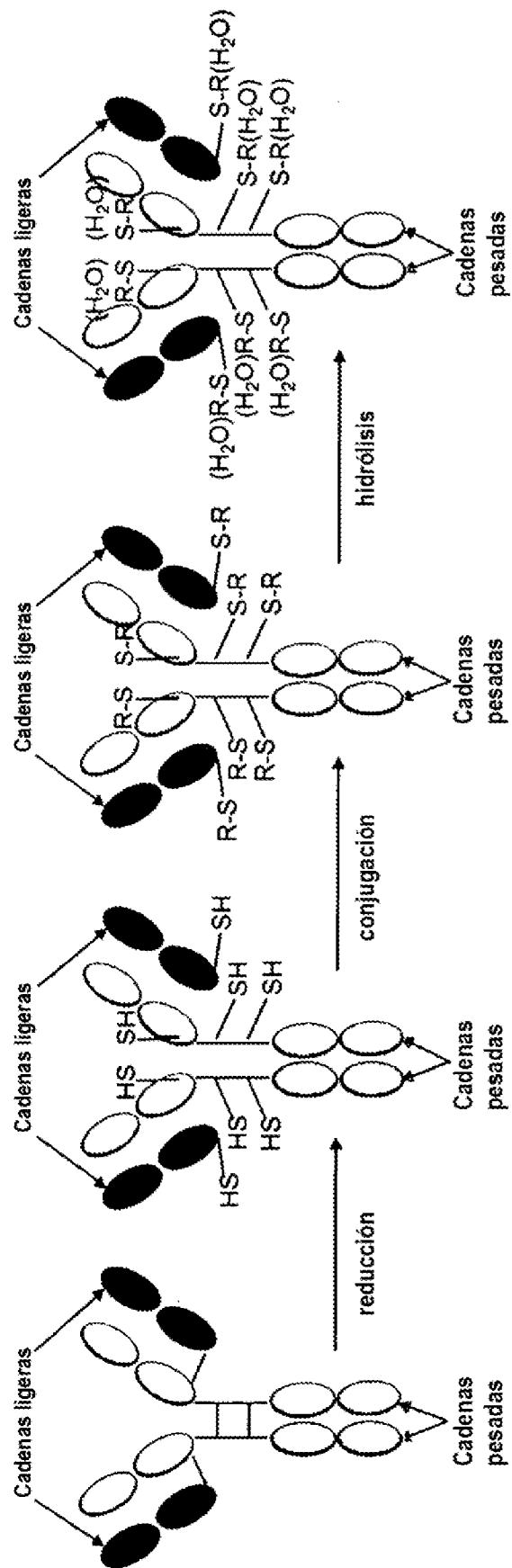


FIG. 1

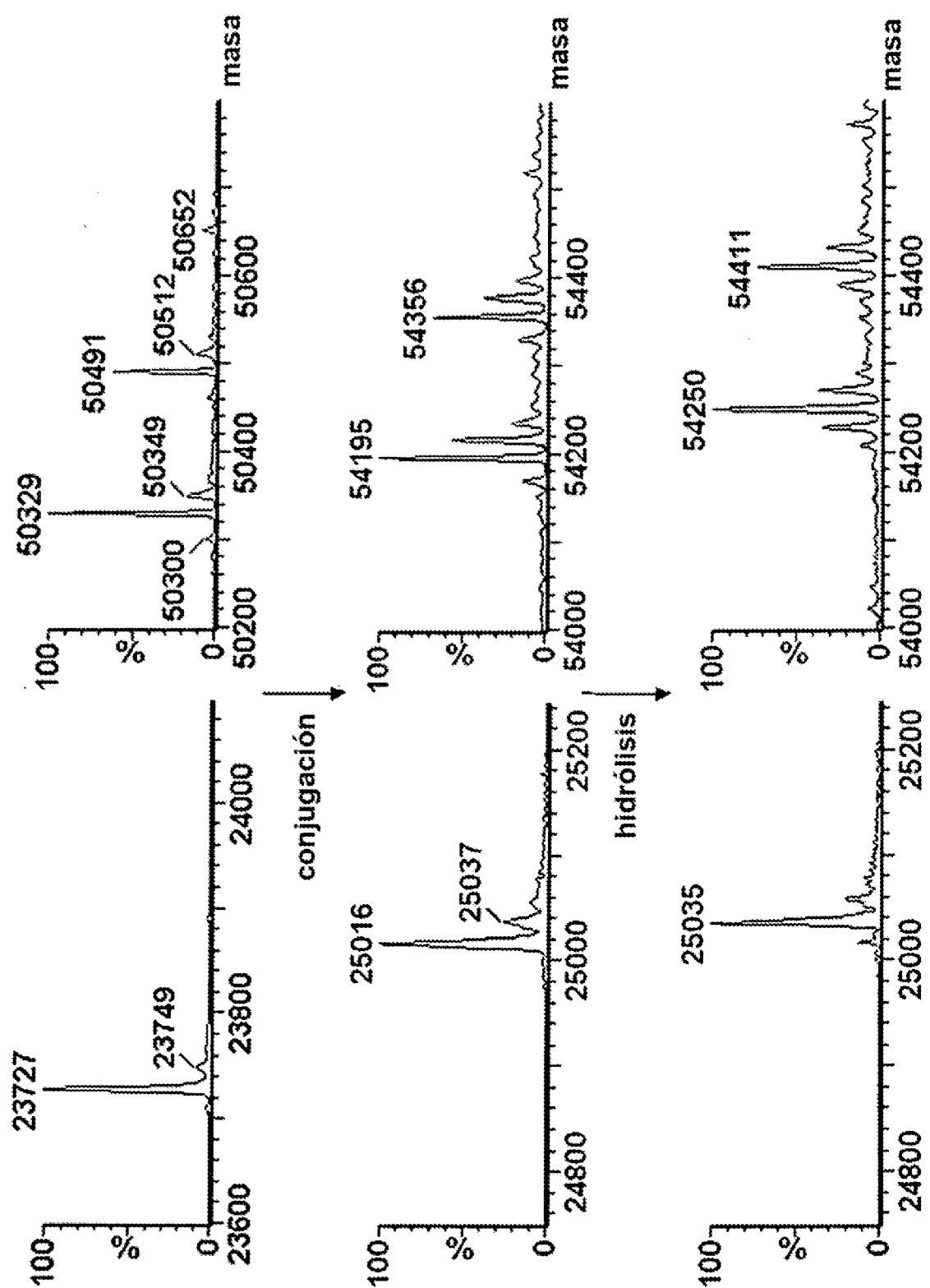


FIG. 1 (cont.)

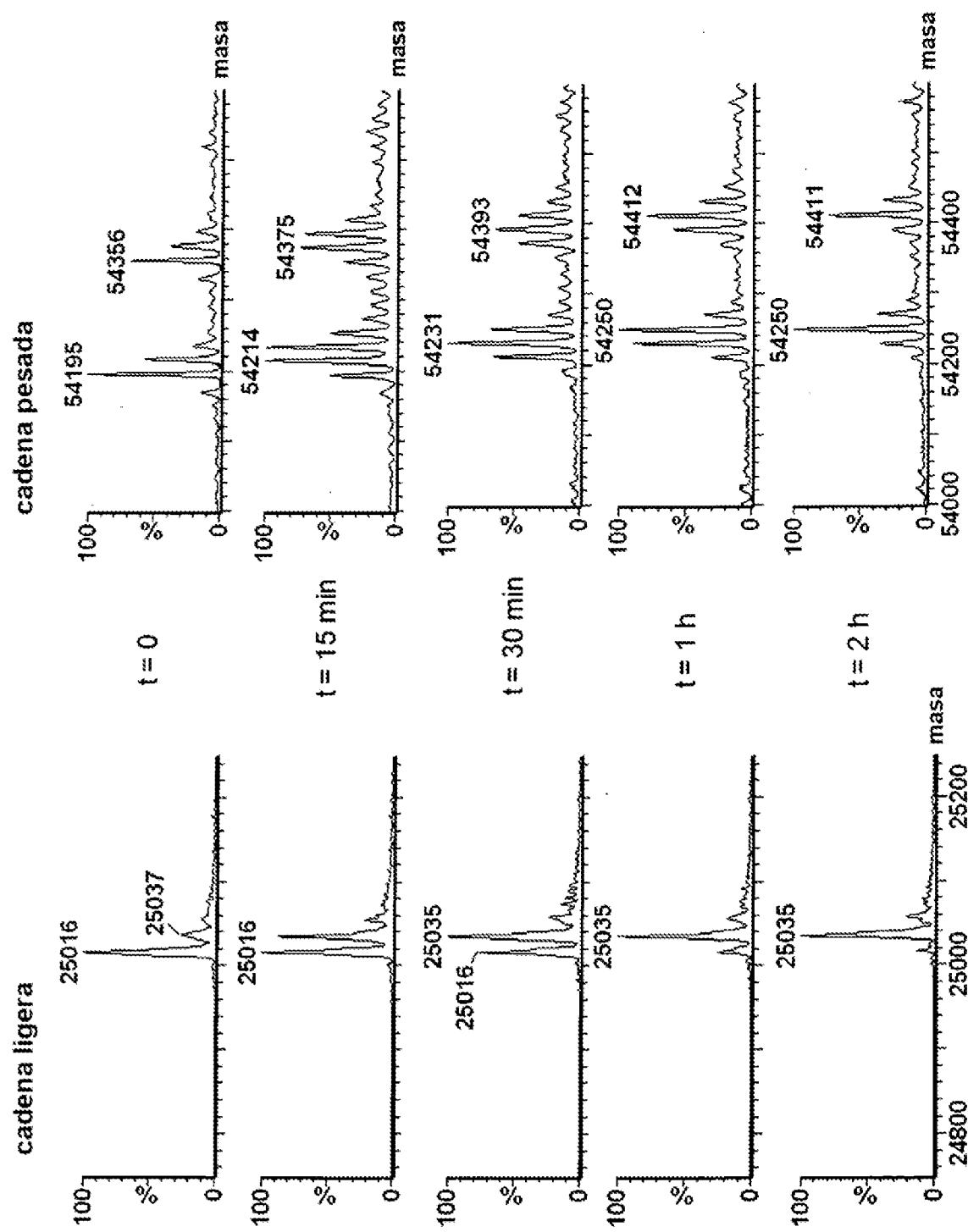


FIG. 2

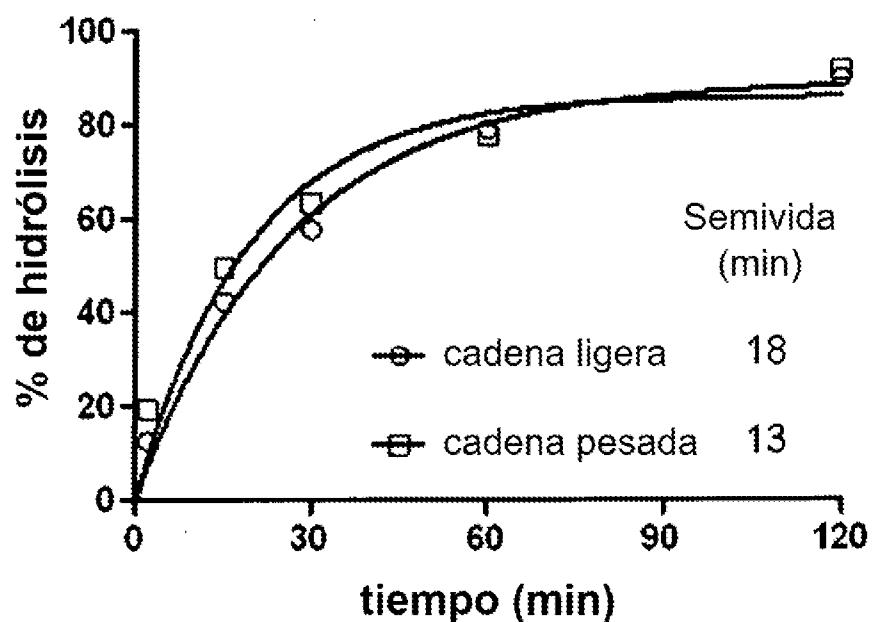


FIG. 2 (cont.)

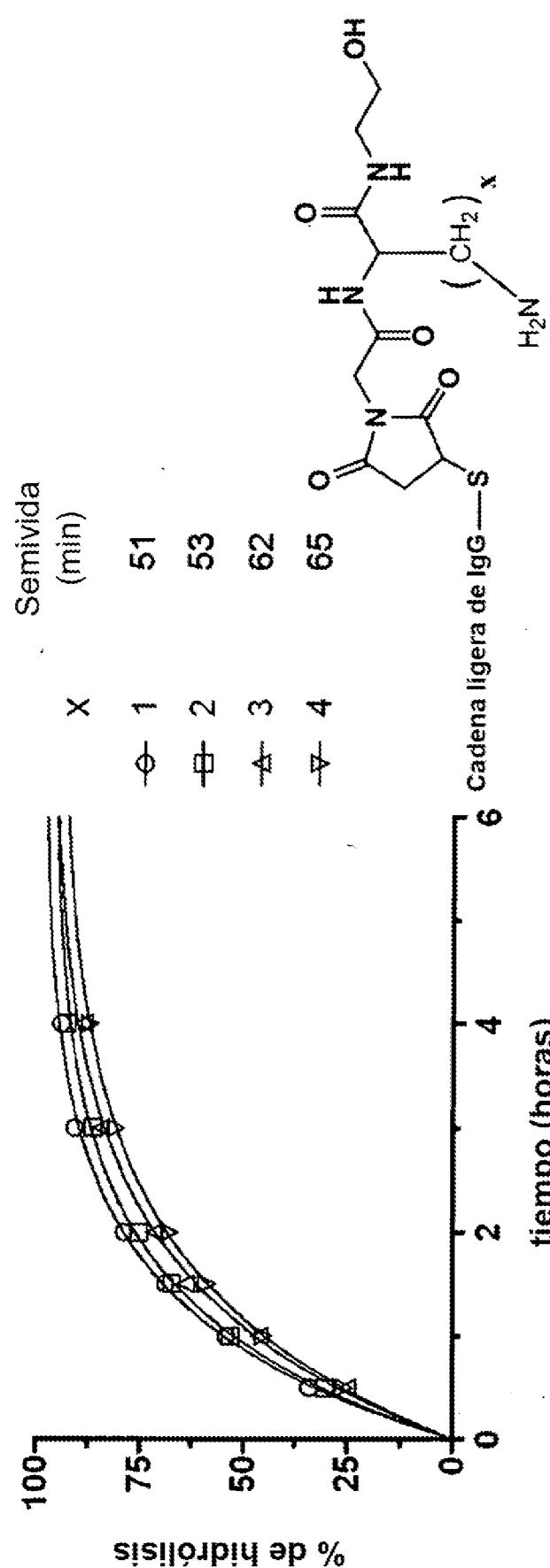


FIG. 3

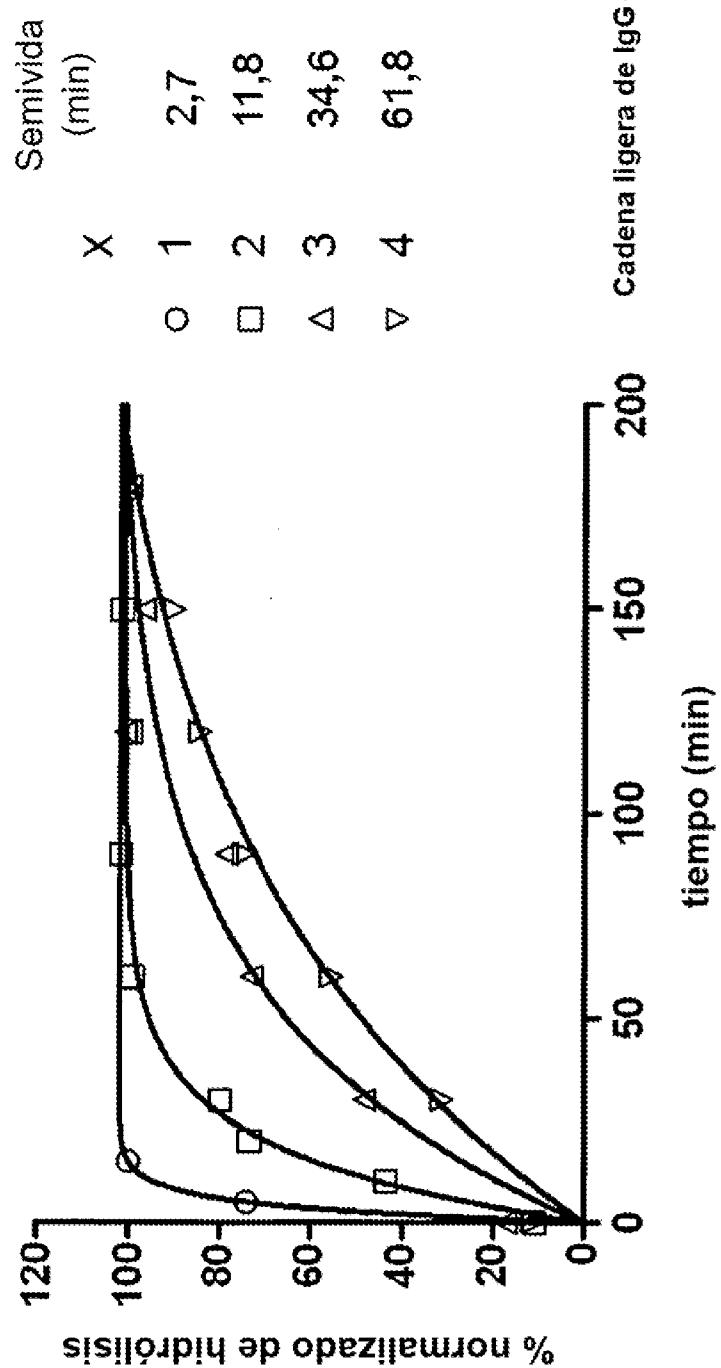
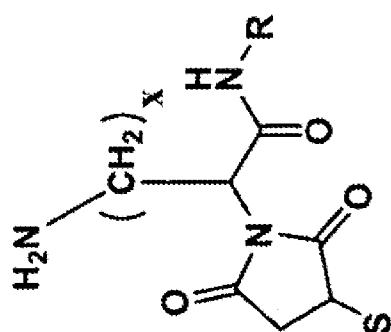


FIG. 4

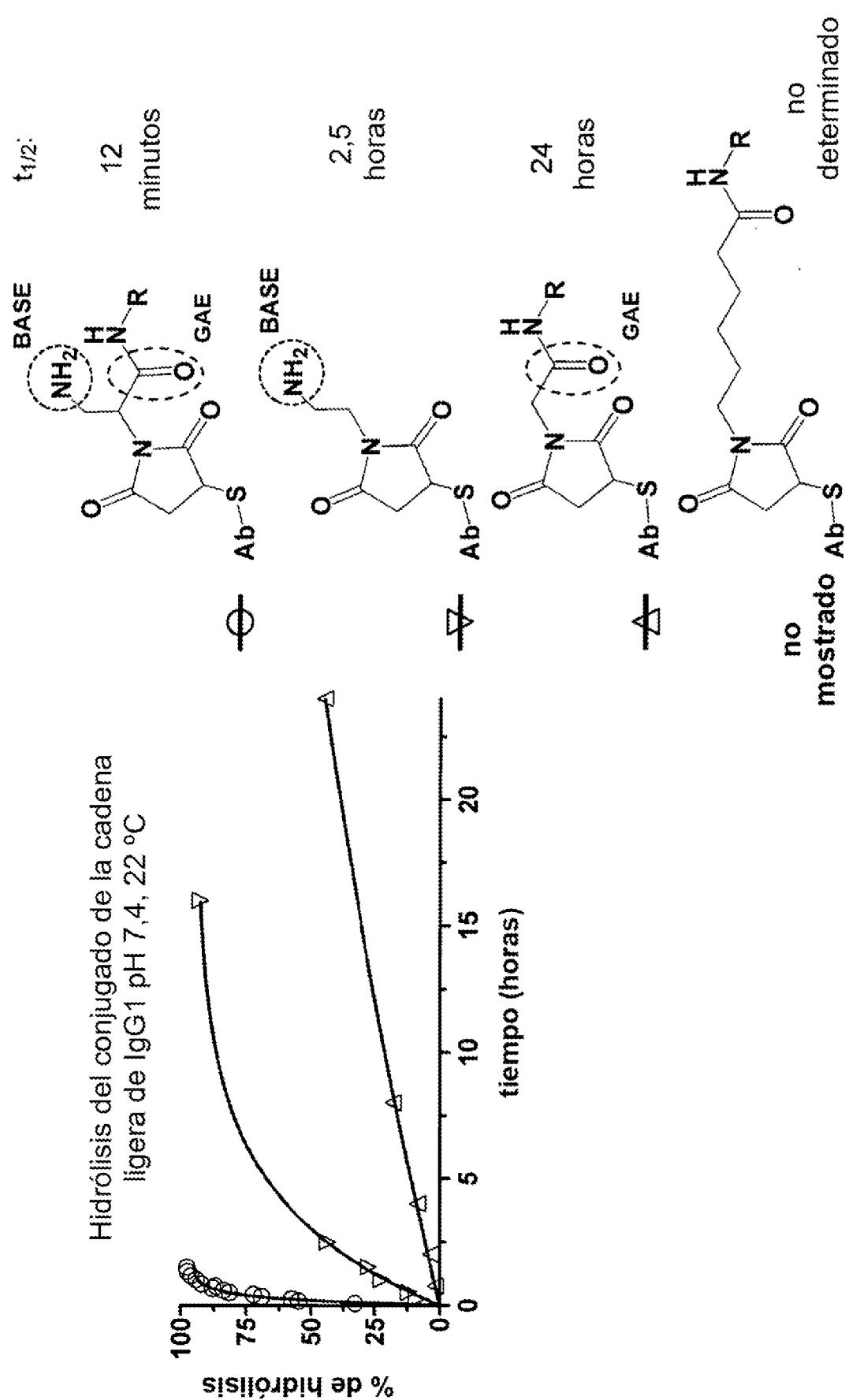


FIG. 5

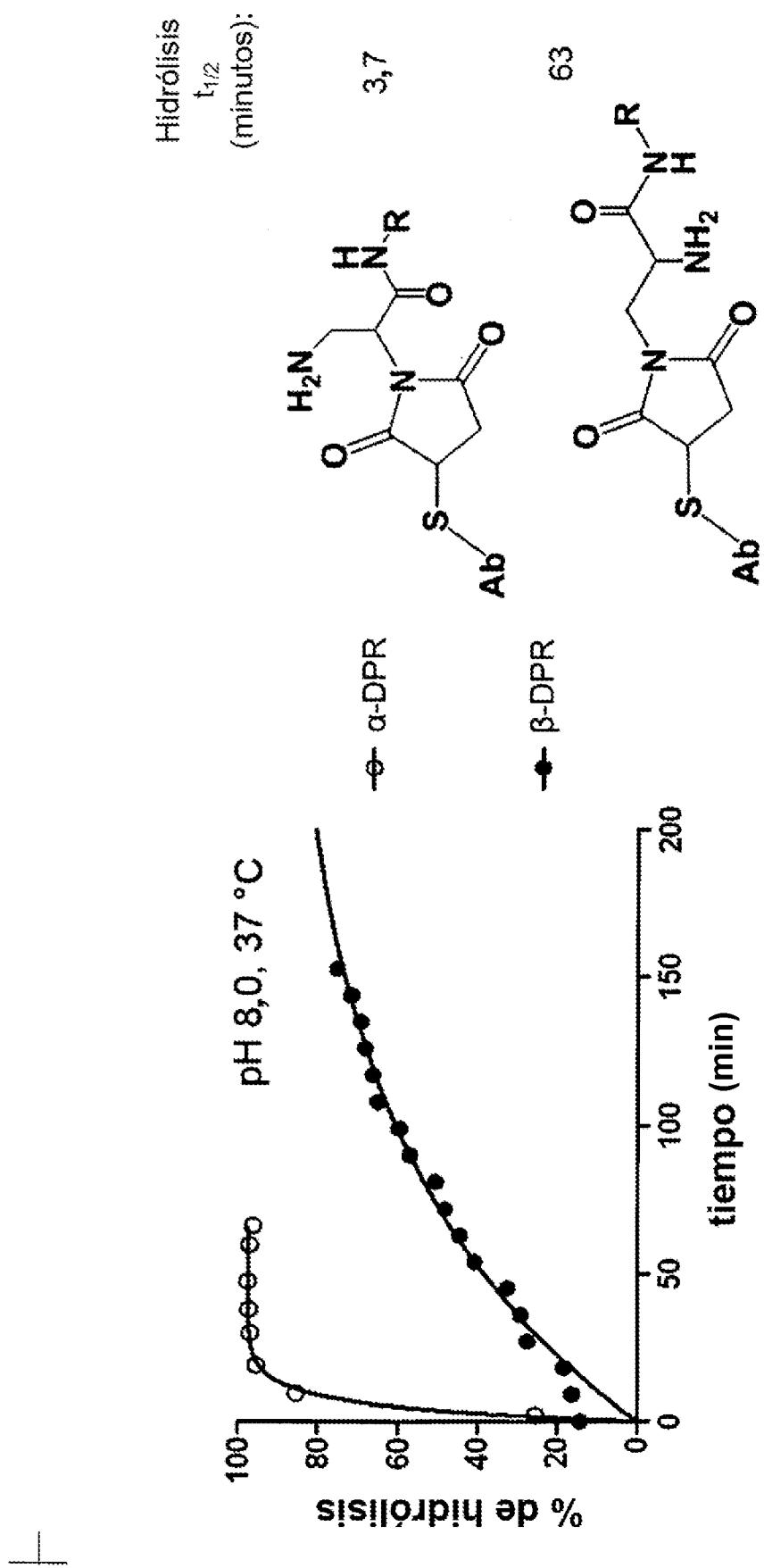


FIG. 6

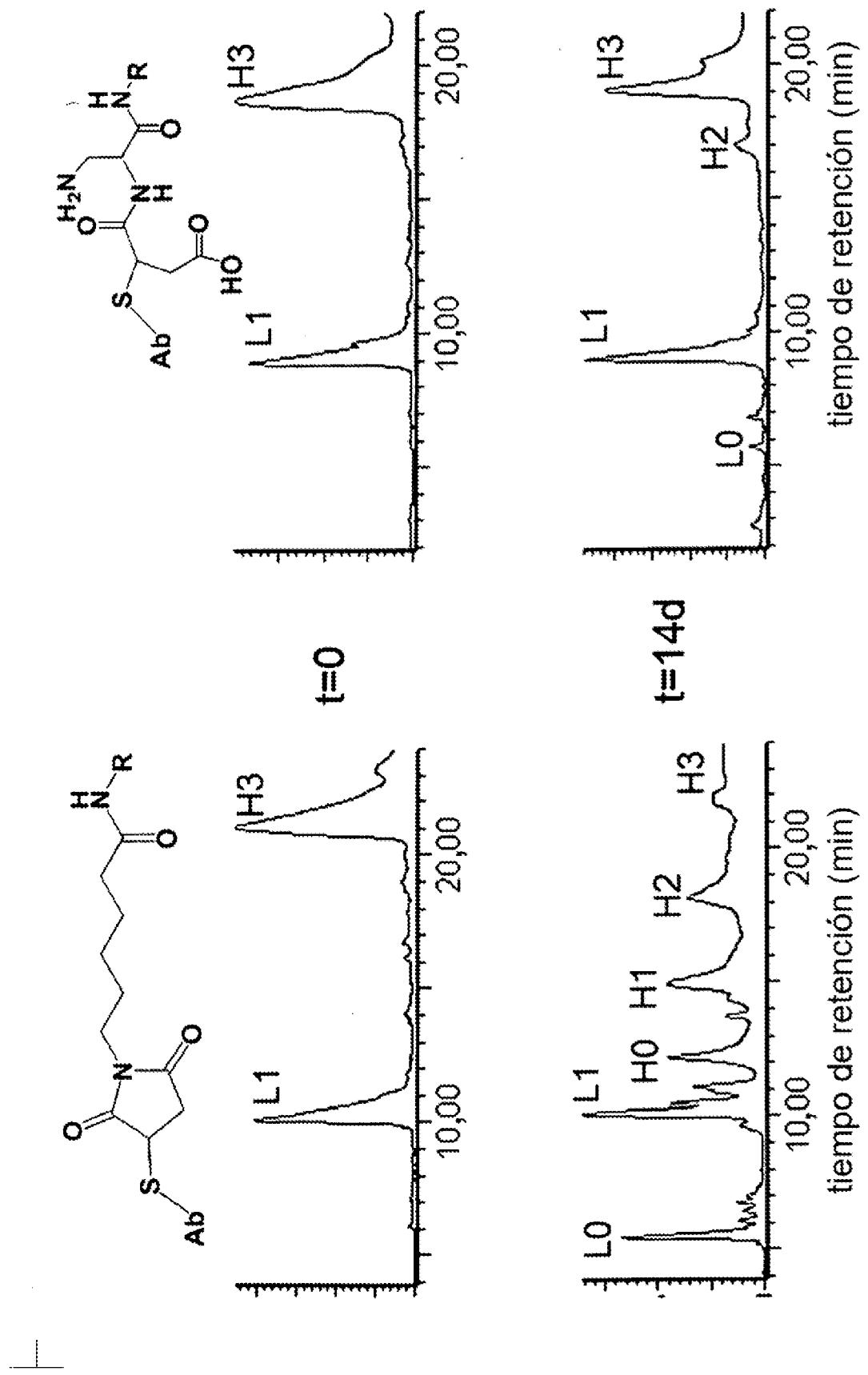
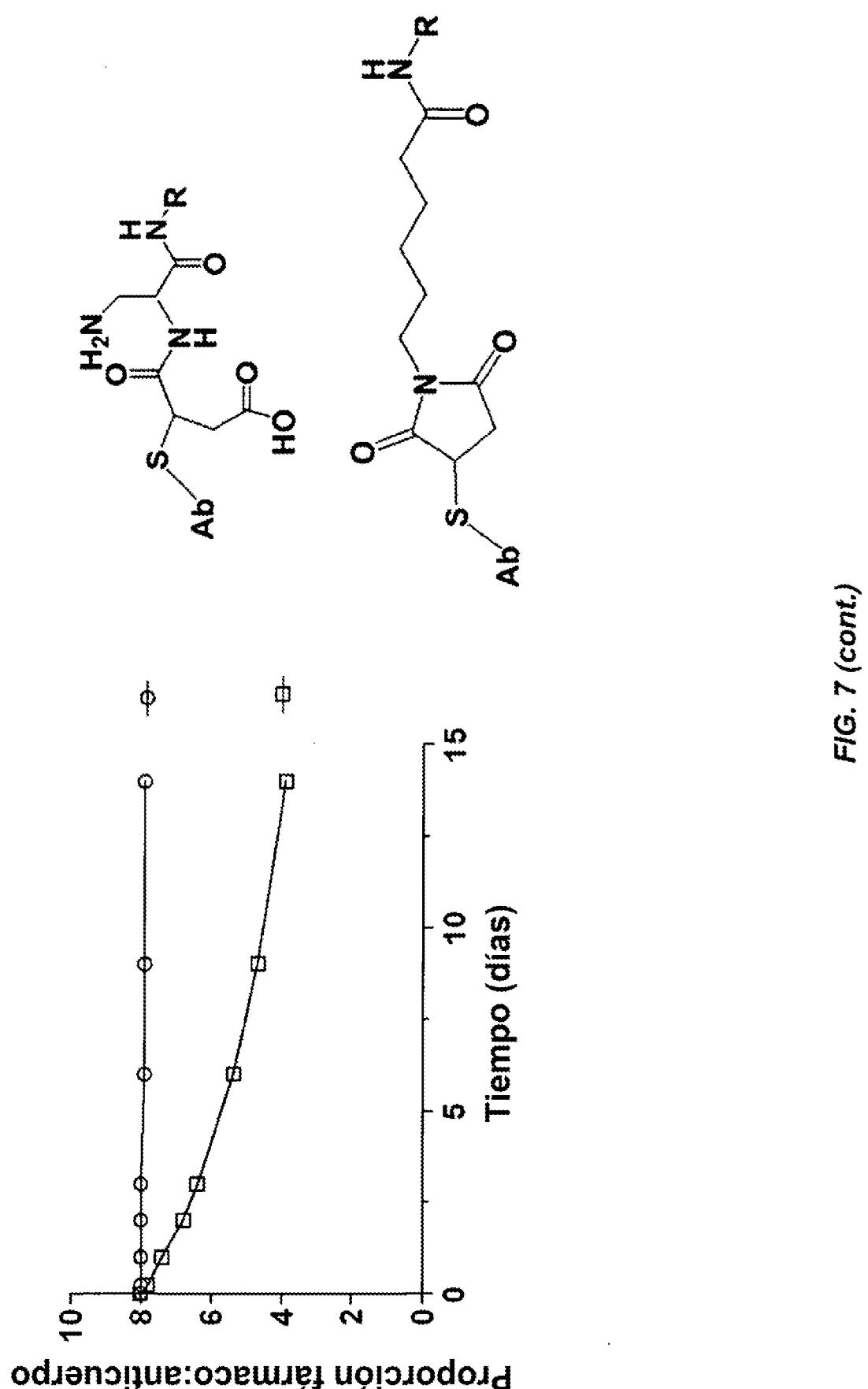


FIG. 7



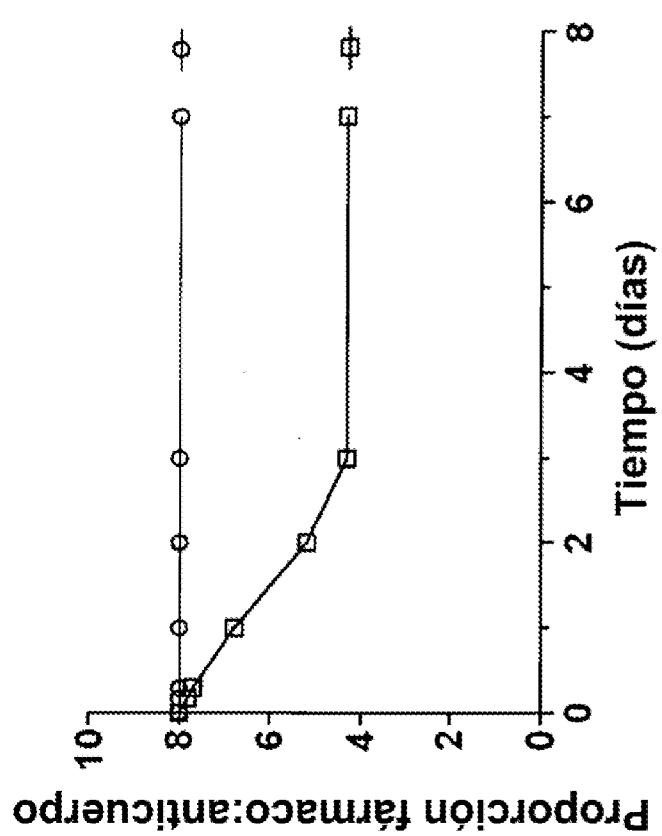
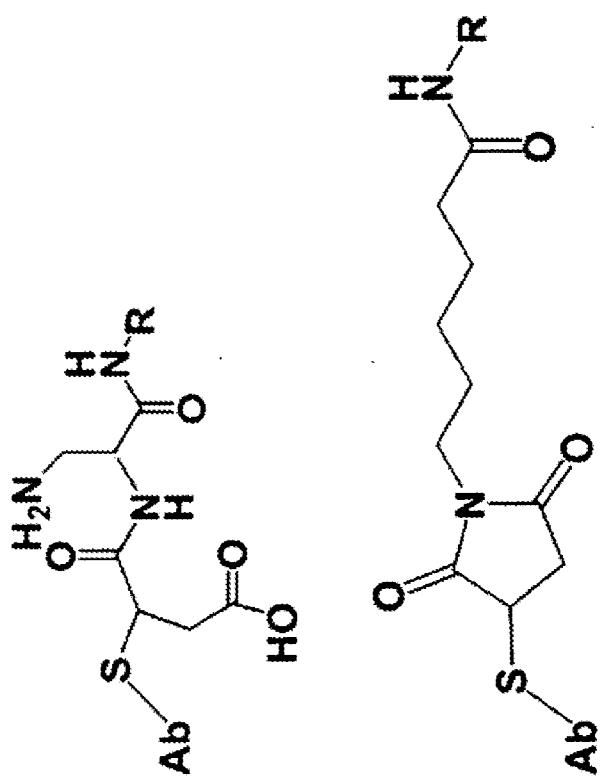


FIG. 8

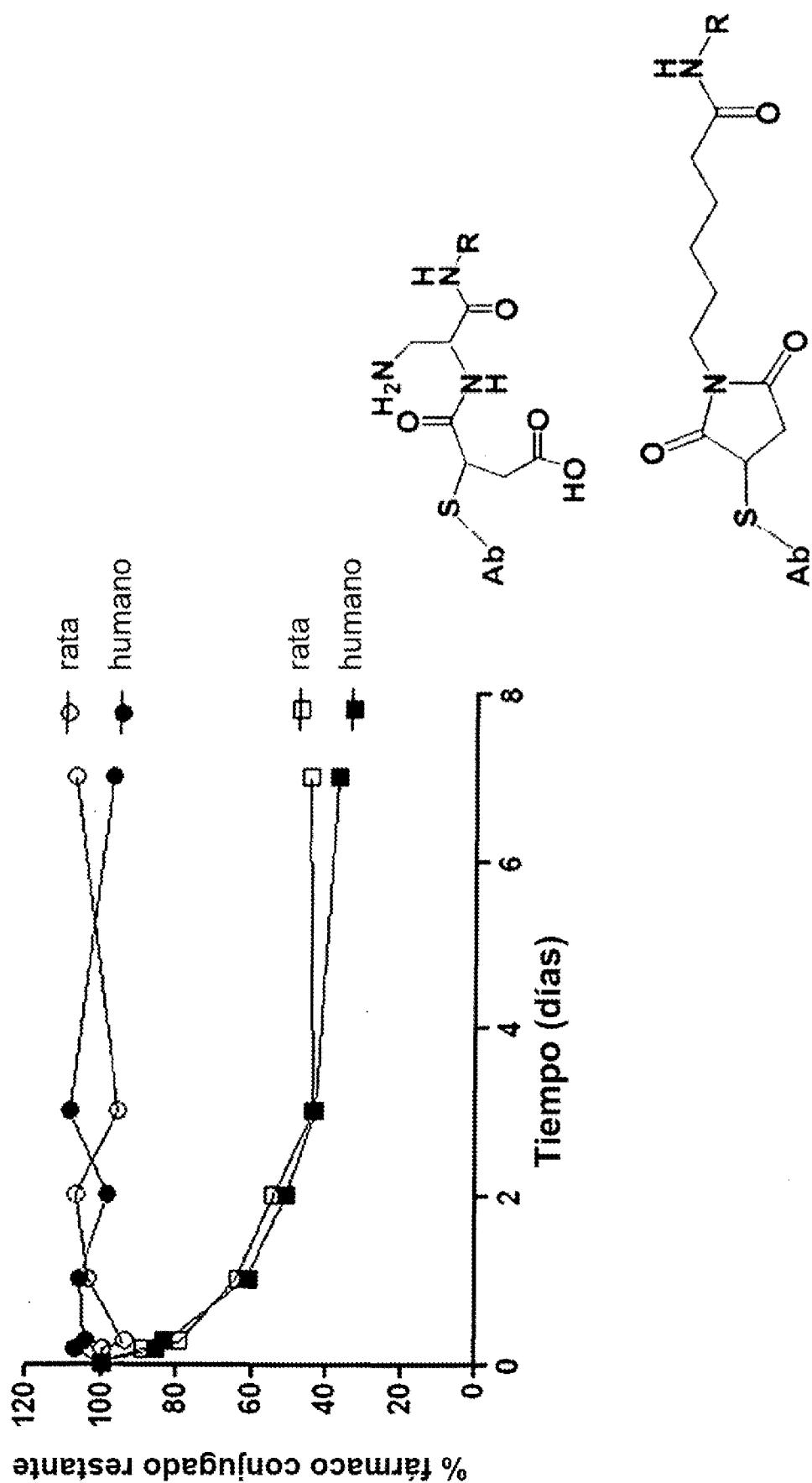


FIG. 9

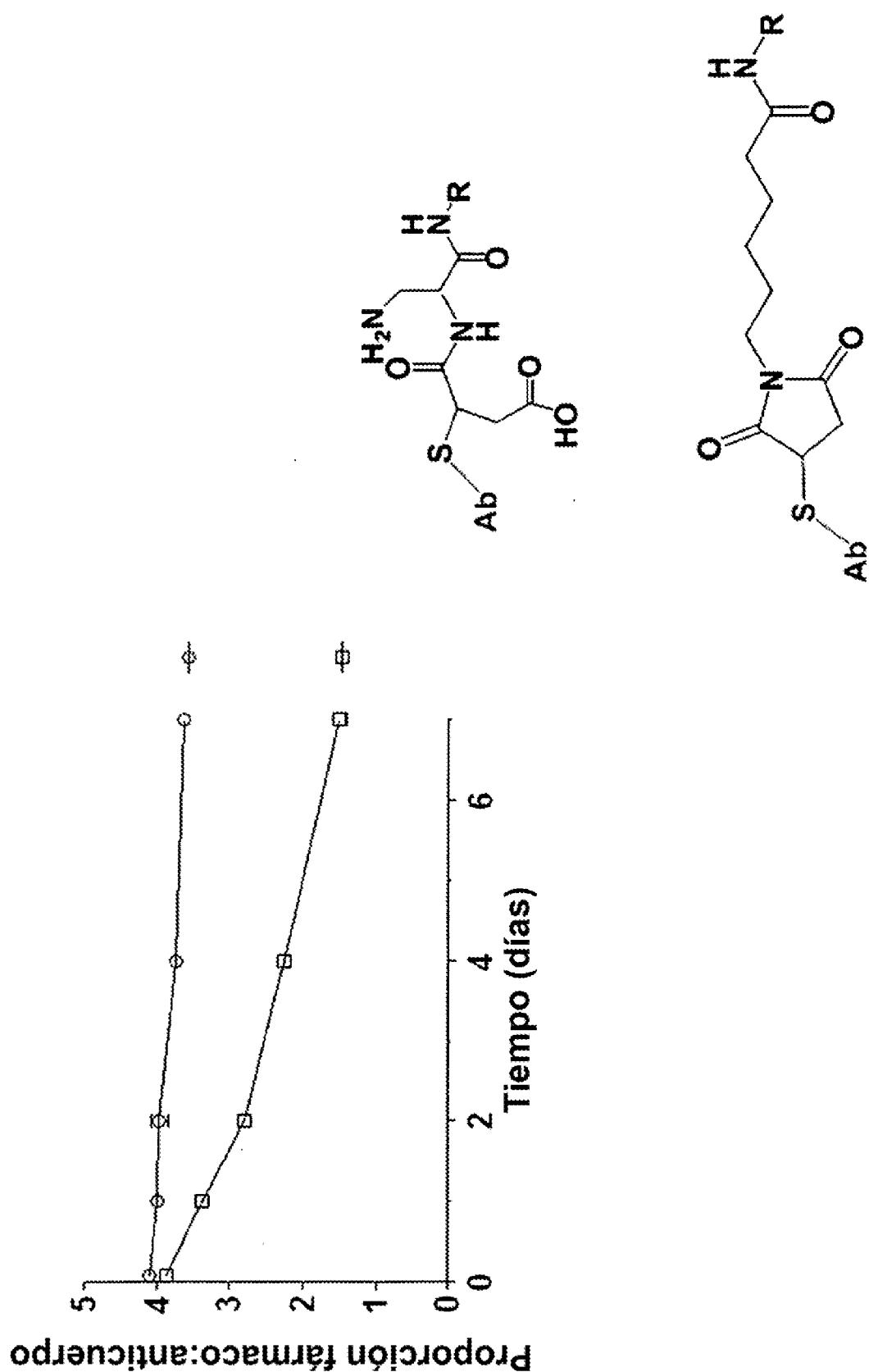


FIG. 10

—x sin tratar

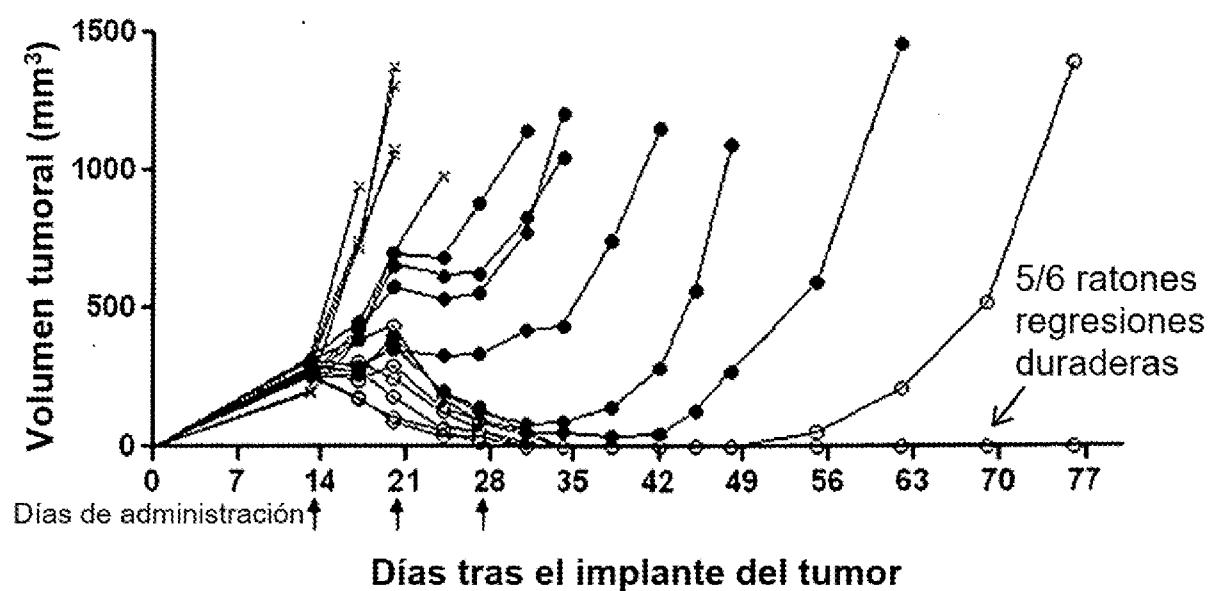
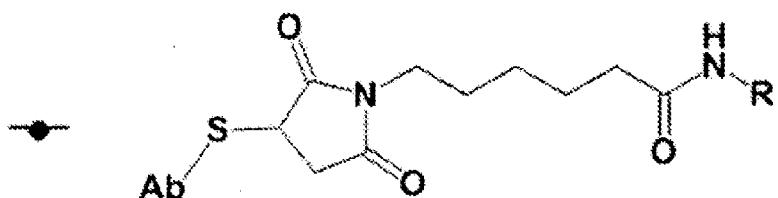
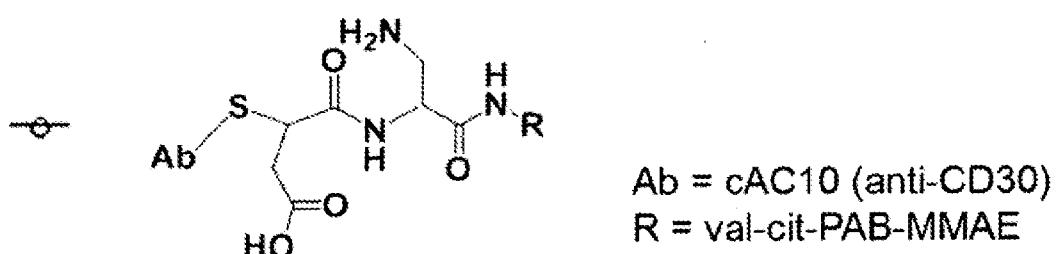


FIG. 11